

UFR SCIENCES ET TECHNIQUES COTE BASQUE

Université de Pau et des Pays de l'Adour

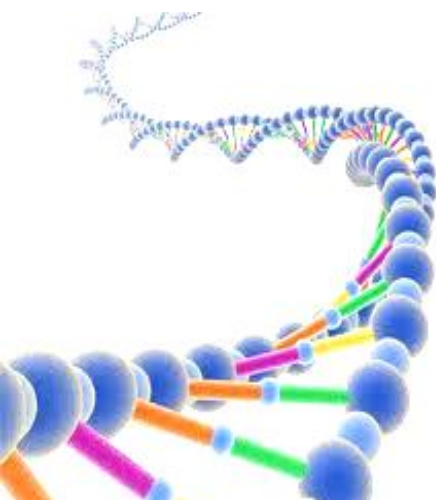
Licence biologie des Organismes



*Comparaison de trois PCR pour la détection du gène
codant pour la toxine de Pasteurella multocida responsable
de la rhinite atrophique chez le porc.*

DUROT Anne-Laure

**Stage effectué du 05 mars au 11 mai 2012 au
Laboratoire Labofarm, 4 rue Théodore Botrel, 22603 LOUDEAC
Sous la direction scientifique de Mr LE GUENNEC Jean**



« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil. »

Sommaire

REMERCIEMENTS	p.1
AVANT PROPOS	p.2
INTRODUCTION	p.3
I) La PCR	p.3
A) Généralités	p.3
B) La PCR Classique	p.4
C) La PCR en Temps Réel	p.4
II) La Rhinite atrophique et <i>Pasteurella multocida</i>	p.5
A) Généralités	p.5
B) <i>Pasteurella multocida</i>	p.5
C) Diagnostic de la rhinite atrophique	p.6
MATERIEL ET METHODES	p.8
I) Nature des échantillons	p.8
A) Souche de <i>Pasteurella multocida</i>	p.8
B) Ecouillons de nez réalisés sur porcs sains	p.8
C) Ecouillons de nez réalisés sur porcs présentant des signes cliniques	p.8
D) Raclages d'amygdales réalisés sur porcs sains	p.8
II) Culture de <i>Pasteurella multocida</i> dermonécrotique	p.9
A) Culture sur milieu gélosé	p.9
1) Souche CIP	p.9
2) Ensemencement par inondation	p.9
3) Ensemencement à partir d'un écouillon	p.9

III) Dénombrement du bouillon de culture	p.9
IV) Inoculation expérimentale des échantillons par <i>Pasteurella multocida</i> dermonécrotique	p.10
A) Inoculation de la suspension cellulaire issue de raclages de boîtes.....	p.10
B) Inoculation de la suspension cellulaire issue des écouvillons réalisés sur porcs sains	p.10
C) Inoculation directe d'écouvillons stériles.....	p.10
V) Extraction de l'ADN	p.10
A) A partir de cultures bactériennes.....	p.10
B) A partir des écouvillons.....	p.10
VI) PCR	p.11
VII) Amplification du contrôle interne	p.11
RESULTATS	p.12
I) Comparaison de la sensibilité des 3 PCR pour la détection du gène codant pour la toxine de <i>Pasteurella multocida</i>	p.12
A) Détermination de la concentration en <i>Pasteurella multocida</i> dermonécrotique du bouillon de culture.....	p.12
B) Détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'une souche pure de <i>Pasteurella multocida</i>	p.12
C) Détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'écouvillons de nez.....	p.13
D) Détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir de raclages de boîtes.....	p.13
II) Essais de détection du gène codant pour la toxine de <i>Pasteurella multocida</i> sur des élevages présentant des signes cliniques de la rhinite atrophique	p.14
III) Test de l'effet de la congélation sur la détection du gène codant pour la toxine de <i>Pasteurella multocida</i>	p.14
DISCUSSION	p.15
CONCLUSION	p.17
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.18

Sommaire des figures

Figure 1: *Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.*

Figure 2: *Evolution de l'atrophie des cornets nasaux de porcs par *Pasteurella multocida* dermonécrotique*

Figure 3: *Réalisation des échantillons terrain : écouvillons de nez et raclages d'amygdales*

Figure 4: *Thermocycleur Stratage Mx 3005P et Thermocycleur GeneAmp PCR System 9700*

Sommaire des tableaux

Tableau 1: *Dénombrement du bouillon de culture de *Pasteurella multocida* dermonécrotique*

Tableau 2: *Concentration en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans les volumes d'ADN utilisés pour chaque PCR avec la souche pure*

Tableau 3: *Résultats de la détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'une souche pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique*

Tableau 4: *Résultats de la détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'une souche pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique*

Tableau 5: *Concentration en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans les volumes d'ADN utilisés pour chaque PCR avec les écouvillons de nez*

Tableau 6: *Résultats de la mesure de la sensibilité des 3 PCR à partir des écouvillons de nez*

Tableau 7: *Résultats d'amplification des échantillons terrain des élevages présentant des symptômes de la rhinite atrophique*

Tableau 8: *Concentration en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans les volumes d'ADN utilisés pour chaque PCR dans le test de congélation*

Tableau 9: *Résultats du test de la congélation d'écouvillons sur les résultats de PCR*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier *Monsieur Le Guennec Jean, directeur général du Laboratoire Labofarm*, de m'avoir accueillie pendant ces dix semaines au sein de son laboratoire et de m'avoir proposé cet intéressant et enrichissant sujet.

Je remercie également *Monsieur Moalic Pierre-Yves, directeur technique du service PCR* pour m'avoir fait partager ses connaissances et avoir fait preuve de pédagogie, de patience, de disponibilité et surtout de confiance tout au long de ce stage.

J'adresse également de grands remerciements au personnel du laboratoire, et en particulier aux techniciens de PCR : *Messieurs HILLION Mickaël, PALACIN Christophe, ROBIC Mathieu et Madame GAUDIN Tiphaine* qui ont contribué à l'ouverture de mon expérience professionnelle en laboratoire ainsi que pour leur sympathie, leur disponibilité et leurs précieux conseils.

Avant propos

I- Situation géographique de l'entreprise

Le laboratoire Labofarm est situé à Loudéac, dans le département des Côtes d'Armor, au cœur d'une région agricole d'élevages porcins et avicoles. Sa situation géographique est un grand atout : Loudéac se trouve à l'intersection de deux grands axes routiers : la nationale traversant le centre de la Bretagne d'est en ouest (Rennes – Brest) et la transversale Nord – Sud (Saint-Brieuc – Vannes). Son emplacement permet de desservir toute la Bretagne et facilite ainsi l'acheminement des différents échantillons.

II- Présentation des différents services et de leurs fonctions

Le laboratoire est indépendant et met en œuvre ses prestations d'analyses pour de nombreux clients : les vétérinaires, les couvoirs, les groupements de producteurs, les intégrateurs de volailles, les fabricants d'aliments ainsi que les industries agroalimentaires. Il intervient ainsi comme un partenaire essentiel à la maîtrise sanitaire en élevage porcin et avicole en fournissant aux clients un résultat d'analyse fiable et rapide.

Les clients font appel au laboratoire principalement pour :

- Des examens lésionnels sur animaux morts ou malades dans les filières avicoles, cunicoles et porcines,
- Des examens bactériologiques suite aux examens lésionnels,
- Des contrôles de l'hygiène et la désinfection des locaux,
- Des analyses bactériologiques et chimiques de l'eau de boisson des animaux,
- Des analyses en sérologie aviaire,
- Des analyses de sperme de verrat.

III- Le service PCR

Le service PCR a fait ses débuts en 1997, Labofarm devient alors le premier laboratoire privé à développer un service en biologie moléculaire. Labofarm a développé différents tests permettant la détection de bactéries, de virus, la recherche de facteurs de virulence bactériens et le sexage des oiseaux exotiques.

Introduction

La France représente le troisième pays producteur de porcs après l'Allemagne et l'Espagne. Les trois quarts des élevages sont localisés dans le grand Ouest, plus particulièrement dans les Côtes d'Armor avec plus de 2 539 000 porcs. Ce chiffre place le département au premier rang mondial de la production porcine. Cependant, de nombreux élevages sont concernés par l'influence de la rhinite atrophique se caractérisant par une atrophie des cornets nasaux, une déviation latérale du groin pouvant même aller jusqu'à des retards de croissance. Cette maladie découverte il y a plus de 150 ans en Europe centrale est encore aujourd'hui l'objet de nombreux débats. *Pasteurella multocida* toxinogène a été reconnue responsable de la maladie. Cette bactérie synthétise une toxine dermonécrotique, codée par le gène chromosomique ToxA, responsable des lésions observées. *Pasteurella multocida* étant aussi une bactérie commensale de l'appareil respiratoire du porc, il est important de différencier les espèces toxinogènes des espèces non toxinogènes. Différentes techniques ont alors été mises en place pour une détection rapide de la souche dermonécrotique. Les méthodes les plus souvent retrouvées dans la littérature sont le test cutané, le test de létalité sur souris, les techniques ELISA et depuis quelques années, des techniques de PCR.

I – La PCR

A) Généralités

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique découverte par K. mullis en 1983 et développée par Henri A. Herlish en 1985. Celle-ci permet l'amplification sélective in vitro de tout fragment d'ADN, pour peu qu'on connaisse la séquence de ses extrémités. Elle est basée sur la fixation de part et d'autres du gène à amplifier, d'amorces sélectionnées pour être complémentaires d'un des brins d'ADN permettant ainsi une extension d'amorces en même temps sur les deux brins. La technique PCR est un enchainement de cycles qui comprennent chacun les trois étapes suivantes : dénaturation, hybridation et élongation. Les réactifs nécessaires pour cette amplification sont : l'ADN à amplifier, les deux amorces oligonucléotidiques encadrant la région à amplifier, les quatre désoxyribonucléotides tri-phosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) et enfin l'ADN polymérase. La dénaturation consiste en une rupture des liaisons non covalentes établies

entre les bases à haute température conduisant ainsi à la séparation des deux brins. Ensuite, lors de l'hybridation, les amorces oligonucléotidiques viennent s'hybrider sur les séquences complémentaires. Enfin, l'extension correspond en un ajout progressif par l'ADN polymérase des désoxyribonucléotides tri-phosphate présents en large excès dans le milieu.

Chaque cycle aboutit théoriquement au doublement de la quantité du fragment situé entre les deux amorces. En partant de 2 brins initiaux, on obtient donc 2^n séquences après n cycles. Au-delà de 20 cycles, une seule séquence cible d'ADN est amplifiée plus d'un million de fois.

Les applications commerciales de la PCR sont aujourd'hui immenses : séquençage des génomes, détection des maladies génétiques, étude de l'ADN fossile, police scientifique, détection d'OGM... Suivant la finalité du résultat attendu, différentes techniques de PCR existent, variant essentiellement sur la technique de révélation des amplicons.

B) La PCR classique

La PCR classique a pour objectif de donner un résultat qualitatif, c'est-à-dire conclure par l'absence ou la présence du germe recherché. La réalisation de celle-ci se fait dans un thermocycleur permettant une automatisation de la technique. La révélation des produits amplifiés est possible par migration dans un gel d'électrophorèse contenant du BET (Bromure d'Ethidium). Celui-ci s'intercale entre les bases des acides nucléiques et devient fluorescent lors de l'exposition aux rayonnements ultraviolets. L'électrophorèse permet une séparation des fragments d'ADN sous forme de bandes en fonction de leur taille. L'utilisation d'un marqueur de taille permet de comparer les fragments obtenus et connaître leur longueur.

C) La PCR en temps réel

La PCR en temps réel, contrairement à la PCR classique, est une technique quantitative. Elle permet ainsi de déterminer la quantité de produit à amplifier, présent initialement dans l'échantillon. C'est pourquoi, cette technologie est de plus en plus utilisée. Théoriquement, il existe une relation quantitative entre la quantité d'ADN présente initialement dans l'échantillon et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. Les amorces encadrant la région à amplifier sont additionnées d'une sonde d'hydrolyse s'hybridant à l'ADN. Cette sonde est marquée par un fluorochrome émetteur et par un suppresseur qui, à proximité du fluorochrome, inhibe sa fluorescence. Lors de l'hybridation, la sonde est dégradée, le fluorochrome est donc séparé de son suppresseur et va alors pouvoir fluorescer. Il y a proportionnalité entre l'augmentation du signal fluorescent et la quantité d'amplicons générée lors de la PCR. Les thermocycleurs utilisés au

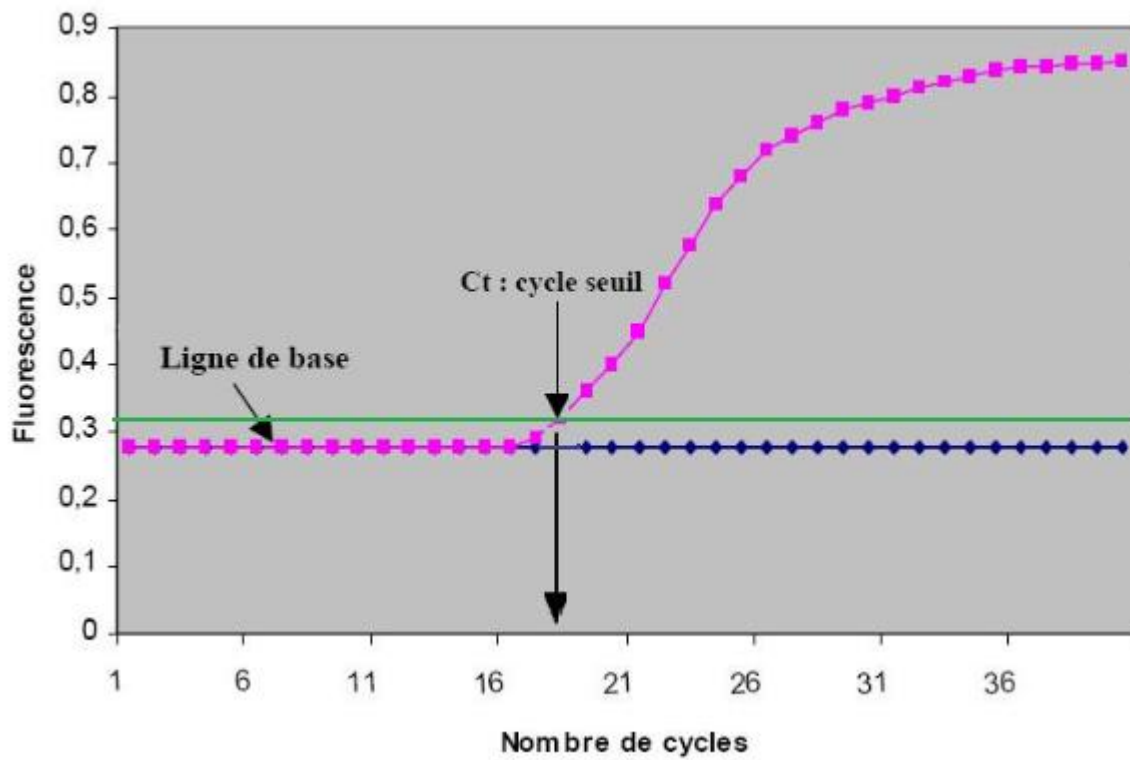


Figure 1 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

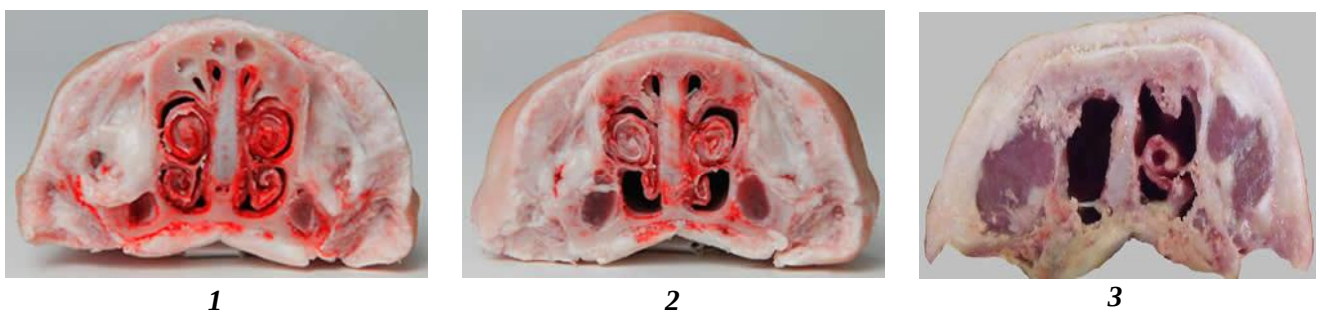


Figure 2 : Evolution de l'atrophie des cornets nasaux de porcs par *Pasteurella multocida* dermonécrotique :

- 1 : Cornets nasaux indemnes**
- 2 : Atteinte modérée des cornets nasaux**
- 2 : Atteinte sévère des cornets nasaux**

laboratoire utilisent le principe de « cycle seuil » (Threshold cycle). Les valeurs de fluorescences sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. Plus il y a de matrices à amplifier au départ, plus le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement plus élevé que le bruit de fond, sera faible. Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaît toujours lors de la phase exponentielle de croissance (Figure 1). La valeur du Ct peut ainsi être traduite comme un résultat quantitatif en la comparant avec des valeurs de Ct générées par des matrices étalons. Cette technique a pour avantage de ne pas utiliser le BET qui est un produit cancérogène.

II – La rhinite atrophique et *Pasteurella multocida*

A) Généralités

Cette maladie infectieuse du porc est caractérisée par un écoulement nasal séreux ou purulent, un raccourcissement et une torsion du groin, une atrophie osseuse des cornets nasaux et une baisse de croissance. *Bordetella bronchiseptica* est à l'origine d'une rhinite atrophique modérée réversible ne conduisant pas à un retard de croissance (10, 11). Les formes les plus sévères sont causées par les souches rhinopathogènes de *Pasteurella multocida* appartenant aux sérogroupes A et D entraînant une rhinite atrophique irréversible et s'accompagnant de retards de croissance. Les troubles proviennent d'une toxine synthétisée par les souches rhinopathogènes de *Pasteurella multocida*. Cette toxine provoque une résorption osseuse par activation des ostéoclastes (Figure 2). L'infection naturelle par une souche toxigène conduit à une réponse immunitaire faible tandis que l'administration parentérale de toxine ou de toxine détoxifiée par le formol permet d'obtenir une bonne réponse immunitaire (4, 13). Plusieurs types de vaccins ont été développés au cours des 15 dernières années. Ces vaccins sont destinés aux truies qui transmettent la protection aux porcelets par l'intermédiaire du colostrum.

B) *Pasteurella multocida*

Le genre *Pasteurella* fait partie de la famille des Pasteurellaceae. Les Pasteurelles sont des bacilles ou des coco-bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobie, chimio organotrophe, possédant l'oxydase et la catalase. Les souches de *Pasteurella multocida* sont divisées en 5 sérogroupes (A, B, D, E et F) en fonction de leurs antigènes capsulaires (identifiés par hémagglutination passive) et en 16 sérovars en fonction de leurs antigènes thermostables (identifiés par immunodiffusion en

gel). Les divers sérogroupes ont un habitat et un pouvoir pathogène différents. *Pasteurella multocida* est l'espèce de Pasteurelle la plus importante en médecine vétérinaire. Cette espèce peut être parasite ou saprophyte des muqueuses respiratoires ou digestives de diverses espèces animales, le pouvoir pathogène s'exprimant généralement à la suite d'un stress. Les espèces parasites peuvent ainsi induire de nombreuses pathologies telles que le choléra aviaire, la rhinite atrophique (porcs, lapins, petits ruminants), la septicémie hémorragique des bovidés... C'est pourquoi, il est important de diagnostiquer la présence de la souche dans les élevages.

C) Diagnostic de la rhinite atrophique

Pasteurella multocida étant à la fois une souche parasite et une souche commensale des muqueuses respiratoires ou digestives de diverses espèces, il est important de distinguer les souches toxigènes des souches non toxigènes dans le but de diagnostiquer le plus tôt possible la maladie. Le diagnostic définitif de la rhinite atrophique nécessite d'isoler et de caractériser une souche toxigène de *Pasteurella multocida*. Celle-ci colonise préférentiellement les amygdales et les cavités nasales des animaux. Ainsi, le prélèvement est souvent constitué par un écouvillonnage de la partie postérieure des cavités nasales ou un raclage d'amygdales. Aucun caractère morphologique ou phénotypique ne permet de différencier les souches toxigènes des souches non toxigènes.

Habituellement, la détection de la toxine dermonécrotique de *Pasteurella multocida* se fait par test de létalité sur des souris après injection intrapéritonéale, test de cytotoxicité ou encore par test cutané sur cobaye. En 1992, une étude a été réalisée dans le but de développer une technique de détection des Anticorps dirigés contre la toxine de *Pasteurella multocida* par technique ELISA (1, 2). Cette étude a montré qu'en comparaison avec le test de létalité et le test de cytotoxicité, la technique ELISA de type sandwich est plus sensible, plus spécifique et plus simple à mettre en œuvre avec la capacité de réaliser plusieurs essais simultanément.

En 1994, une étude a été réalisée dans le but de différencier *Pasteurella multocida* toxigènes des souches non toxigènes par PCR (8). Cette PCR est basée sur le gène codant pour la toxine dermonécrotique considérée comme étant le facteur entraînant la rhinite atrophique. Les résultats de cette étude ont été comparés à ceux obtenus avec un test cutané sur cobaye et un Western Blot. La PCR a ainsi montré de nombreux avantages : elle est plus sensible, plus spécifique avec un protocole simple et rapide. La PCR reste aujourd'hui la technique la plus sensible et donc la plus utilisée pour le diagnostic de la rhinite atrophique.

En 2010, le laboratoire Labofarm a mis en place un protocole de PCR pour la détection de *Pasteurella multocida* dermonécrotique. Depuis cette étude, des recherches de la souche toxino-gène ont été effectuées pour les élevages présentant des symptômes de la maladie. Malgré la présence de nombreux signes cliniques, la présence du germe *Pasteurella multocida* dermonécrotique n'a été mise en évidence que dans une faible proportion des élevages testés. Un seuil de sensibilité de cette PCR trop élevé par rapport à la quantité de germes présents pourrait être l'explication de l'absence de détection dans des élevages suspects. C'est pourquoi, Labofarm a souhaité tester sa PCR en comparaison avec deux autres kits de PCR mis sur le marché par des fournisseurs spécialisés, pour comparer le seuil de détection entre chaque protocole et tester chaque kit dans un élevage présentant des signes de la maladie. L'étude se porte donc sur l'évaluation de la sensibilité des 3 PCR. L'aptitude des PCR à détecter le gène codant pour le gène ToxA est notamment évaluée en présence d'une flore contaminante telle qu'elle peut être observée dans l'écosystème nasal du porc.



Figure 3 : Réalisation des échantillons terrains : écouvillons de nez (gauche) et raclages d'amygdales (droite)

Matériel et méthode

I – Nature des échantillons

A) Souche de *Pasteurella multocida*

La souche de *Pasteurella multocida* dermonécrotique utilisée dans cette étude est une souche CIP (Collection de l'Institut Pasteur) 103825 conservée par le laboratoire en souchothèque (-80°C). Elle se trouve sous forme de bouillon.

B) Écouvillons de nez réalisés sur porcs sains

Les écouvillons de nez ont été réalisés au laboratoire Labofarm dans le service autopsie par écouvillonnage de la partie postérieure de la cavité nasale de groins de porcs ne présentant pas de symptômes de la rhinite atrophique. Ils ont ensuite été conservés au congélateur jusqu'au démarrage de l'étude.

C) Écouvillons de nez réalisés sur des porcs présentant des signes cliniques

Les écouvillons de nez ont été réalisés dans deux élevages (élevages A et B) présentant les symptômes de la rhinite atrophique par écouvillonnage de la partie postérieure de la cavité nasale de groins de porcs (Figure 3). Les écouvillons sont placés en gaine charbon pour leur transport et leur conservation à 4°C.

D) Raclages d'amygdales réalisés sur porcs sains

Les raclages d'amygdales ont été réalisés dans deux élevages (élevages A et B) présentant les symptômes de la rhinite atrophique par grattage du fond de la gorge à l'aide d'une cuillère (Figure 3). Pour faciliter le prélèvement, un pas d'âne est utilisé pour maintenir la bouche de l'animal ouverte.

II – Culture de *Pasteurella multocida* dermonécrotique

A) Culture sur milieu gélosé

1- Souche CIP

Une pipette Pasteur est plongée dans le bouillon de culture de la souche CIP 103825. La culture de *Pasteurella multocida* toxinogène est réalisée par isolement sur gélose au sang incubée 24 heures à 37°C.

2- Ensemencement par inondation

A l'aide d'une pipette graduée, 0,1 mL de bouillon de culture sont déposés sur la gélose au sang. L'étalement est ensuite réalisé à l'aide d'un râteau sur la totalité de la surface de la gélose.

3- Ensemencement à partir d'un écouvillon

L'ensemencement est réalisé en roulant l'écouvillon sur 1/8^{ème} de la surface de la gélose au sang, puis en striant à l'aide d'une pipette Pasteur en appliquant la méthode des quadrans.

B) Culture en bouillon

A partir d'une colonie prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur sur gélose au sang, un bouillon de culture cœur-cervelle est ensemencé puis incubé à 37°C pendant 24 heures.

C) Collecte des colonies

Pour récupérer les colonies présentes sur la gélose au sang ensemencée à partir d'écouvillons de nez, un raclage de boîte est réalisé. Un mL d'eau physiologique est déposé sur la gélose puis les colonies présentes sont raclées à l'aide d'un râteau. Le surnageant est prélevé à l'aide d'une pipette. On obtient alors une suspension dense de colonies

III – Dénombrement du bouillon de culture

Des dilutions en cascade de raison 10 du bouillon de culture sont réalisées en eau physiologique jusqu'à la dilution 10⁻⁹. Le dénombrement est ensuite réalisé par la technique d'inondation de la gélose au sang en double essai. Après incubation du milieu de culture, les colonies sont dénombrées pour chaque dilution.

IV- Inoculation expérimentale des échantillons par *Pasteurella multocida* dermonécrotique

A) Inoculation de la suspension cellulaire issue des raclages de boîtes

180 µL de la suspension cellulaire obtenue après raclage des boîtes ensemencées avec des écouvillons de porcs sains sont additionnés de 20 µL de suspensions de *Pasteurella multocida* provenant des dilutions du bouillon de culture de la souche CIP 103825.

B) Inoculation de la suspension cellulaire issue des écouvillons réalisés sur porcs sains

Les écouvillons de nez sont regroupés par pool de 3. L'extrémité en coton des écouvillons est alors coupée dans 1 mL d'eau physiologique, puis vortexé 10 secondes. On obtient alors une suspension cellulaire. 180 µL de cette suspension sont alors additionnés de 20 µL de suspension de *Pasteurella multocida* provenant des dilutions du bouillon de culture de la souche CIP 103825.

C) Inoculation directe d'écouvillons stériles

A partir de la suspension cellulaire obtenue en **B)**, 40 µL de cette suspension sont prélevés. 10 µL de suspensions de *Pasteurella multocida* provenant des dilutions du bouillon de culture de la souche CIP sont additionnés au 40µL. Ces 50 µL sont ensuite déposés sur un écouvillon stérile. On obtient ainsi des écouvillons contenant à la fois la flore nasale de porcs et *Pasteurella multocida* dermonécrotique. Une partie des écouvillons est stockée à -20°C pendant 5 jours tandis que l'autre moitié est analysée immédiatement.

V – Extraction de l'ADN

A) A partir de cultures bactériennes

Pour extraire l'ADN des cultures bactériennes, une lyse thermique est réalisée par chauffage de 500 µL de cultures dans un tube Eppendorf à 90°C pendant 10 minutes.

B) A partir des écouvillons

Les écouvillons sont regroupés par pool de 3. Les extrémités en coton sont coupées dans des tubes à hémolyse contenant 1 mL d'eau physiologique. Les tubes sont vortexés 10 secondes. On

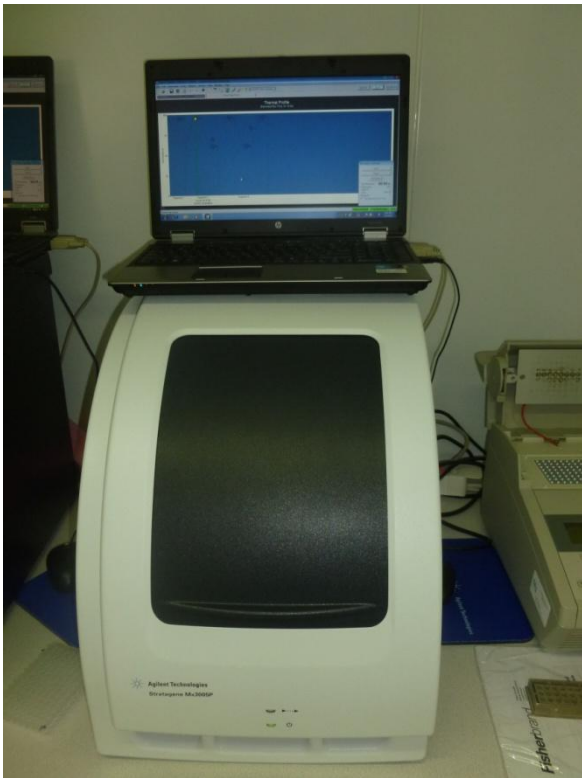


Figure 4 : Thermocycleur Stratage Mx 3005P (gauche) et Thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (droite)

obtient alors une suspension cellulaire. L'extraction de l'ADN se fait ensuite à l'aide du kit QiAmp DNA (cf : Annexe 1) à partir de 200 µL de suspension cellulaire.

VI – PCR

Les 3 PCR comparées dans cette étude présentent des protocoles différents tant pour la composition des mélanges d'amplification que pour le cycle utilisé (cf : Annexe 2, 3 et 4).

Deux d'entre elles correspondent à des kits commerciaux kit Bactotype de LDL (PCR classique) et kit Taqvet de LSI (PCR en temps réel) et la troisième correspond à la PCR mise en place par le laboratoire Labofarm (PCR interne).

Le thermocycleur Stratage Mx 3005P est utilisé pour la PCR en temps réel tandis que les 2 autres PCR classiques sont réalisées sur le thermocycleur GeneAmp PCR System 9700 (Figure 4).

VII - Amplification du contrôle interne

Le contrôle interne a pour but de valider les manipulations réalisées avant d'arriver au résultat. Il s'agit ici d'un mix d'amplification commercial prêt à l'emploi pour PCR en temps réel.

Le mix réalisé pour ce contrôle interne est composé de la façon suivante :

- Amorces β (Amorces 7,5 µM ; Sonde 2,5 µM): 1 µL
- Master mix Eurogentec : 12,5 µL
- Eau QSP 25 : 9,5 µL
- Solution d'ADN : 2 µL

DILUTIONS	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
Boîte 1	5 UFC	0 UFC	0 UFC
Boîte 2	8 UFC	0 UFC	0 UFC

Tableau 1 : Dénombrement du bouillon de culture de *Pasteurella multocida* dermonécrotique

DILUTIONS	q PCR kit LSI: 5µL	PCR interne: 2 µL	Bactotype PCR : 2,5 µL
10^{-1}	3,25. 10^5 UFC	1,3. 10^5 UFC	1,6. 10^5 UFC
10^{-2}	3,25. 10^4 UFC	1,3. 10^4 UFC	1,6. 10^4 UFC
10^{-3}	3,25. 10^3 UFC	1,3. 10^3 UFC	1,6. 10^3 UFC
10^{-4}	325 UFC	130 UFC	165 UFC
10^{-5}	32,5 UFC	13 UFC	16,5 UFC
10^{-6}	3,25 UFC	1,3 UFC	1,65 UFC
10^{-7}	0,325 UFC	0,13 UFC	0,165 UFC

Tableau 2 : Concentrations en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans les volumes d'ADN utilisés pour chaque PCR avec la souche pure

	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
PCR Temps réel	28,57 Ct	31,85 Ct	36,73 Ct	No Ct
PCR interne	+	+	-	-
PCR kit	+	+	+	-

+ : Présence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (bande d'amplification)

- : Absence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (absence de bande d'amplification)

Tableau 3 : Résultats de la détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'une souche pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique

DILUTIONS	OBSERVATION	RESULTAT
$5. 10^{-6}$	Bande d'amplification de faible intensité	+
	Bande d'amplification de faible intensité	+
	Bande d'amplification de faible intensité	+
$2,5. 10^{-6}$	Bande d'amplification de très faible intensité	+
	Bande d'amplification de très faible intensité	+
	Absence de bande d'amplification	-
$1,25. 10^{-6}$	Absence de bande d'amplification	-
	Absence de bande d'amplification	-
	Absence de bande d'amplification	-

+ : Présence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (bande d'amplification)

- : Absence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (absence de bande d'amplification)

Tableau 4 : Résultats de la détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'une souche pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique

Résultats

I – Comparaison de la sensibilité des 3 PCR pour la détection du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida*

Le but de cette analyse est de comparer la sensibilité de 3 PCR différentes pour la détection du gène ToxA. La sensibilité est dans un premier temps déterminée sur une souche pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique ; dans un second temps, elle est évaluée sur la souche de *Pasteurella multocida* dermonécrotique inoculée à une suspension cellulaire de flore nasale.

A) Détermination de la concentration en *Pasteurella multocida* dermonécrotique du bouillon de culture

Les résultats du dénombrement (cf: Tableau 1) nous permettent de connaître la concentration initiale en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans le bouillon de culture après 24 heures à 37°C. La concentration est évaluée à $6,5 \cdot 10^8$ UFC/mL.

B) Détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'une souche pure de *Pasteurella multocida*

A partir de la concentration du bouillon de culture, on estime la concentration des dilutions réalisées (cf Tableau 2). Le seuil théorique de sensibilité est estimé à un organisme par volume d'ADN chargé pour la PCR. On désire tester les dilutions encadrant ce seuil théorique. D'après les calculs réalisés, on choisit de traiter les dilutions 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} .

Les résultats obtenus pour chaque PCR sont regroupés dans le Tableau 3. La PCR LSI et la PCR LDL permettent toutes les deux une amplification jusqu'à la dilution 10^{-6} correspondant à 0,65 UFC/ μ L de lysat cellulaire. Cependant, la PCR interne ne permet une amplification que jusqu'à la dilution 10^{-5} correspondant à 6,5 UFC/ μ L. Pour confirmer cette différence de seuil entre la PCR interne et les 2 autres PCR, 8 répétitions de la dilution 10^{-6} sont évaluées. Sur les 8 résultats obtenus, le gène ToxA n'est amplifié qu'une seule fois. A cette dilution, la PCR est assez peu répétable. C'est pourquoi, afin d'affiner la limite de détection de la PCR interne, des dilutions intermédiaires entre 10^{-5} et 10^{-6} sont amplifiées : des dilutions au 1/2, 1/4 et 1/8 de la dilution 10^{-5} sont réalisées en eau physiologique. Le tableau 4 met en évidence l'aptitude de la PCR à détecter le gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida* jusqu'à la dilution $2,5 \cdot 10^{-6}$. Cependant, la

DILUTIONS	q PCR kit LSI: 5µL	PCR interne: 2 µL	Bactotype PCR : 2,5 µL
10^{-1}	3,25. 10^4 UFC	1,3. 10^4 UFC	1,6. 10^4 UFC
10^{-2}	3,25. 10^3 UFC	1,3. 10^3 UFC	1,6. 10^3 UFC
10^{-3}	325 UFC	130 UFC	165 UFC
10^{-4}	32,5 UFC	13 UFC	16,5 UFC
10^{-5}	3,25 UFC	1,3 UFC	1,65 UFC
10^{-6}	0,325 UFC	0,13 UFC	0,165 UFC

Tableau 5 : Concentrations en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans les volumes d'ADN utilisés pour chaque PCR avec les écouvillons de nez

DILUTIONS	PCR Temps réel	PCR interne	PCR Kit
10^{-3}	29,91 Ct	+	-
	30,25 Ct	+	-
	30,17 Ct	+	-
10^{-4}	33,31 Ct	+	-
	33,05 Ct	+	-
	33,09 Ct	+	-
10^{-5}	36,14 Ct	+	-
	35,35 Ct	+	-
	35,62 Ct	+	-
10^{-6}	No Ct	-	-
	No Ct	-	-
	No Ct	-	-

+ : Présence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (bande d'amplification)

- : Absence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (absence de bande d'amplification)

Tableau 6 : Résultats de la mesure de la sensibilité des 3 PCR à partir des écouvillons de nez

faible répétabilité des résultats ainsi que la faible intensité des bandes obtenues ne permettent pas de définir cette dilution comme seuil de sensibilité. Le seuil de détection est donc défini pour la dilution $5 \cdot 10^{-6}$ correspondant à 3,25 UFC/ μ L de lysat bactérien.

C) Détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir d'écouvillons de nez

Les écouvillons de nez réalisés sur des porcs ne présentant pas de signes cliniques de la rhinite atrophique sont inoculés avec les dilutions encadrant le seuil théorique de détection du gène ToxA. Les concentrations en *Pasteurella multocida* pour chaque dilution ne sont pas les mêmes que pour l'étude précédente car il y a une dilution au 1/10 supplémentaire (20 μ L dans 180 μ L). Ces dernières sont alors ré estimées (cf : Tableau 5). Ces résultats nous permettent d'identifier les dilutions à tester : 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} .

Les résultats obtenus pour chaque PCR sont regroupés dans le Tableau 6. La PCR LSI et la PCR interne permettent toutes les deux la détection de *Pasteurella multocida* dermonécrotique jusqu'à la dilution 10^{-5} correspondant à une concentration de 0,65 UFC/ μ L d'ADN. La PCR LDL ne permet pas de rendre des résultats interprétables puisque tous les résultats sortent négatifs (absence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique) même le témoin positif. Les essais ont été réalisés une deuxième fois mais les mêmes résultats sont ressortis. Par manque de réactifs, les essais n'ont pas pu être réalisés une autre fois, on n'a donc pas de résultats pour cette PCR.

D) Détermination de la sensibilité des 3 PCR à partir de raclages de boîtes

Des suspensions issues de raclages de boîtes sont inoculées avec les dilutions encadrant le seuil théorique de détection du gène ToxA. Les dilutions de *Pasteurella multocida* utilisées sont les mêmes que pour les écouvillons de nez (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6}).

Les résultats obtenus dans cette analyse sont similaires à ceux obtenus avec les écouvillons de nez. La PCR LDL ne donne toujours pas de résultats interprétables, cependant, comme précédemment, la PCR interne et la PCR LSI permettent toutes les deux une amplification jusqu'à la dilution 10^{-5} correspondant à une concentration en *Pasteurella multocida* toxigène de 0,65 UFC/ μ L d'ADN.

Elevages	Prélèvements	Individus	Nombre d'échantillons	Résultats PCR interne	Résultats Contrôle interne
Elevage A	Raclages d'amygdales	Porcelets 10 semaines	7	-	✓
		Porcs 13 semaines	7	-	✓
		Porcs 16 semaines	7	-	✓
	Ecouvillons nasaux	Porcelets 10 semaines	7	-	✓
		Porcs 13 semaines	7	-	✓
		Porcs 16 semaines	7	-	✓
Elevage B	Raclages d'amygdales	Porcelets 10 semaines	7	-	✓
		Porcs 13 semaines	7	-	✓
		Porcs 16 semaines	7	-	✓
	Ecouvillons nasaux	Porcelets 10 semaines	7	-	✓
		Porcs 13 semaines	7	-	✓
		Porcs 16 semaines	7	-	✓

+ : Présence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (bande d'amplification)

- : Absence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (absence de bande d'amplification)

✓ : Amplification du contrôle interne (Ct < 40)

X : Absence d'amplification du contrôle interne (Ct > 40)

Tableau 7 : Résultats d'amplification des échantillons terrain des élevages présentant des symptômes de la rhinite atrophique

DILUTIONS	q PCR kit LSI: 5µL	PCR interne: 2 µL
10 ⁻¹	3,25. 10 ³ UFC	1,3. 10 ³ UFC
10 ⁻²	325 UFC	130 UFC
10 ⁻³	32,5 UFC	13 UFC
10 ⁻⁴	3,25 UFC	1,3 UFC
10 ⁻⁵	0,325 UFC	0,13 UFC

Tableau 8 : Concentrations en *Pasteurella multocida* dermonécrotique dans les volumes d'ADN utilisés pour chaque PCR dans le test de congélation

PCR	Dilutions	Avant congélation	Après congélation
PCR temps réel	10 ⁻²	32,01 Ct	32,25 Ct
	10 ⁻³	36,56 Ct	36,41 Ct
	10 ⁻⁴	38,16 Ct	38,96 Ct
	10 ⁻⁵	No Ct	No Ct
PCR interne	10 ⁻²	+	+
	10 ⁻³	+ ¹	-
	10 ⁻⁴	+ ¹	-
	10 ⁻⁵	-	-

+ : Présence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (bande d'amplification)

- : Absence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique (absence de bande d'amplification)

¹ : Bande d'amplification de très faible intensité

Tableau 9 : Résultats du test de la congélation d'écouvillons sur les résultats de PCR

II – Essais de détection du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida* sur des élevages présentant des signes cliniques de la rhinite atrophique

Des écouvillons de nez ainsi que des raclages d'amygdales sont réalisés dans deux élevages présentant des symptômes de la maladie (élevage A et élevage B). Ces échantillons sont alors testés doublement. Dans un premier temps, ils sont testés avec la PCR interne pour évaluer la présence ou l'absence du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida*. Ils sont, dans un second temps testés avec un contrôle interne. Ce contrôle interne est composé d'amorces β encadrant le gène de la β -actine. Celle-ci est un isoforme de l'actine se trouvant dans tous les tissus non musculaires. Ce contrôle interne permet ainsi de valider l'étape d'extraction en colonne. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 7. Tous les résultats sont validés par le contrôle interne. Il y a cependant absence d'amplification du gène ToxA pour la totalité des échantillons testés.

III – Test de l'effet de la congélation sur la détection du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida*

Le but de cette étude est de tester si la congélation a un impact sur la détection du gène ToxA. En effet, les échantillons ne pouvant pas toujours être testés le jour de leur arrivée, ceux-ci peuvent être conservés au congélateur. C'est pourquoi, il est important de vérifier que la congélation n'influe pas sur le résultat de PCR. Quatre dilutions de *Pasteurella multocida* en présence de la flore nasale sont inoculées sur un écouvillon stérile. Les concentrations en *Pasteurella multocida* sont estimées pour chaque PCR (cf : Tableau 8). Ces résultats permettent d'identifier les dilutions à tester : 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} .

Les résultats obtenus en PCR avant et après congélation sont rassemblés dans le Tableau 9. Avec la PCR LSI, on observe une amplification jusqu'à la dilution 10^{-4} correspondant à 0,65 UFC/ μ L d'ADN avant et après congélation. Pour chaque dilution, les valeurs de cycles seuil (Ct) obtenues sont très proches avec ou sans l'étape de congélation des écouvillons. Avec la PCR interne, on observe une amplification jusqu'à la dilution 10^{-4} correspondant à 0,65 UFC/ μ L d'ADN avant congélation. Les bandes obtenues pour les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} sont cependant de très faible intensité et assez difficiles à détecter. Après congélation, on observe une amplification uniquement à la dilution 10^{-2} correspondant à 130 UFC/ μ L d'ADN testé. Les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} sont donc testées à nouveau pour les écouvillons congelés et les écouvillons non congelés. Les résultats obtenus montrent que pour les faibles concentrations en *Pasteurella multocida*, les manipulations sont peu répétables. On obtient tout de même une bande d'amplification de la toxine de *Pasteurella multocida* pour les dilutions 10^{-3} et 10^{-4} avant et après congélation.

Discussion

La toxine de *Pasteurella multocida* dermonécrotique a été reconnue comme l'agent responsable de la rhinite atrophique chez le porc. Cependant, sa détection en PCR reste aujourd'hui un problème. Les avantages de la PCR en comparaison avec d'autres techniques sont pourtant multiples : plus hautes sensibilité et spécificité, la simplicité dans la procédure sans la nécessité de réaliser auparavant une culture cellulaire, la rapidité du test avec des résultats obtenus en 4 heures et la capacité de réaliser presque 100 essais simultanément (les thermocycleurs pouvant accueillir une plaque d'amplification de 96 puits). Nous avons pu voir dans cette étude que la PCR a été réalisée à partir de divers échantillons (colonies, écouvillons, suspensions cellulaires), ce qui montre bien que les prélèvements pour une analyse en PCR peuvent être de nature variée. L'état de la matrice à amplifier n'est alors pas une limite. En effet, la PCR amplifiant de courtes séquences d'ADN, l'amplification est réalisable sur de l'ADN partiellement dégradé.

Théoriquement, une seule copie d'ADN permet la mise en évidence de l'organisme recherché. Dans cette étude, il en est ressorti que la PCR interne permet une détection au même seuil que pour les deux autres PCR, correspondant à 0,65 UFC/ μ L de lysat cellulaire. Cependant, pour la PCR interne, les résultats ont montré une meilleure détection en présence de bactéries environnantes comparée à la culture pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique puisqu'on obtient ici un seuil de détection cinq fois inférieur. Ceci est contraire aux résultats attendus mais peut s'expliquer par une meilleure extraction de l'ADN avec les colonnes QIAGEN qu'avec la lyse thermique.

En ce qui concerne la PCR LSI, les résultats ne montrent aucune évolution de la sensibilité dans l'environnement microbien. Ceci montre donc que la flore microbienne ne se présente pas comme un inhibiteur pour la détection du gène ToxA.

De nombreuses études ont déjà été réalisées par différents auteurs concernant la détection du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida* par PCR. Ces études ont été mises en œuvre en utilisant des amorces et des cycles différents (3, 5, 7, 8, 9, 12). Il est cependant très difficile de comparer les études entre elles et avec celle menée ici au laboratoire car aucun seuil de détection n'est déterminé dans ces analyses. Aucune comparaison entre les différents protocoles ne peut être effectuée pour connaître quelles amorces et quel cycle permettent une amplification

optimale. En termes de sensibilité, il en est pourtant ressorti dans cette étude que la PCR interne n'est pas moins avantageuse que les 2 autres. Elle présente néanmoins l'inconvénient de ne pas contenir de contrôle interne, contrairement aux deux kits commerciaux. En effet, le kit LSI en PCR en temps réel contient un contrôle interne constitué d'amorces amplifiant l'ADN de cellules de porcs. Le kit LDL contient lui aussi un contrôle interne synthétique constitué d'amorces amplifiant une séquence d'ADN directement présente dans le mix réactionnel. Le contrôle interne amplifiant l'ADN de porc a pour avantage de valider toutes les étapes de manipulation : l'extraction, la préparation du mix et enfin l'amplification. Les kits commerciaux ont cependant comme inconvénient majeur leur coût élevé par rapport à la PCR interne.

Malgré les études préliminaires convaincantes concernant la détection du gène ToxA, ce dernier n'a pas été identifié dans les deux élevages présentant des symptômes de la maladie. Cette étude a permis de montrer que le problème ne vient pas de la PCR utilisée. L'absence d'amplification peut être expliquée par des prélèvements réalisés trop tardivement. En effet, il est possible que le gène codant pour la toxine ne soit présent que pendant une courte durée dans l'appareil respiratoire de l'animal. Il aurait été intéressant de tester les échantillons terrain avec le kit LSI. En raison d'une indisponibilité du kit chez le fournisseur, ceci n'a pas pu être réalisé.

Les échantillons ne pouvant pas toujours être analysés le jour même de leur arrivée, il est important de mettre en place un moyen de conservation n'ayant pas d'effets indésirables sur la détection du gène recherché. Les résultats ont montré ici qu'après 5 jours de congélation, le seuil de sensibilité reste inchangé. La congélation ne présente donc aucun impact sur la détection du gène ToxA.

Conclusion

Le but de cette étude était de comparer 3 PCR différentes pour la détection du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida* responsable de la rhinite atrophique du porc. L'absence de détection du gène codant pour cette toxine dans des élevages présentant des symptômes de la maladie mettait en cause un seuil de sensibilité trop élevé de la PCR utilisée. L'étude réalisée a néanmoins mis en évidence un seuil de détection pour la PCR interne, identique aux seuils obtenus avec les deux kits commerciaux utilisés. Les échantillons terrain réalisés dans deux élevages suspects n'ont néanmoins pas permis de mettre en évidence le gène codant pour ToxA. L'absence de détection remet alors en cause l'échantillonnage. En effet, il est possible que celui-ci ait été réalisé trop tardivement. De plus, le diagnostic de la rhinite atrophique se réalise en plusieurs étapes : l'observation des lésions en élevage qui doit ensuite être confirmé par l'abattage (examen des cornets nasaux) et enfin les analyses de laboratoire. Comme nous l'a montré cette étude, le diagnostic au laboratoire est difficile à mettre en œuvre essentiellement à cause de la forte fragilité de la Pasteurelle. En effet, l'échantillonnage requiert du matériel spécifique ainsi qu'une grande habitude du préleveur. De ce fait, il est important de bien analyser les résultats. Un diagnostic au laboratoire concluant sur la présence de *Pasteurella multocida* dermonécrotique confirme la rhinite athrophique. Cependant, l'absence de détection du germe ne permet pas de conclure en une absence de la maladie dans l'élevage, surtout en présence de signes cliniques.

Cette étude a mis en évidence la difficulté à détecter le gène codant pour la toxine dermonécrotique. Il est alors important de continuer à rechercher les facteurs influençant cette détection pour améliorer le diagnostic au laboratoire.

Références bibliographiques

- 1- **Amigot JA, Torremorel M, Pijoan C** (1998): Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *P. multocida* strains from pigs: *J Vet Diagn Invest.* 1998 Apr; 10(2): 169-73
- 2- **Bowersock TL, Hooper T, Pottenger R** (1992): Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine, *J Vet Diagn Invest.* 1992 Oct; 4(4): 419-22
- 3- **Choi C, Chae C** (2001): Enhanced Detection of Toxigenic *Pasteurella multocida* Directly from Nasal Swabs Using a Nested Polymerase Reaction, *Vet J.* 2001 Nov; 162(3): 255-8
- 4- **Jayoung Seo, Hyoju Pyo, Semi Lee, Jaeil Lee, Taejung Kim** (2009): Expression of 4 truncated fragments of *Pasteurella multocida* toxin and their immunogenicity, *Can J Vet Res.* 2009 July; 73(3): 184-189
- 5- **Kamp EM, Bokken GC, Vermeulen TM, de Jong MF, Buys HE, Reek FH, Smits MA** (1996): A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs, *J Vet Diagn Invest.* 1996 Jul; 8(3): 304-9
- 6- **Lichtensteiger CA, Steenbergen SM, Lee RM, Polson DD, Vimr ER** (1996): Direct PCR Analysis for Toxigenic *Pasteurella multocida*, *J. Clin Microbiol.* 1996 Dec; 34(12): 3035-9
- 7- **Mifflin JK, Blackall PJ** (2001): Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*, *Lett Appl Microbiol.* 2001 Sep; 33(3): 216-21
- 8- **Nagai S, Someno S, Yagihashi T** (1994): Differentiation of Toxigenic from Nontoxigenic Isolates of *Pasteurella multocida* by PCR, *J. clin Microbiol.* 1994 Apr; 32(4): 1004-10
- 9- **P. Saltran, M Bartos, K Nedbalcova, I Rychlik, L Konstantinova, L Ulmann** (1999): Identification of toxigenic strains of *Pasteurella multocida* by PCR and biological methods, *Vet. Med – CZECH*, 44, 1999 (9): 275-278
- 10- **RM Roop, 2nd, HP Veit, RJ Sinsky, SP Veit, EL Hewlett, ET Korneguy** (1987): Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and Pneumonia in experimentally infected neonatal swine, *Infect Immun.* 1987 January; 55(1): 217-222
- 11- **Susan L. Brockmeier, Karen B. Register, Tibor Magyal, Alistair J. Lax, Gillian D. Pullinger, Robert A. Kunkle** (2002): Role of the Dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the Pathogenesis of Respiratory Disease in swine, *Infect Immun.* 2002 Feb; 70(2): 481-90

12- Townsend KM, Hangh TX, O'Boyle D, Wilkie I, Phan TT, Wijewardana TG, Trung NT, Frost AJ (2000): PCR detection and analysis of *Pasteurella multocida* from the tonsils of slaughtered pigs in Vietnam, *Vet Microbiol.* 2000 Mar; 1;72(1-2): 69-78

13- Xibiao Tang, Zhangin Zhao, Junyong Hu, Bin Wu, Xuwang Cai, Qigai He, Huanchun Chen (2009): Isolation, Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from swine in China, *J. Clin Microbiol.* 2009 April; 47(4): 951-958

Sommaire des annexes

ANNEXE 1 : Protocole de la PCR interne

ANNEXE 2 : Protocole de la PCR LDL

ANNEXE 3 : Protocole de la PCR LSI

*ANNEXE 4 : Protocole d'extraction de l'ADN en colonne **QIAGEN***

Annexe 1 : Protocole de la PCR interne

Amorces utilisées : Amorces de Kamp

- Kamp For : GGT CAG ATG ATG CTA GAT ACT CC
- Kamp Rev: CCA AAC AGG GTT ATA TTC TGG AC

Réactifs	Volumes
Amorce Kamp F	1 µL
Amorce Kamp R	1 µL
dNTP	1 µL
Tampon	5 µL
MgCl ₂	4 µL
Eau Distillée	35,6 µL
Taq Polymérase	0,4 µL
ADN	2 µL

Cycle d'amplification:

94°C – 5 minutes

94°C – 30 secondes

56°C – 30 secondes

72°C – 45 secondes

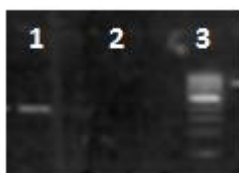
72°C – 10 minutes

} 40 cycles

Les fragments de PCR sont analysés en gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium.
Mettre 16 µL de produit de PCR par puits dans le gel.

Interprétation des résultats :

- Résultat positif : Le fragment de toxine amplifié par PCR montre une bande de 300 pb.
- Résultat négatif : Absence de bande d'amplification.
- Les résultats sont validés par le témoin positif qui doit présenter une bande de 300 pb et le témoin négatif ne présentant pas de bande.



1 : Bande d'amplification à 300 paires de bases : test positif

2 : Absence de bande d'amplification : test négatif

3 : Marqueur de taille

Annexe 2 : Protocole de la PCR LDL

Protocol

Preparation of the reagents: Before using the reagents of the test kit the first time, mix thoroughly and centrifuge the reagents for 5 sec at 3000 rpm. The blue colour in the magnesium chloride solution arises from the gel loading buffer and does not affect the PCR reaction. Please, avoid elongated centrifugation steps of the magnesium chloride solution. The gel loading buffer could be concentrated onto the bottom of the tube.

1. A) PCR Protocol for a Number of Samples different from the Packaging Unit (Multiplier)

If there are less samples than the packaging unit, pipette as followed into a PCR reaction tube (also see pipetting scheme table 1):

17.0 μ L PCR Mix
+ 4.5 μ L Magnesium Chloride
+ 0.6 μ L Nuclease-free Water
+ 0.4 μ L Taq DNA Polymerase (here: JumpStart™ 2.5 U/ μ L)

- Pipet 22.5 μ L of the master mix into a PCR reaction tube and add 2.5 μ L of your DNA sample or control.
- **Attention:** Depending on the used Taq Polymerase, complete with Nuclease-free Water to a total volume of 25 μ L per reaction.

2. Positive Control

The test kit is provided with a ready-to-use Positive Control (red cap) of non-infectious DNA with germ-specific sequences. We strongly recommend performing a positive control for each run.

3. Negative Control

It is strongly recommended to perform a negative control (e. g. Nuclease-free Water) for each run.

PCR Amplification Parameters

We strongly recommend the use of Sigma JumpStart™ Taq DNA Polymerase.

Temperature	Time	
94°C	3 min	Hot Start*
94°C	30 s	
60°C	30 s	35 Cycles
RAMPING 1°C/s**		
72°C	30 s	
72°C	5 min	
10°C	∞	hold

* For "hot start" Polymerase, please follow the activation time conditions specified by the manufacturer (for JumpStart™ Taq DNA Polymerase: 3 minutes).

** The value is adjusted for most of the thermocyclers. Cyclers that exceed the ramping rate should be monitored and corrected as required.

4. Electrophoresis

PCR fragments are analysed on a 2% agarose gel and staining is done with ethidium bromide (0.5-1.0 μ g/mL) in TAE buffer.

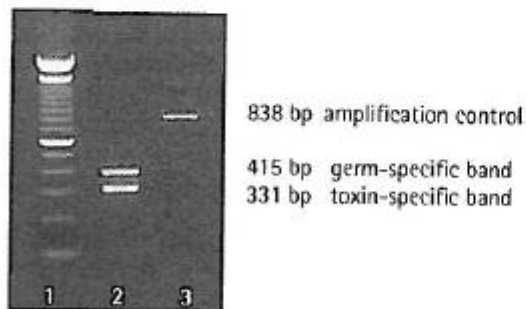
Put 10 μ L of the PCR product per lane onto the gel (gel loading buffer already included). In order to compare the molecular size of the amplification products a size standard (100 bp DNA ladder) is recommended. Run the electrophoresis as described in the manufacturer's handbook.

5. Analysis and Interpretation of the Results

Size designation of the PCR fragments is done by comparison with the DNA size standard on a transilluminator. Photographic documentation is recommended.

Protect eyes and skin against UV-radiation!

- Positive result:** *P. multocida* strains encoding *toxA* show a toxin-specific band at 331 bp in addition to the germ-specific band at 415 bp. If the strain does not encode ToxA, only the germ-specific band at 415 bp can be detected. The 838 bp (amplification control) band may be weak or may not appear at all due to low concentrations of bacterial DNA, whereas the germ-specific band is clearly visible at all. In this case the test is valid. The result is positive.
- Negative result:** If the 838 bp band (amplification control) appears only, germ detection is considered to be negative.
- Invalid result:** If none of the bands mentioned above are detectable, the assay is invalid and has to be repeated. Possibly, the PCR has been inhibited.



Lane 1: 100 bp DNA ladder (Invitrogen)

Lane 2: germ-specific (415 bp) and toxin-specific band (331 bp); sample is positive

Lane 3: only the amplification control is visible (838 bp); sample is negative

Annexe 3 : Protocole de la PCR LSI

1. Prendre une plaque MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate avec un Adhesive Cover et créer le plan de plaque (Logiciel Abiprism SDS) :
 - a. Dans tous les puits, utiliser le détecteur **Fam** pour la détection de la **PMT** et le détecteur **Vic** pour la détection de l'**IPC**.
 - b. Réaliser le plan de plaque suivant :

	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT	Mix PMT
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EPC PMT											
B	NCS											
C	NC											
D	Ech1											
E	Ech2											
F	Ech3											
G												
H												

2. Déposer **20 µL de Mix « PMT »** dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - a. **EPC** : Déposer **5 µL d'ADN**
 - b. **Echantillons et NCS** : Déposer **5 µL d'échantillon ou de NCS** (ADN extrait) dans toutes les cupules de la plaque qui seront utilisées pour l'essai.
 - c. **NC** : Déposer **25 µL de Mix « PMT »** dans la cupule réservée au NC.
3. Couvrir la plaque avec un Adhesive Cover et Placer la Plaque MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate dans l'Abiprism 7000 et lancer l'amplification selon le programme suivant :

Etape 1 : 50°C – 2 minutes – Répétition : 1

Etape 2 : 95°C – 10 minutes – Répétition : 1

Etape 3 : 95°C – 15 secondes puis 60°C – 1 minute – Répétitions : 45

Interprétation des résultats

Interprétation	« Detector » <i>PMT</i>	« Detector » IPC
Positif <i>Pasteurella multocida</i>	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Négatif <i>Pasteurella multocida</i>	Ct > 45	Ct < 45
Non validé (a)	Ct > 45	Ct > 45

(a): l'échantillon sera rendu **non validé** (ou à contrôler) en raison de la négativité de l'IPC.

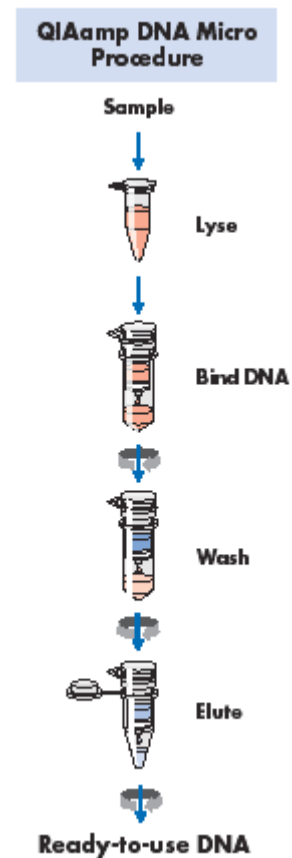
Conduite à tenir pour les échantillons invalidés :

En cas de présence d'inhibiteurs (IPC négatif) **diluer une partie de l'ADN au 1/10** (par exemple 10 µL d'ADN dans 90 µL d'eau) et recommencer la PCR.

En cas de présence importante et fréquente d'inhibiteurs, vous pouvez diluer systématiquement vos ADN au 1/10.

Annexe 4 : Protocole d'extraction de l'ADN en colonne QIAGEN

- 180 μ L ATL + 20 μ L PK
- X μ L d'échantillon suivant la matrice
- Vortexer
- Incuber à 56°C : 20 minutes
- Centrifuger quelques secondes
- Ajouter 200 μ L de AL
- Vortexer
- Incuber à 70°C : 10 minutes
- Centrifuger quelques secondes
- Ajouter 210 μ L d'éthanol purifié
- Vortexer
- Centrifuger quelques secondes
- Déposer le surnageant sur la colonne
- Centrifuger 1 minute à 10000 tr
- Ajouter 500 μ L d'AW1
- Centrifuger 1 minute à 10000 tr
- Ajouter 500 μ L d'AW2
- Centrifuger 3 minutes à 14000 tr
- Ajouter 200 μ L de AE
- Laisser incuber 5 minutes à température ambiante
- Centrifuger 2 minutes à 12000 tr



Résumé

La rhinite atrophique est une maladie infectieuse du porc entraînant une atrophie des cornets nasaux, une déviation latérale du groin ainsi que des retards de croissance. *Pasteurella multocida* toxinogène a été reconnue responsable de la maladie. Ces lésions provoquent alors des répercussions générales essentiellement économiques pour les élevages. C'est pourquoi, il est important de diagnostiquer rapidement la maladie. Le diagnostic de la rhinite atrophique se déroule en plusieurs étapes : l'examen clinique, le contrôle à l'abattoir et enfin l'examen de laboratoire. Le laboratoire Labofarm a donc mis en place en 2010 une PCR pour la détection du gène codant pour la toxine de *Pasteurella multocida*. Les recherches effectuées sur des élevages présentant des signes cliniques n'ont cependant pas mené à la détection de la toxine. Un seuil de sensibilité de cette PCR trop élevé par rapport à la quantité de germes présents pourrait être l'explication de l'absence de détection dans les élevages suspects. C'est pourquoi, Labofarm a souhaité tester cette PCR en comparaison avec 2 autres kits de PCR commerciaux (un kit en PCR classique et un kit en PCR en temps réel) pour comparer le seuil de détection entre chaque protocole et tester ces kits dans des élevages présentant des signes cliniques de la maladie. Dans cette étude, la sensibilité est dans un premier temps déterminée sur une souche pure de *Pasteurella multocida* dermonécrotique puis, dans un second temps, elle est évaluée en présence de la flore nasale. Il en est ressorti que cette PCR permet une détection au même seuil que les deux autres kits. De plus, ce seuil ne varie pas en présence de la flore nasale. Les échantillons terrain réalisés dans deux élevages suspects n'ont néanmoins pas permis de mettre en évidence le gène codant pour ToxA. L'absence de détection remet donc en cause l'échantillonnage puisque les études réalisées antérieurement ont bien montré la capacité des PCR à détecter ce gène. Un test de conservation des échantillons a donc été réalisé pour vérifier que la congélation de ces derniers n'influe pas sur la détection du gène. Les résultats ont montré qu'après 5 jours de congélation, le seuil de sensibilité reste inchangé. La congélation ne présente donc aucun impact sur la détection du gène ToxA.

Les facteurs influençant l'amplification du gène codant pour la toxine n'ont pas pu être mis en évidence dans cette étude, c'est pourquoi, les recherches sont toujours en cours actuellement.

MOTS CLEFS : Rhinite atrophique, Porc, *Pasteurella multocida* dermonécrotique, PCR, seuil de détection