

LA PCR EN TEMPS REEL : UN OUTIL POUR L'AMELIORATION DU CONTRÔLE DES MYCOPLASMOSES

Les mycoplasmes aviaires : limites des méthodes courantes de diagnostic

Les mycoplasmoses à *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* ou *M. iowae* sont des maladies largement répandues qui affectent la production de volailles dans le monde entier. Les entreprises de sélection ont réalisé des efforts considérables pour éradiquer les mycoplasmes des parquets de volailles à l'étage des troupeaux « grand-parentaux ». Cependant, le contrôle de la contamination des troupeaux de reproduction et de production reste un problème délicat dans certains pays.

Les principaux outils de laboratoire utilisés pour le dépistage des mycoplasmes sont l'isolement bactérien et la sérologie. La culture est longue et délicate et facilement sujette aux contaminations par des bactéries ou des levures dont la croissance est plus rapide que celle des mycoplasmes. Le test le plus utilisé par les laboratoires est le test sérologique d'agglutination rapide sur lame. Cette technique, bien que très rapide et peu coûteuse manque parfois de spécificité, spécialement au moment des vaccins inactivés.

Dans un but d'amélioration du dépistage, le laboratoire Labofarm a développé l'utilisation des méthodes moléculaires pour le dépistage des mycoplasmes aviaires.

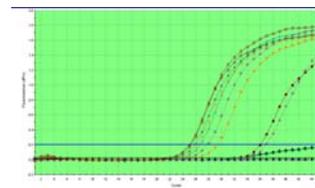
Le test PCR pour le dépistage des mycoplasmes aviaires

La technique la plus diffusée dans les laboratoires aujourd'hui est la PCR en temps réel. Cette technique permet, par l'amplification d'un gène spécifique de chacun des mycoplasmes, de mettre en évidence la présence de ces bactéries dans un échantillon. C'est une technique très sensible qui permet de détecter, en théorie, une copie du gène dans l'échantillon. D'autre part, la fluorescence émise lors de l'amplification permet d'apprécier de façon approximative la quantité initiale de mycoplasmes dans l'échantillon.



La spécificité du test est vérifiée par le fait qu'aucune amplification n'est obtenue en présence d'autres mycoplasmes ou bactéries fréquemment rencontrés chez les volailles. Ceci permet également de garantir la possibilité de mise en évidence des mycoplasmes en présence d'une flore contaminante importante.

De plus, du fait de la rapidité d'obtention du résultat, cet outil est tout à fait adapté au management des unités de production de volailles. En effet, la totalité du processus peut être réalisée en 6 heures : pratiquement, pour tout échantillon reçu au laboratoire avant 10H30, le résultat est disponible à partir de 17H30.



Echantillon et taille de l'échantillon

Comme pour tout test de diagnostic, l'échantillon soumis au laboratoire doit être représentatif du lot de volailles et de la pathologie observée, et doit donc de ce fait est susceptible de contenir l'agent pathogène. L'échantillon le plus simple à réaliser est l'écouvillon trachéal. Il est préférable d'utiliser des écouvillons en coton avec une tige plastique. Pour réaliser le prélèvement, l'écouvillon est introduit dans la trachée de l'animal et un mouvement de va et vient est répété 2 ou 3 fois afin de s'assurer de collecter un maximum de cellules trachéales et/ou de mucus. L'écouvillon est ensuite conservé dans une gaine contenant un milieu Amies au charbon s'il ne peut être transmis directement au laboratoire, et conservé à une température inférieure à 10°C pour éviter toute lyse cellulaire et toute dégradation de l'ADN. Selon notre expérience, un échantillon peut être conservé jusqu'à 5 jours dans ces conditions sans risque de donner un résultat faussement négatif. Des écouvillons de sacs aériens, réalisés lors de l'autopsie sont aussi de bons candidats pour la PCR mycoplasmes ; il est également possible d'analyser par PCR des chiffonnettes permettant ainsi la mise en évidence d'une contamination mycoplasmique dans l'environnement des élevages avicoles.

Le nombre d'échantillons à réaliser dépend de 3 facteurs : la prévalence de la maladie sur le lot de volailles devant être testé, l'effectif total et le niveau de confiance souhaité dans le résultat. Il est déterminé par une formule statistique qui, par ailleurs, est applicable à tout test diagnostic.



Pratiquement, la taille de l'échantillon va dépendre de l'état sanitaire du lot de volailles : dans le cas d'une suspicion de mycoplasme, 20 ou 30 individus, présentant des signes cliniques sont écouvillonnés individuellement au niveau de la trachée. Dans le cas d'un contrôle de routine, il est préférable de prélever 40 ou 60 écouvillons en fonction du niveau de confiance recherché.

Dans quels cas utiliser la technique PCR ?

1 – Contrôle de routine

La PCR mycoplasme peut être utilisée pour réaliser des contrôles de routine sur des troupeaux de reproducteurs dindes ou Gallus. La taille de l'échantillonnage et la fréquence des prélèvements peuvent être déterminées lors d'un échange entre le vétérinaire en charge de l'élevage et le laboratoire, en fonction des exigences sanitaires des autorités du pays concerné.

2 – Suivi du statut/prévention de la contamination des lots

La PCR peut également être utilisée pour s'assurer du statut d'un lot de volaille au sein d'une zone à

risque (présence proche d'un ou plusieurs sites contaminés) ou pour le contrôle d'un lot avant transfert, de façon à éviter tout risque de dissémination de l'infection.

3 – Vaccins inactivés

Les tests d'agglutination rapide sur lame peuvent donner parfois des résultats douteux ou faussement positifs, tout particulièrement pendant la période de vaccination avec des vaccins inactivés. L'analyse PCR de 20 ou 30 écouvillons de trachée permet dans ce cas de confirmer ou d'infirmer une réelle contamination par les mycoplasmes.

4 – Précocité de la détection

La culture sur milieu spécifique des mycoplasmes est longue et fastidieuse ; de même un certain délai après l'infection est souvent nécessaire pour avoir une réponse détectable en sérologie. Dans ce cas, la PCR est donc une méthode de choix pour tester des oiseaux présentant des signes cliniques discrets. L'obtention rapide d'un résultat permet également la mise en place très rapide d'un traitement adapté.

5 – contrôle d'ambiance

La PCR réalisée sur des chiffonnettes d'ambiance permet de s'assurer de l'efficacité du protocole de désinfection entre deux lots consécutifs dans un bâtiment ayant connu un épisode de contamination par les mycoplasmes.

Combien de prélèvements réaliser ?

Prévalence supposée	5%	5%	20%	20%
	<i>Contrôle de routine</i>		<i>Signes cliniques discrets</i>	
Effectif	5000-10000	5000-10000	5000-10000	5000-10000
Niveau de confiance	95%	99%	95%	99%
Taille de l'échantillon	60	90	15	20

Exemple de programme de contrôle continu des mycoplasmes utilisant la PCR

	<i>Reproducteurs : période d'élevage</i>	<i>Reproducteurs : période de ponte</i>
Effectif	12000 oiseaux	10000 oiseaux
Taille de l'échantillon	21 écouvillons trachéaux	21 écouvillons trachéaux
Fréquence	1 analyse/mois pendant 5 mois	1 analyse/mois pendant 10 mois

Exemple de programme de contrôle renforcé des mycoplasmes utilisant la PCR

	<i>Reproducteurs : période d'élevage</i>	<i>Reproducteurs : période de ponte</i>
Effectif	12000 oiseaux	10000 oiseaux
Taille de l'échantillon	18 écouvillons trachéaux	18 écouvillons trachéaux
Périodicité	1 analyse toute les 2 semaines pendant 20 semaines	1 analyse toute les 2 semaines pendant 40 semaines

