

Université de Montréal

**Étude de la diversité génétique d'isolats québécois de  
*Mycoplasma hyopneumoniae* provenant d'infections simples ou  
mixtes et caractérisation de leur sensibilité aux antimicrobiens**

par

**Audrey Charlebois**

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès Sciences (**M. Sc.**)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Décembre 2009

© Audrey Charlebois, 2009

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Étude de la diversité génétique d'isolats québécois de  
*Mycoplasma hyopneumoniae* provenant d'infections simples ou mixtes et  
caractérisation de leur sensibilité aux antimicrobiens**

présenté par

**Audrey Charlebois**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dre Mariela Segura, présidente-rapporteuse  
Dre Marie Archambault, directrice de recherche  
Dr Carl A. Gagnon, codirecteur  
Dr Marcelo Gottschalk, codirecteur  
Dr John M. Fairbrother, membre du jury

## **RÉSUMÉ**

*Mycoplasma hyopneumoniae* est l'agent causal de la pneumonie enzootique. On le retrouve dans plusieurs élevages de porcs à travers le monde. Même si ce micro-organisme est présent dans plusieurs troupeaux canadiens, peu d'informations sont présentement disponibles sur les isolats québécois. Un total de 160 poumons de porcs possédant des lésions de pneumonie ont été récupérés à l'abattoir, mis en culture et testés par PCR pour *M. hyopneumoniae* et *Mycoplasma hyorhinis*. D'autres pathogènes bactériens communs du porc et les virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP), de l'influenza et le circovirus porcin de type 2 (CVP2) ont été également testés. Quarante-vingt-dix pourcent des échantillons étaient positifs pour *M. hyopneumoniae* et 5.6% l'étaient seulement pour *M. hyorhinis*. Dans ces échantillons positifs pour *M. hyopneumoniae*, la concentration de ce mycoplasme variait de  $1.17 \times 10^5$  à  $3.37 \times 10^9$  génomes/mL. Vingt-cinq poumons positifs en culture ou par PCR en temps réel pour *M. hyopneumoniae* ont été sélectionnés, parmi ceux-ci 10 étaient en coinfection avec *Pasteurella multocida*, 12 avec *Streptococcus suis*, 9 avec CVP2 et 2 avec le VSRRP. Les analyses des nombres variables de répétitions en tandem à de multiples loci (MLVA) et PCR-polymorphisme de longueur de fragments de restriction (PCR-RFLP) de *M. hyopneumoniae* ont démontré une forte diversité des isolats de terrain. Par contre, il semble y avoir plus d'homogénéité à l'intérieur d'un même élevage. L'analyse MLVA a également démontré que près de la moitié des isolats possédaient moins de 55% d'homologie avec les souches vaccinales et de référence utilisées dans la présente étude. L'absence d'amplification du locus 1 de *M. hyopneumoniae* en MLVA a été significativement associée à une baisse de la concentration de bactérie et de la sévérité des lésions. Pour tous les isolats de *M. hyopneumoniae*, des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de faibles à intermédiaires ont été obtenues envers tous les

antimicrobiens testés. Les isolats possédant des CMI intermédiaires envers les tétracyclines, les macrolides et les lincosamides ont été testés pour la présence des gènes de résistance *tetM*, *ermB* et pour des mutations ponctuelles dans les gènes des protéines L4, L22 et de l'ARNr 23S. Aucun de ces gènes n'a été détecté mais la mutation ponctuelle G2057A a été identifiée. Cette mutation est responsable de la résistance intrinsèque de *M. hyopneumoniae* face aux macrolides à 14 carbones. Ces résultats indiquent qu'il ne semble pas y avoir de résistance acquise aux antimicrobiens parmi ces isolats. En conclusion, cette recherche a permis d'obtenir de nouvelles données scientifiques sur les isolats québécois de *M. hyopneumoniae*.

**Mots-clés:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, Québec, pneumonie enzootique porcine, génotypage, résistance aux antimicrobiens

## **SUMMARY**

*Mycoplasma hyopneumoniae*, the causative agent of porcine enzootic pneumonia, is present in swine herds worldwide. However, little is known about the prevalence of this microorganism in Quebec and Canadian herds. A total of 160 swine lungs with lesions suggestive of enzootic pneumonia were recovered from two slaughterhouses. They were cultured and tested by PCR for *M. hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* and for the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the influenza virus, and the porcine circovirus type 2 (PCV2). Samples were also cultured for other commonly encountered swine pathogenic bacteria. Ninety percent of the samples were positive for *M. hyopneumoniae* (Real-time PCR) whereas 5.6% were positive only for *M. hyorhinis* (PCR). The concentration of *M. hyopneumoniae* in these positive samples varied between  $1.17 \times 10^5$  and  $3.37 \times 10^9$  genomes/mL. Among 25 selected *M. hyopneumoniae* positive lungs (culture or real-time PCR), 10 demonstrated a co-infection with *Pasteurella multocida*, 12 with *Streptococcus suis*, 9 with PCV2 and 2 with the PRRS virus. Multiple loci variable number of tandem repeats analysis (MLVA) and PCR-restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) analyses showed a high diversity among field *M. hyopneumoniae* isolates. However, there seemed to be greater homogeneity within the same herd. The MLVA analysis also demonstrated that almost half of the field isolates presented less than 55% homology with the vaccine and reference strains used in our study. The absence of amplification of one locus (locus 1) of *M. hyopneumoniae* was significantly associated with a lower number of bacteria and a lower severity of lung lesions. All *M. hyopneumoniae* isolates showed low to intermediate MICs against the antimicrobials tested. Cultures with intermediate MICs for tetracyclines, macrolides and lincosamides were tested for the presence of previously described resistance genes *tetM*, *ermB* and L4, L22 and 23S

rRNA point mutations. None of these genes were found, although one point mutation, G2057A, was identified. This mutation is responsible for the intrinsic resistance of *M. hyopneumoniae* against 14-membered macrolides. These results indicate that there is probably no acquired antimicrobial resistance within these isolates. This research provides new scientific data on *M. hyopneumoniae* isolates from Canada.

**Keywords:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, Canada, porcine enzootic pneumonia, genotyping, antimicrobial resistance

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
SUMMARY .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xv
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RECENSION DES ÉCRITS .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Caractéristiques du genre <i>Mycoplasma</i> .....	5
2.1.2 Caractéristiques de l'espèce <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .....	6
2.1.3 Les facteurs de virulence.....	8
2.1.4 Pathogénèse.....	10
2.1.5 Pathologies .....	11
2.1.6 Transmission .....	13
2.1.7 Coinfections .....	13
2.1.8 Diagnostic .....	15
2.1.9 Contrôle de l'infection à <i>M. hyopneumoniae</i> .....	17
<b>2.2 Détermination de la susceptibilité aux antimicrobiens chez les mycoplasmes .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Antimicrobiens et susceptibilité aux antimicrobiens .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Résistance aux antimicrobiens chez <i>M. hyopneumoniae</i> .....	22

2.3.2	Tétracyclines .....	23
2.3.3	Macrolides, lincosamides et pleuromutilines .....	24
2.3.4	Fluoroquinolones .....	25
<b>2.4</b>	<b>Techniques de génotypage pour <i>M. hyopneumoniae</i>.....</b>	<b>26</b>
2.4.1	Électrophorèse en champ pulsé .....	26
2.4.2	Nombre variable de répétition en tandem du gène P97 .....	27
2.4.3	Analyse des nombres variables de répétitions en tandem de multiple loci..	28
2.4.4	Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés.....	29
2.4.5	Polymorphisme d'ADN amplifié aléatoirement .....	29
2.4.6	PCR-Polymorphisme de longueur de fragments de restriction.....	30
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>32</b>
3.1	Article scientifique .....	34
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>SOURCES DOCUMENTAIRES.....</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>xv</b>
<b>8.</b>	<b>ANNEXE .....</b>	<b>xviii</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### Recension des écrits

**Tableau I** : Techniques de PCR pour la détection de *M. hyopneumoniae*.....16

### Article scientifique

**Table 1**: PCR primers used in this study.....60

**Table 2**: Presence of *M. hyorhinis* and different viral and bacterial pathogens in 25 *M. hyopneumoniae* positive lungs samples.....61

**Table 3**: MICs of *M. hyopneumoniae* positive cultures from Canada.....64

## LISTE DES FIGURES

### Recension des écrits

**Figure 1** : Culture d'une semaine de *M. hyopneumoniae* sur gélose NHS. Grossissement de 40X.....8

**Figure 2** : Lésions macroscopiques de pneumonie enzootique porcine localisées sur les lobes apicaux et cardiaques.....12

### Article scientifique

**Figure 1**: Percentage of homology of the isolates compared to vaccines and reference strains as demonstrated by MLVA .....62

**Figure 2**: Percentage of homology of the isolates compared to reference strains as demonstrated by PCR-RFLP.....63

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

<b>ABC</b>	<i>ATP-binding cassette</i>
<b>AFLP</b>	<i>Amplified-Fragment Length Polymorphism</i>
<b>AFSSA</b>	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
<b>AP-PCR</b>	<i>Arbitrary-primed PCR</i>
<b>BHI</b>	<i>Brain heart infusion</i>
<b>CCU</b>	<i>Changing color unit</i>
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CVP</b>	Circovirus porcin
<b>CVP1 ou 2</b>	Circovirus porcin de type 1 ou 2
<b>DEAE</b>	Diethylaminoethyl
<b>dNTP</b>	Désoxynucléotides tri-phosphate
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>LV</b>	<i>Lelystad virus</i>
<b>LppS</b>	Protéine membranaire riche en sérine
<b>MH</b>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
<b>MIC</b>	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
<b>MLVA</b>	<i>Multiple loci variable number of tandem repeats analysis</i>
<b>NHS</b>	<i>Normal with horse and pig serum</i>
<b>OIE</b>	Office international des épizooties (Organisation Mondiale de la Santé Animale)
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCR-RFLP</b>	<i>Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>PCV2</b>	<i>Porcine circovirus type 2</i>
<b>PFGE</b>	<i>Pulsed field gel electrophoresis</i>
<b>PMWS</b>	<i>Postweaning multisystemic wasting syndrome</i>
<b>PPLO</b>	<i>Pleuropneumonia-like organism</i>
<b>PRRSV</b>	<i>Porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i>

<b>SDPS</b>	Syndrome du dépérissement en post-sevrage
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>SPF</b>	<i>Specific pathogen free</i>
<b>spp</b>	Espèces
<b>SRRP</b>	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
<b>ssp</b>	Sous-espèce
<b>UPGMA</b>	<i>Unweighted pair group method with arithmetic mean</i>
<b>VNTR</b>	<i>Variable number of tandem repeats</i>
<b>Vsp</b>	<i>Variable surface protein</i>
<b>VSRRP</b>	Virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin

## REMERCIEMENTS

Merci à ma directrice de recherche, la Dre Marie Archambault, pour m'avoir donné la possibilité de travailler dans son laboratoire et de m'avoir encouragé à continuer.

Merci à mes co-directeurs, les Drs Carl A. Gagnon et Marcelo Gottschalk, pour leur supervision et leurs conseils.

Merci au Dr Pierre Hélie pour son aide et son implication dans le projet ainsi qu'à Guy Beauchamp pour son aide avec les statistiques.

Merci à Louis-Alexandre Jalbert, Cindy-Love Tremblay, Michael Beaudry-Ferland et Carl F. Uhland pour votre aide et vos conseils.

Merci aux membres de mon comité conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci au personnel des laboratoires de virologie et de bactériologie de la Faculté de médecine vétérinaire pour leur aide dans le projet.

Merci à tous les membres, étudiants et le personnel du GREMIP pour leur aide et leurs suggestions.

Merci à Pfizer Santé animale, à la Fédération des producteurs de porcs du Québec et au Centre de recherche en infectiologie porcine pour leur contribution financière.

Merci à ma famille pour m'avoir encouragé et soutenu tout au long de ma maîtrise.

# **1. INTRODUCTION**

*Mycoplasma hyopneumoniae* est présent dans plusieurs élevages porcins dans le monde et est l'agent causal de la pneumonie enzootique<sup>(50)</sup>. Son importance semble reliée à son habilité à augmenter la sévérité des lésions causées par des virus, comme le circovirus porcine de type 2 (CVP2), le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (VSRRP), le virus influenza<sup>(73, 102, 104)</sup>, ou de certaines bactéries<sup>(24, 74)</sup>. Les infections à *M. hyopneumoniae* sont omniprésentes au Québec et ce malgré la vaccination des porcelets. En effet, il a été démontré que la protection contre les pneumonies était souvent incomplète suite à la vaccination et que les vaccins ne prévenaient pas la colonisation par *M. hyopneumoniae*<sup>(103)</sup>. Au Québec, aucune information n'est présentement disponible sur la prévalence et la diversité génétique des isolats de *M. hyopneumoniae* à travers la province.

Au niveau génomique, une importante hétérogénéité a été démontrée, dans certains pays, entre les isolats de *M. hyopneumoniae* à l'aide de diverses techniques comme l'amplification aléatoire d'ADN polymorphique (RAPD)<sup>(6)</sup>, le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (AFLP)<sup>(52)</sup>, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)<sup>(92)</sup> et l'analyse des motifs de répétition de polysérines de l'homologue P146 du LppS<sup>(65)</sup>. Plus récemment, de nouvelles techniques basées sur l'amplification d'ADN ont été optimisées pour *M. hyopneumoniae*. L'analyse des nombres variables de répétition en tandem de multiples loci (MLVA) (C. Marois, communication personnelle) et la PCR combinée au polymorphisme de longueur de fragments de restriction (PCR-RFLP)<sup>(93)</sup> sont deux nouvelles méthodes qui peuvent être facilement exécutées. De plus, elles sont reproductibles et possèdent un haut pouvoir de discrimination.

Très peu de mécanismes ou de gènes de résistance aux antimicrobiens ont été décrits dans la littérature pour *M. hyopneumoniae*. Ce dernier possède une résistance naturelle face aux antimicrobiens ciblant la paroi bactérienne ou la voie de synthèse de l'acide folique puisque les mycoplasmes en sont dépourvus. Des résistances aux tétracyclines, aux macrolides, aux lincosamides ainsi qu'aux fluoroquinolones ont été sporadiquement rapportées <sup>(44, 47, 91, 109, 111)</sup>. Par contre, la majorité des isolats testés dans plusieurs pays sont susceptibles aux antimicrobiens utilisés pour le traitement de la pneumonie enzootique <sup>(47, 111, 118, 119)</sup>.

Le premier objectif de cette étude était d'évaluer la diversité génétique d'isolats québécois de *M. hyopneumoniae* provenant d'infections simples ou mixtes avec le VSRRP et/ou le CVP2 et/ou le virus influenza chez le porc. Le deuxième objectif était de déterminer la variabilité de la susceptibilité aux agents antimicrobiens des isolats de *M. hyopneumoniae* afin de déterminer si ce facteur pouvait contribuer à la propagation d'une souche en particulier. Les résultats de cette étude permettront de connaître la diversité génétique et la susceptibilité aux agents antimicrobiens des isolats québécois de *M. hyopneumoniae*.

## **2. RECENSION DES ÉCRITS**

## 2.1 *Mycoplasma hyopneumoniae*

### 2.1.1 Caractéristiques du genre *Mycoplasma*

Les mycoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* (*mollis*, doux; *cutis*, peau) qui comprend plus de 200 espèces <sup>(86)</sup>. Ils contiennent un minimum d'organelles essentielles pour leur croissance et leur réplication : membrane plasmique, ribosomes et un génome qui consiste en une molécule d'ADN double brin circulaire de 892 à 921 kb. Contrairement aux autres procaryotes, les mycoplasmes n'ont aucune paroi cellulaire car ils sont incapables de synthétiser du peptidoglycane ou ses précurseurs. Ils sont donc sensibles aux chocs osmotiques, aux détergents, aux alcools ainsi qu'aux anticorps en présence de complément. Ils sont non-mobiles et aérobies ou anaérobies facultatifs <sup>(1)</sup>.

Normalement, les mycoplasmes ont une forme ronde ou ovoïde. Dans la plupart des cultures, une forme allongée ou filamenteuse jusqu'à 100 µm de long et 0.4 µm de large peut aussi être présente. Le filament a tendance à produire des structures mycéloïdes branchées, d'où le nom *Mycoplasma* (*myces*, champignon; *plasma*, forme). Les mycoplasmes se divisent par fission binaire mais la réplication n'est pas toujours coordonnée avec la division cellulaire ce qui entraîne la formation de chaînettes. La membrane plasmique de ces cellules ressemble à celle des autres procaryotes et est composée de deux tiers de protéines et d'un tiers de lipides <sup>(1)</sup>.

Le génome de *Mycoplasma* est caractérisé par son faible contenu en G+C (28.6%) et par l'utilisation préférentielle de codons contenant de l'adénine et de l'uracile. Chez les mycoplasmes, il y a utilisation du codon stop universel UGA comme un codon codant pour le tryptophane, propriété rare et retrouvée jusqu'à maintenant seulement chez les mycoplasmes et les mitochondries à l'exception de ceux des plantes. La résistance de leur

ARN polymérase à la rifampicine, antimicrobien qui inhibe l'activité de la polymérase, est une autre propriété discriminante <sup>(1)</sup>.

Comme le génome des mycoplasmes est très petit, il n'y a que quelques gènes. Chez certains, ce nombre est évalué à 500, soit un sixième du nombre de gènes retrouvés chez la bactérie *Escherichia coli*. Étant donné cette faible quantité de gènes, *Mycoplasma* n'exprime qu'un petit nombre de protéines cellulaires ce qui explique l'absence de plusieurs activités enzymatiques et voies métaboliques. En effet, chez les mycoplasmes, les voies de biosynthèse des acides aminés et pratiquement de toutes les vitamines sont absentes <sup>(83)</sup>. Leurs besoins nutritionnels sont donc complexes et dépendants de leur mode de vie parasitaire, leur culture est, par conséquent, difficile en laboratoire.

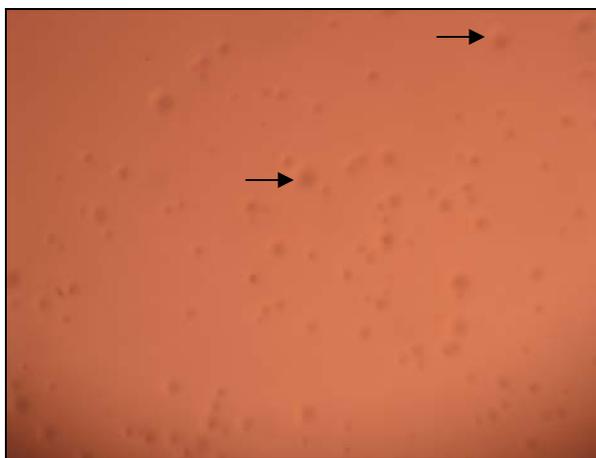
### **2.1.2 Caractéristiques de l'espèce *Mycoplasma hyopneumoniae***

*Mycoplasma hyopneumoniae* a été isolé pour la première fois en 1965 au Royaume Uni et aux États-Unis de cas cliniques de pneumonie enzootique <sup>(35, 51)</sup>. Elles sont parmi les bactéries auto-répliquantes les plus petites (200-500 nm) et les plus simples. *M. hyopneumoniae* est considéré comme l'un des mycoplasmes les plus difficiles à cultiver. Il a besoin de cholestérol et d'acide gras fournis par le sérum contenu dans le milieu. Il utilise le glucose comme source de carbone <sup>(1)</sup>. Les milieux liquides et solides les plus utilisés pour sa croissance sont ceux décrits par Friis <sup>(32)</sup>, mais le milieu solide NHS (C. Marois, Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), France, communication personnelle) et les milieux MH, décrits par Etheridge et al. <sup>(31)</sup>, sont aussi utilisés. Ces milieux de culture sont composés principalement de milieu PPLO, qui est le milieu de base pour la culture de *Mycoplasma*, d'extrait de levure, de glucose, de BHI (Brain Heart Infusion ou infusion cœur-cerveau), d'antimicrobiens pour éliminer les contaminants, de rouge de phénol et de

sérum de porc et/ou de cheval. Pour l'isolement de *M. hyopneumoniae*, trois techniques sont utilisées. La première technique, décrite par Friis <sup>(32)</sup>, consiste à prélever un morceau de poumon d'environ un cm<sup>3</sup>, à l'intersection du tissu sain et de la lésion, et de broyer le tissu dans du milieu de culture. Par la suite, le broyat est centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et le surnageant est mis en culture. Une autre technique, décrite par Abiven et Pommier <sup>(2)</sup>, consiste à effectuer un lavage trachéobronchique par voie intranasale à l'aide de saline. Le liquide récupéré est centrifugé pour éliminer les cellules et le surnageant est mis en culture. La dernière technique consiste à inciser le poumon à l'intersection du tissu sain et de la lésion, suite à une stérilisation de la surface à la chaleur. Un écouvillon est ensuite frotté fermement sur les parois de l'entaille puis resuspendu dans de l'eau peptonée tamponnée. Par la suite, un aliquot est mis en culture (C. Marois, communication personnelle).

La croissance de *M. hyopneumoniae* est très lente, de 4 à 15 jours pour un isolement primaire et peut être ralenti par la présence d'autres bactéries <sup>(50)</sup>. Lorsque les cultures en milieu Friis ont viré du rouge, couleur initiale du milieu, à l'orangé, un aliquot est déposé sur milieu gélosé pour vérifier la pureté de la culture ainsi que la morphologie des colonies. Pour la croissance sur milieu solide, les géloses doivent être incubées à 37°C sous une atmosphère contenant 5-10% de CO<sub>2</sub>. La croissance peut prendre de 7 à 30 jours et les colonies de *M. hyopneumoniae* ont un diamètre d'environ 0.5 mm. Elles sont dépourvues de protubérance centrale contrairement aux autres mycoplasmes qui forment un type "œuf sur le plat" <sup>(51)</sup>. Un test PCR est aussi effectué sur les cultures pour confirmer la présence de *M. hyopneumoniae* ainsi que pour détecter *Mycoplasma hyorhinis* et *Mycoplasma flocculare*, qui sont des mycoplasmes souvent rencontrés en coinfection. Si la culture n'est

pas pure, une colonie isolée est repiquée dans un mL de milieu liquide, à l'aide d'une aiguille, et incubée jusqu'au virage de la culture. Un nouvel aliquot est déposé sur milieu gélosé pour vérifier la pureté. Lorsque la culture est pure, une colonie est mise en culture pour la conservation de l'isolat.



**Figure 1** : Culture d'une semaine de *M. hyopneumoniae* sur gélose NHS. Grossissement de 40X.

### 2.1.3 Les facteurs de virulence

#### 2.1.3.1 Adhésines

La majorité des mycoplasmes provenant d'humains et animaux adhèrent fermement aux cellules épithéliales de la voie respiratoire ou urogénitale, mais très peu envahissent les tissus. L'adhérence des mollicutes aux cellules hôtes est un prérequis pour la colonisation et l'infection. Cette adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte ou à la matrice extra-cellulaire est basée sur une interaction spécifique entre une adhésine et un récepteur, de nature glycoprotéique, glycolipidique ou protéique. Lors de l'infection, une fusion des membranes du mycoplasme et de la cellule hôte a été suggérée <sup>(82)</sup>. Celle-ci altérerait la composition et

la perméabilité de la membrane de la cellule hôte et permettrait l'introduction d'enzymes hydrolytiques du mycoplasme. Pinto et al. (2009) ont montré que les souches virulentes de *M. hyopneumoniae* avaient une expression constitutive d'adhésines comparativement aux souches avirulentes <sup>(77)</sup>. Plusieurs études sur l'attachement des mycoplasmes ont été effectuées ces dernières années. La protéine membranaire majeure P97 de *M. hyopneumoniae* a été décrite par Zhang et al. <sup>(120)</sup>. Elle est impliquée dans l'adhésion aux cellules de l'épithélium du système respiratoire porcin. La P97 semble très conservée parmi les souches de *M. hyopneumoniae* <sup>(117)</sup>. La protéine comprend deux régions répétées, soit R1 et R2, située dans la portion C-terminale <sup>(42)</sup>. La région R1 a été impliquée dans l'attachement aux cils de l'épithélium respiratoire et pour que cette adhésion soit fonctionnelle, au moins sept répétitions du motif AAKPV(E) sont nécessaires <sup>(43, 67)</sup>. La région R2 a été impliquée dans l'attachement de *M. hyopneumoniae* à la matrice extracellulaire de l'hôte <sup>(45)</sup>. Une déficience dans la cytoadhérence chez les souches avirulentes a été associée à l'absence d'une protéine P97 fonctionnelle <sup>(117)</sup>.

Chen et al. (1998) ont identifié chez *M. hyopneumoniae* une glycoprotéine, apparentée aux adhésines, nommée P110 et constituée de deux sous-unités, P54 et P28. Cette protéine est exprimée de façon constitutive chez ce mycoplasme. Son rôle dans la pathogénicité est sous étude présentement <sup>(20)</sup>. En 2006, Burnett et al. ont identifié chez *M. hyopneumoniae* la protéine P159, une adhésine se liant au glycosaminoglycane. Cette protéine serait clivée de façon post-traductionnelle en trois protéines, soit P27, P110 et P52, et ces protéines seraient présentes à la surface du mycoplasme à toutes les étapes de la croissance <sup>(15)</sup>. Récemment, la protéine P216 a été décrite. Il s'agit d'un paralogue de la P97

qui serait clivé en deux protéines se liant à l'héparine, soit la P120 et la P85. Ces protéines se lient aussi aux cils de l'épithélium respiratoire mais, contrairement aux autres adhésines ciliaires, ne possèdent pas le domaine de liaison R1 aux cils <sup>(116)</sup>.

### **2.1.3.2 Modification de la concentration du calcium intracellulaire**

Les souches virulentes de *M. hyopneumoniae* se lieraient à un récepteur, à la surface des cellules de l'hôte, couplé à une protéine G. Suite à l'adhésion de la bactérie, la protéine G stimulerait la voie de la phospholipase C pour faire augmenter la concentration en ions calcium intracellulaires libres à l'intérieur des cellules épithéliales ciliées via le réticulum endoplasmique. Ce changement dans la concentration de calcium servirait de signal intracellulaire pour l'induction de la perte de cils des cellules épithéliales <sup>(75)</sup>. Le mécanisme exact de l'augmentation du calcium intracellulaire par *M. hyopneumoniae* reste encore à déterminer. La ciliostase est l'un des signes macroscopiques primaires des pneumonies causées par *M. hyopneumoniae*. Ce phénomène de modification de la concentration de calcium intracellulaire n'a pas été observé à ce jour chez d'autres mollicutes.

### **2.1.4 Pathogenèse**

L'habitat primaire de *M. hyopneumoniae* est le mucus des surfaces du système respiratoire inférieur des porcs <sup>(13)</sup>. La première étape de l'infection est donc l'adhésion aux cellules ciliées de l'épithélium de la trachée, des bronches et des bronchioles. Cette adhésion cause par la suite la ciliostase, soit l'arrêt des battements des cils, la perte ciliaire, une intense production de mucus et la desquamation progressive des cellules. Ceci résulte

en la perte de fonction de l'appareil mucociliaire <sup>(25)</sup>. Lorsqu'il n'y a pas de surinfection, l'épithélium respiratoire se reconstitue en quelques semaines <sup>(51)</sup>. Pratiquement tous les cas naturels de pneumonie enzootique sont des infections mixtes, soit avec d'autres bactéries ou avec des virus <sup>(84)</sup>. Les coinfections sont décrites dans la section 2.1.7.

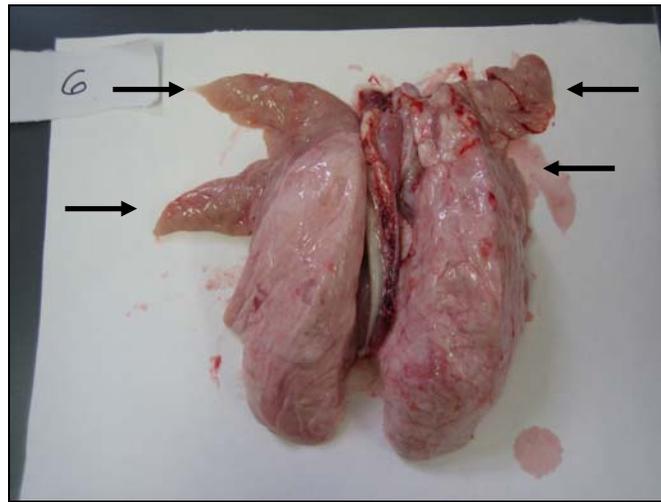
### 2.1.5 Pathologies

*M. hyopneumoniae* est un pathogène strict du porc. Lorsque retrouvé seul, il cause des pneumonies de sévérité moyenne mais chroniques et caractérisées par un faible taux de mortalité et un taux élevé de morbidité. Il est l'agent étiologique primaire de la pneumonie enzootique du porc et du complexe respiratoire porcin <sup>(48)</sup>. On parle de pneumonie enzootique lorsque *M. hyopneumoniae* est le seul agent pathogène. Dans le cas du complexe respiratoire porcin, il s'agit d'une coinfection avec d'autres bactéries, comme *Pasteurella multocida* ou *Streptococcus suis*, ou avec des virus, comme le circovirus porcin type 2 (CVP 2) ou le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (VSRRP). Les coinfections augmentent souvent la sévérité des lésions dues à *M. hyopneumoniae*.

Les signes cliniques principaux des infections à *M. hyopneumoniae*, soit une toux chronique et non-productive ainsi qu'une légère hyperthermie, persistent environ 2 mois chez l'animal. Les manifestations cliniques sont retrouvées surtout chez les porcelets mais les porcs de tous âges peuvent être infectés <sup>(49)</sup>. De plus, certains porcs sont des porteurs asymptomatiques; ils sont donc infectés mais ne présentent pas de signes cliniques <sup>(84)</sup>. Le taux de mortalité est très faible lorsqu'il n'y a pas de surinfection mais le taux de morbidité peut être très élevé voir jusqu'à 100% de l'élevage <sup>(51)</sup>. La pathogénie de *M. hyopneumoniae* semble également dépendante de l'évasion et/ou de l'altération du système

immunitaire de l'hôte <sup>(101)</sup>. Les infections à *M. hyopneumoniae* rendent aussi l'hôte plus susceptible aux infections secondaires par d'autres pathogènes porcins dû à leur caractère immunosuppresseur (communication personnelle).

Lors de l'examen des poumons à l'autopsie, les lésions consistent en des régions de couleur mauve à grise situées principalement sur les lobes apicales, cardiaques, intermédiaire et les parties antérieures des lobes diaphragmatiques <sup>(59)</sup>.



**Figure 2** : Lésions macroscopiques de pneumonie enzootique porcine localisées sur les lobes apicaux et cardiaques (zone grise-mauve).

En histopathologie, une bronchopneumonie interstitielle ainsi qu'une forte hyperplasie lymphoïde pérbronchiolaire et périvasculaire sont observées dans les tissus lors de la phase aiguë de l'infection. Des cellules mononucléées, des lymphocytes et des monocytes sont également observés. Lors de la phase chronique de l'infection, de volumineux nodules de tissu lymphoréticulaire compriment la lumière des bronches <sup>(48, 51)</sup>.

### 2.1.6 Transmission

*M. hyopneumoniae* possède deux voies de transmission soit la transmission verticale ou horizontale. Les porcs peuvent être infectés de façon verticale, de la truie aux porcelets, ou horizontale, d'un porc infecté aux porcs naïfs. La transmission horizontale est souvent due à l'introduction de nouveaux animaux infectés dans un élevage naïf <sup>(88)</sup>. Il a été démontré pour la transmission verticale, que les cochettes excrétaient plus de *M. hyopneumoniae* comparativement aux truies plus âgées <sup>(60)</sup> et que certaines jeunes truies pouvaient même être infectées de façon persistante <sup>(16)</sup>. La transmission horizontale de l'infection se produit entre les porcs d'un même élevage principalement via le contact direct avec des sécrétions du système respiratoire de porcs infectés ou via les aérosols produits par la toux ou les éternuements <sup>(88)</sup>. Pour ce qui est de la transmission indirecte, soit par aérosol, Dee et al. <sup>(26)</sup> ont démontré que *M. hyopneumoniae* pouvait se transmettre à des fermes ayant jusqu'à 4.7 km de distance.

### 2.1.7 Coinfections

L'importance des infections à *M. hyopneumoniae* semble être liée à sa capacité à augmenter la sévérité des lésions causées par certains virus ou bactéries. Il a été démontré que la présence de *M. hyopneumoniae*, lors d'une infection causée par le CVP2, augmentait la sévérité des lésions pulmonaires et lymphoïdes. De plus, une augmentation dans la quantité et dans la durée de la présence des antigènes du CVP2 ainsi qu'une augmentation dans l'incidence du syndrome du dépérissement en post-sevrage (SDPS) chez le porc ont été observées <sup>(73)</sup>. Les auteurs avancent l'hypothèse que *M. hyopneumoniae* infecterait en premier les porcs, ce qui créerait un environnement idéal pour la réplication du CVP2. Dans

le cas du virus SRRP, la présence de *M. hyopneumoniae* augmente la durée et la sévérité des pneumonies et des lésions pulmonaires induites par le virus <sup>(102)</sup>. Selon Thacker et al. (1999), lors d'une coinfection avec le virus SRRP et *M. hyopneumoniae*, les porcs ont une toux plus importante comparativement aux porcs infectés avec un seul de ces deux agents.

Pour ce qui est de la coinfection par le virus influenza H1N1 et *M. hyopneumoniae*, Thacker et al. (2001) ont évalué les possibles interactions à l'aide d'une étude *in vivo*. Trois groupes de porcelets ont été infectés, respectivement, par le virus influenza H1N1 seul, par *M. hyopneumoniae* seul ou par les deux agents. Au niveau macroscopique, la pneumonie était plus sévère dans les deux groupes infectés avec le virus influenza après trois et sept jours post-inoculation alors qu'après 14 jours, la pneumonie était plus sévère seulement chez le groupe étant infecté avec le virus influenza et *M. hyopneumoniae*. Toutefois, à 21 jours post-infection, la sévérité des lésions est redevenue basale, soit au même niveau que le groupe infecté seulement avec *M. hyopneumoniae* <sup>(104)</sup>. Le virus influenza n'aurait donc qu'une interaction transitoire avec *M. hyopneumoniae* lors d'une coinfection <sup>(104)</sup>.

Pour ce qui est des bactéries, la coinfection avec *Pasteurella multocida* semble créer des lésions de pneumonie sévères <sup>(85)</sup>. Dans ce cas-ci, *M. hyopneumoniae* sensibiliserait le poumon à la colonisation puis à l'infection par *P. multocida* <sup>(4)</sup>. Dans le cas d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, la présence de *M. hyopneumoniae* en coinfection semblerait augmenter la sévérité des lésions dues à *A. pleuropneumoniae* <sup>(63)</sup>. Aucune information n'est présentement disponible sur les interactions entre *M. hyopneumoniae* et *Streptococcus suis*, ou *Actinobacillus suis*.

### 2.1.8 Diagnostic

Même si la culture de *M. hyopneumoniae* est considérée comme la technique de référence pour la détection du micro-organisme, celle-ci n'est pas utilisée de routine pour le diagnostic car elle est longue et fastidieuse <sup>(101)</sup>. La sérologie, quant à elle, est un outil pratiquement indispensable pour déterminer l'état de santé d'un troupeau. Par contre, la sérologie n'est pas sans désavantage. Il existe des tests ELISA pour la détection d'anticorps contre *M. hyopneumoniae* mais ceux-ci possèdent une sensibilité et une spécificité qui diffère entre eux <sup>(5, 30)</sup>. Les tests ELISA sont utilisés pour déterminer le statut immunologique d'un troupeau, et non de quelques animaux, car la réponse humorale peut varier d'un animal à l'autre <sup>(87)</sup>. Premièrement, *M. hyopneumoniae* adhère à l'épithélium cilié du système respiratoire ce qui résulte en une interaction minimale avec le système immunitaire <sup>(101)</sup>. Deuxièmement, il est capable d'induire des variations antigéniques à sa surface, déjouant alors pour un temps la réponse immune <sup>(48)</sup>.

La fréquence de détection de *M. hyopneumoniae* a augmenté significativement depuis le développement de la PCR. Par contre, l'utilisation d'une seule paire d'amorces ne semble pas assez sensible pour détecter correctement le mollicute lorsqu'il est en faible concentration <sup>(101)</sup>. Quant à la PCR nichée, qui utilise deux paires d'amorces, elle possède une très grande sensibilité, pouvant détecter aussi peu que quatre ou cinq micro-organismes <sup>(54)</sup>. Toutefois, cette caractéristique est aussi problématique puisqu'elle augmente les risques de contamination croisée des échantillons par les produits PCR retrouvés dans l'environnement. Durant les dernières années, des techniques de PCR en temps réel ont été développées pour détecter et quantifier *M. hyopneumoniae* <sup>(29, 62, 96)</sup>. Ces analyses sont

beaucoup plus sensibles et spécifiques que la PCR simple et ne présentent pas de problème de contamination croisée. En effet, par réaction, la PCR en temps réel peut détecter de 10-15 génomes alors que la PCR simple peut détecter environ 1000 génomes <sup>(90, 96)</sup>. Les techniques de PCR en temps réel sont donc à privilégier pour la détection de ce mycoplasme. Les différentes techniques PCR développées pour la détection de *M. hyopneumoniae* sont présentés au tableau I.

**Tableau I** : Techniques de PCR pour la détection de *M. hyopneumoniae*.

Cible	Type de PCR	Référence
ADN chromosomique spécifique	Simple	Harasawa et al, 1991 <sup>(38)</sup>
ADN chromosomique spécifique	Simple	Artiushin et al, 1993 <sup>(7)</sup>
Gène ARNr 16S	Simple	Mattsson et al, 1995 <sup>(64)</sup>
Séquence ADN I-141	Simple	Blanchard et al, 1996 <sup>(12)</sup>
Région MHYP1-03-950	Nichée	Stark et al, 1998 <sup>(95)</sup>
Gène ARNr 16S	Nichée	Calsamiglia et al, 1999 <sup>(17)</sup>
Gène p36 spécifique immunodominant	Simple	Caron et al, 2000 <sup>(18)</sup>
Séquence ADN I-141	Simple	Verdin et al, 2000 <sup>(107)</sup>
Gène hypothétique unique	Nichée	Kurth et al, 2002 <sup>(54)</sup>
Région MHYP1-03-950	Temps réel	Dubosson et al, 2004 <sup>(29)</sup>
Séquence ADN I-141	Temps réel	Dubosson et al, 2004 <sup>(29)</sup>
ADNr 16S	Simple	Stakenborg et al, 2006 <sup>(90)</sup>
Gène mhp 165	Temps réel	Strait et al, 2008 <sup>(96)</sup>
Gène P97 (mhp183)	Temps réel	Strait et al, 2008 <sup>(96)</sup>
Gènes P46, P97 et P102	Temps réel	Marois et al, 2009 <sup>(62)</sup>

*M. hyopneumoniae* peut aussi être détecté dans les poumons par immunofluorescence, par immunohistochimie et par hybridation *in situ* <sup>(3, 14, 73)</sup>. Pour le diagnostic, les deux premières techniques sont plus pratiques que la dernière puisqu'elles peuvent être effectuées sur des tissus fixés au formaldéhyde. L'hybridation *in situ*, quant à elle, doit être effectuée sur des tissus congelés.

### **2.1.9 Contrôle de l'infection à *M. hyopneumoniae***

Plusieurs méthodes ont été mises en place pour contrôler les infections à *M. hyopneumoniae* dans les élevages de porcs. Une de celles-ci est l'optimisation des pratiques de gestion et des conditions d'hébergement des animaux, qui comporte plusieurs points. On y retrouve l'instauration d'un système de production adéquat, l'achat d'animaux avec un état de santé satisfaisant, le maintien de troupeaux d'une grosseur et d'une densité raisonnable, l'application de mesures de biosécurité strictes ainsi que l'amélioration des conditions environnementales <sup>(59)</sup>.

Une méthode largement utilisée par les producteurs est la vaccination. Les vaccins commerciaux utilisés sont composés de bactérines de *M. hyopneumoniae*, soit des bactéries complètes inactivées, émulsées dans un adjuvant. Cette méthode possède plusieurs avantages dont une amélioration du gain de poids quotidien (2-8%), du ratio de conversion alimentaire (2-5%) et quelques fois une diminution du taux de mortalité <sup>(59)</sup>. Meyns et al. <sup>(66)</sup> ont démontré que la vaccination, à l'aide de vaccins commerciaux, diminuait la sévérité des signes cliniques et des lésions pulmonaires chez les porcs. Par contre, il y avait très peu d'effet sur la transmission de *M. hyopneumoniae*. Les différentes stratégies de vaccination

adoptées dépendent du type d'élevage, du système de production, des pratiques de gestion, du patron d'infection présent et des préférences des producteurs. Toutefois, comme les infections à *M. hyopneumoniae* peuvent survenir dès les premières semaines de vie, la vaccination des porcelets est la stratégie la plus souvent utilisée. Dans les élevages n'ayant qu'un site, la vaccination des porcelets en maternité (< 4 semaines d'âge) est plus fréquemment rencontrée. Les fermes comportant trois sites, quant à elles, privilégient la vaccination en pouponnière et en début d'engraissement (entre 4 et 10 semaines d'âge) car pour ce type de fermes, les infections tardives sont plus souvent rencontrées <sup>(59)</sup>.

Malgré les effets bénéfiques de la vaccination, les résultats varient entre les élevages. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité du vaccin. Les plus fréquents sont les conditions inadéquates d'entreposage des vaccins, des techniques d'injection inadéquates, des différences antigéniques entre la souche de terrain et la souche vaccinale, la présence de maladies concomitantes ainsi que l'interférence des anticorps maternels <sup>(59)</sup>. De plus, il existe une grande variation, entre les porcs, dans la concentration d'anticorps ainsi que dans la protection induite suite à la vaccination <sup>(103)</sup>. Finalement, l'infection ou la vaccination avec le virus SRRP (vaccin RespPRRSRepro<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim/NOBL Laboratories, Ames, IA) semble diminuer l'efficacité de la bactérine de *M. hyopneumoniae* <sup>(105)</sup>.

Durant les dernières années, plusieurs études ont porté sur la recherche de nouveaux types de vaccins. La vaccination par aérosols apporterait plusieurs avantages, soit la possibilité de vacciner en masse, diminuer le stress chez le porc ainsi qu'une meilleure stimulation de la réponse immunitaire muqueuse au niveau de la voie respiratoire. Toutefois, ce

type de vaccin n'apporte pas jusqu'à maintenant une protection suffisante contre *M. hyopneumoniae* <sup>(69)</sup>. Le vaccin donné oralement dans la nourriture sous forme de microsphères est une autre avenue étudiée. D'après les résultats de Lin et al. <sup>(57)</sup>, ce type de vaccin expérimental a pu réduire, de façon significative, les lésions de pneumonie suite à une infection à *M. hyopneumoniae*. Ogawa et al. (2009) ont également étudié la possibilité d'utiliser une souche recombinante d'*E. rhusiopathiae* comme vecteur pour la vaccination orale contre la pneumonie porcine <sup>(70)</sup>. Lorsqu'administrée par voie orale chez le porc, cette souche, qui exprime le domaine C-terminale de l'adhésine P97 de *M. hyopneumoniae*, a éliminé la mortalité suite à une exposition à *E. rhusiopathiae* et a diminué de façon significative la sévérité des lésions dues à *M. hyopneumoniae*. Quant aux vaccins à base d'ADN, ils peuvent induire une réponse immune significative contre *M. hyopneumoniae* chez la souris mais ces vaccins restent à être testés chez le porc en conditions expérimentales et sur le terrain <sup>(21)</sup>. L'utilisation d'adénovirus recombinant non-réplicatifs exprimant la partie C-terminale de l'adhésine P97 est aussi une voie de vaccination étudiée. Okamba et al. <sup>(71)</sup> ont démontré que des souris inoculées avec ce virus, par voie intranasale et intramusculaire, ont développées une immunité systémique et mucoale contre *M. hyopneumoniae*. De plus amples études chez le porc doivent cependant être effectuées pour ce type de vaccin.

L'utilisation d'antimicrobiens peut également servir comme technique de contrôle puisqu'à ce jour, la résistance aux antimicrobiens chez *M. hyopneumoniae* ne constitue pas un problème majeur <sup>(59)</sup>. Plusieurs stratégies sont utilisées pour le contrôle des infections à *M. hyopneumoniae* dont l'administration préventive d'antimicrobiens environ une semaine avant la date prévue de l'éclosion de la maladie ainsi que le traitement antimicrobien

séquentiel en engraissement, qui consiste en l'administration d'un antimicrobien de façon intermittente durant l'étape critique de la production. Dans les fermes infectées de façon endémique, l'administration stratégique d'antimicrobiens aux troupeaux de reproduction est quelques fois utilisée pour tenter de diminuer la transmission de *M. hyopneumoniae* des truies aux nouvelles cochettes <sup>(55, 59)</sup>.

## **2.2 Détermination de la susceptibilité aux antimicrobiens chez les mycoplasmes**

### **2.2.1 Techniques phénotypiques**

Le ``Clinical and Laboratory Standards Institute`` (CLSI) n'a pas encore publié de lignes directrices sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de *M. hyopneumoniae*. Les techniques standards sur gélose et en microdilution ont donc été adaptées pour ce genre. Des recommandations en ce qui concerne la détermination de la sensibilité aux antimicrobiens pour les mycoplasmes retrouvés chez les animaux ont été publiées par Hannan (2000) <sup>(36)</sup>.

#### ***2.2.1.1 E-test***

La technique du E-test consiste en une bandelette, contenant un gradient d'antimicrobien, qui est appliqué sur un tapis bactérien <sup>(114)</sup>. Il y aura donc diffusion, dans la gélose, de différentes concentrations d'antimicrobiens. Après incubation, la CMI est déterminée en observant le point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette.

Cette technique peut être utilisée pour certains mycoplasmes mais elle n'est pas utilisée pour *M. hyopneumoniae* étant donné sa très faible croissance sur milieu gélosé.

### **2.2.1.2 Microdilution en bouillon**

La méthode la plus utilisée pour la détermination de la CMI pour les mycoplasmes est la microdilution en bouillon. Cette technique consiste à faire des dilutions d'antimicrobiens, en tubes ou en microplaques, dans du milieu de culture. Par la suite, une quantité prédéterminée de bactéries est inoculée dans chaque tube ou puits. Après incubation, la CMI est déterminée, cette dernière correspondant à la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber la croissance bactérienne. Pour *M. hyopneumoniae*, il s'agit donc de la plus faible concentration où il n'y a eu aucun virage, du rouge à l'orangé, du milieu de culture. Dans le cas des mycoplasmes, aucune valeur seuil spécifique n'est encore disponible <sup>(36)</sup>.

### **2.2.2 Techniques génotypiques**

L'une des techniques génotypiques utilisées pour déterminer la résistance chez les mycoplasmes est la détection de gènes de résistance par la méthode de la PCR. Toutefois, elle est peu utilisée puisqu'il n'y a que trois gènes de résistance connus jusqu'à présent et ce, seulement chez un mycoplasme et un *Ureaplasma* humains, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* <sup>(11, 89)</sup>. Une autre méthode est la détection de mutations ponctuelles au niveau de certains gènes. Ces gènes d'intérêt sont amplifiés par la PCR puis séquencés pour déterminer s'il y a présence de mutations ponctuelles <sup>(91, 109)</sup>. En effet, ce

type de mutations, qui modifie la cible d'un antimicrobien, est le mécanisme de résistance le plus répandu chez les mycoplasmes.

## 2.3 Antimicrobiens et susceptibilité aux antimicrobiens

Les antimicrobiens utilisés dans le traitement des infections mycoplasmiques chez les animaux proviennent de plusieurs familles. Dans le cas particulier des infections à *M. hyopneumoniae*, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, les pleuromutilines et, beaucoup plus rarement, les fluoroquinolones sont utilisés pour le traitement <sup>(59)</sup>. Des résistances ont été observées pour les tétracyclines <sup>(31, 44)</sup>, les macrolides et lincosamides <sup>(91, 111)</sup> ainsi que pour les fluoroquinolones <sup>(109, 111)</sup>.

### 2.3.1 Résistance aux antimicrobiens chez *M. hyopneumoniae*

#### 2.3.1.1 Résistances naturelles

Comme les mollicutes ne possèdent pas de paroi cellulaire, ils sont donc naturellement insensibles aux  $\beta$ -lactamines, comme la pénicilline et l'ampicilline, ainsi qu'à d'autres antimicrobiens ciblant la paroi cellulaire telles que la bacitracine. Ils ne possèdent pas non plus la voie de synthèse de l'acide folique, les rendant insensibles aux sulfonamides et au triméthoprime. Ils sont aussi résistants aux polymyxines, à l'acide nalidixique et à la rifampicine mais les mécanismes de résistances ne sont pas connus <sup>(10)</sup>. De plus, certains mycoplasmes d'origine animale (*M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. bovis*, *M. pulmonis* et *M. fermentans*) sont résistants aux macrolides composés de 14 carbones, dont fait partie l'érythromycine <sup>(100)</sup>. Cette résistance s'explique par une transition G2057A dans la séquence de l'ARNr 23S de ces espèces <sup>(10)</sup>.

### 2.3.1.2 Résistances acquises

Les trois grands mécanismes bactériens de résistance acquise sont : la présence d'une pompe à efflux qui expulse les antimicrobiens à l'extérieur de la bactérie, l'altération et la protection de la cible ou la modification enzymatique de l'antimicrobien. Chez les mycoplasmes, les deux premiers mécanismes ont été décrits <sup>(10)</sup>. La majorité des résistances acquises chez les mycoplasmes ont été décrites chez des souches d'origine humaine. Dans le cas de *M. hyopneumoniae*, très peu de résistances acquises ont été décrites à ce jour et ces données sont expliquées dans les prochains paragraphes.

### 2.3.2 Tétracyclines

Les tétracyclines sont des agents bactériostatiques qui ont comme mécanisme d'action l'inhibition de la synthèse protéique en prévenant l'association de l'aminoacyl-ARNt au site accepteur situé sur la sous-unité 30S du ribosome <sup>(23)</sup>. Ils sont des antimicrobiens à large spectre actifs contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ainsi que contre les mycoplasmes, les chlamydies et les légionelles <sup>(10)</sup>. Les tétracyclines sont souvent utilisées pour traiter les infections mycoplasmiques chez la volaille, le porc et le bovin dû à leur faible coût <sup>(10)</sup>.

La résistance face aux tétracyclines chez les mycoplasmes urogénitaux humains est connue depuis plusieurs années <sup>(10)</sup>. Cette dernière a été associée à la présence du déterminant *tetM*, présent sur le transposon conjugatif Tn916, dont le produit se lie à la sous-unité 30S du ribosome pour empêcher la liaison de la tétracycline. Taraskina et *al.* (2002) avancent aussi l'hypothèse que cette acquisition de *tetM* serait une étape intermédiaire dans l'évolution de la résistance aux tétracyclines chez les mollicutes et que

la vraie résistance pourrait être médiée par un mécanisme alternatif encore inconnu <sup>(11, 98)</sup>. En effet, les auteurs ont remarqué que dans des cas d'infections récurrentes, les mycoplasmes présents ne possédaient pas le déterminant *tetM*. Dans le cas des mycoplasmes provenant des animaux, la résistance aux tétracyclines a été décrite chez plusieurs espèces, dont *M. hyopneumoniae* <sup>(37)</sup>. Toutefois, le mécanisme relié à cette résistance n'a pas encore été décrit.

### **2.3.3 Macrolides, lincosamides et pleuromutilines**

Les macrolides, lincosamides et pleuromutilines sont des agents bactériostatiques qui comprennent, entre autre, la tulathromycine, la tylosine, la tilmicosine, la lincomycine ainsi que la tiamuline. Ces antimicrobiens possèdent plusieurs points communs dont un même mode d'action, l'interférence avec la synthèse protéique, ainsi que des sites d'interaction avec le ribosome se chevauchant. Les molécules se lient à la sous-unité 50S du ribosome et bloquent l'élongation de la chaîne peptidique en dissociant trop tôt le peptidyl-ARNt du ribosome <sup>(108)</sup>. Les macrolides sont actifs contre les bactéries à Gram positif, quelques bactéries à Gram négatif et les anaérobies, alors que les lincosamides sont actifs contre plusieurs bactéries à Gram positif, les anaérobies et les mycoplasmes <sup>(78)</sup>. Les pleuromutilines sont utilisées seulement en médecine vétérinaire, surtout chez le porc. Ils ont le même spectre d'action que les macrolides mais possèdent une remarquable activité contre les mycoplasmes et les anaérobies <sup>(10)</sup>.

La résistance aux macrolides et lincosamides chez les mycoplasmes d'origine humaine ou animale commence à être documentée mais elle reste un phénomène rare. Stakenborg et al. (2005) ont observé des CMI's plus élevées chez un isolat de *M.*

*hyopneumoniae* provenant d'un porc à l'abattoir <sup>(91)</sup>. Le mécanisme relié à ce phénomène chez *M. hyopneumoniae* est une mutation ponctuelle supplémentaire A2058G dans le gène codant pour l'ARN ribosomal 23S, qui fait parti de la sous-unité 50S du ribosome. Cette mutation diminue l'affinité de l'antimicrobien pour l'ARNr 23S ce qui cause une baisse de l'activité antimicrobienne.

### **2.3.4 Fluoroquinolones**

Les quinolones sont une autre classe d'agents antimicrobiens utilisés chez le porc. La danofloxacin, l'enrofloxacin et la ciprofloxacin sont des molécules appartenant à cette classe. Se sont des agents bactéricides qui affectent les cellules bactériennes en inhibant les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV, qui sont importantes dans la synthèse de l'ADN <sup>(41)</sup>. En effet, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV permettent d'éliminer les supertours positifs créés lors de l'ouverture de l'ADN permettant à l'ADN polymérase de synthétiser les nouveaux brins. La liaison des quinolones aux topoisomérases réduit le nombre de superenroulements de l'ADN ce qui affecte l'arrangement spatial et induit des cassures. Suite à ce réarrangement, l'ADN est dégradé en petits fragments par des exonucléases qui reconnaissent les ouvertures nouvellement exposées. Dans le cas des fluoroquinolones, la cible principale semble être l'ADN gyrase chez les bactéries à Gram négatif tandis que pour les bactéries à Gram positif et les mycoplasmes, la cible privilégiée est la topoisomérase IV <sup>(109)</sup>. Les fluoroquinolones ont un large spectre d'action et sont beaucoup utilisées en médecine humaine et vétérinaire, chez les petits animaux.

Chez les mycoplasmes, deux mécanismes impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones ont été décrits. En médecine humaine, Raheison et *al.* (2002) ont démontré, chez des isolats de *M. hominis* résistants à la ciprofloxacine et au bromure d'éthidium, l'existence d'une pompe à efflux de type ABC <sup>(79)</sup>. Cette résistance serait médiée par les gènes *md1* et *md2* mais le rôle exact des protéines MD1 et MD2 reste à déterminer <sup>(80)</sup>. Le deuxième mécanisme, retrouvé chez les mycoplasmes d'origine humaine et vétérinaire, consiste en des mutations dans les quatre gènes cibles, soit *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Chez *M. hyopneumoniae*, des résistances aux fluoroquinolones ont été décrites par Vicca et *al.* (2007) <sup>(109)</sup>. Cinq isolats belges sur un total de 21 provenant d'un abattoir possédaient ces résistances. Celles-ci ont été attribuées à des mutations ponctuelles dans les gènes *parC*, qui code pour l'une des deux sous-unités de la topoisomérase IV, et *gyrA*, qui code pour l'une des deux sous-unités de l'ADN gyrase. Ces mutations diminuent l'affinité de l'antimicrobien pour sa cible. La mutation dans le gène *parC*, une transition C264A, est celle qui est retrouvée le plus souvent chez les isolats de *M. hyopneumoniae* à l'étude. La présence d'une mutation supplémentaire C635T dans le gène *gyrA* augmente la résistance envers les fluoroquinolones. Aucune mutation n'a été décrite dans cette étude pour les gènes *gyrB*, deuxième sous-unité de l'ADN gyrase, et *parE*, deuxième sous-unité de la topoisomérase IV <sup>(109)</sup>.

## **2.4 Techniques de génotypage pour *M. hyopneumoniae***

### **2.4.1 Électrophorèse en champ pulsé**

L'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis ou PFGE) est une technique utilisée pour séparer de longs brins d'ADN. Grâce à un courant électrique

alternatif, les longs brins d'ADN zigzaguent à travers le gel, ce qui facilite leur migration. Suite à la digestion d'un fragment d'ADN ou d'un génome par une enzyme de restriction, un patron de restriction spécifique à chaque isolat, mais variant selon l'enzyme, est généré. Ces patrons permettent de comparer et détecter les différences entre les souches <sup>(40)</sup>. Les avantages de cette méthode sont la reproductibilité et le haut taux de discrimination entre les isolats (98%). De plus, l'utilisation de deux enzymes de restriction permet d'obtenir des résultats complémentaires, donc une meilleure différenciation entre les isolats. D'un autre côté, le temps consacré ainsi que la quantité de travail demandée pour cette méthode sont en générale plus grands que pour les autres techniques de génotypage <sup>(93)</sup>. Selon une étude publiée en 2005, les motifs PFGE de deux enzymes de restriction, *Sall* et *ApaI*, montrent une étroite relation entre les isolats de *M. hyopneumoniae* provenant d'un même troupeau comparativement aux isolats de différents troupeaux. Ces résultats suggèrent donc que les isolats provenant d'un même élevage découlent d'un ou de quelques clones ancestraux <sup>(92)</sup>.

#### **2.4.2 Nombre variable de répétition en tandem du gène P97**

Le nombre variable de répétition en tandem (variable number of tandem repeats ou VNTR) du gène codant pour l'adhésine P97, est une technique qui permet de comparer le nombre de répétitions présent dans le gène codant pour la P97. Suite à l'amplification des répétitions en tandem, un motif de bandes, unique à chaque échantillon, est produit permettant la comparaison <sup>(43)</sup>. Celle-ci pourrait être une méthode facile et rapide puisqu'elle permettrait de faire le test sans une étape de culture. Pour ce qui est des désavantages, la méthode possède un faible taux de discrimination (91%) et d'autres loci doivent être inclus dans l'analyse. De plus, le nombre de répétitions peut changer rapidement. Dans le cas de *M. hyopneumoniae*, le nombre de gènes avec répétition en

tandem est limité et la stabilité de ces gènes doit être confirmée car plusieurs protéines spécifiques des mycoplasmes peuvent changer entre les différents passages en culture <sup>(93)</sup>. Par contre, cette méthode pourrait être une indication des capacités de colonisation des souches car un lien direct a été établi entre le nombre de répétition de la région RR1, contenu dans l'adhésine P97, et la capacité d'adhésion de la bactérie. En effet, un minimum de sept répétitions de la région RR1 sembleraient être nécessaire pour l'adhésion à des cellules épithéliales de la trachée <sup>(42)</sup>. Toutefois, dans une étude effectuée par Stakenborg et al. (2006), un isolat ne possédant que deux répétitions a été isolé de lésions de pneumonie. Ceci laisse à croire que d'autres facteurs de colonisation seraient présents chez *M. hyopneumoniae*. Selon cette même étude, le nombre de répétitions pour RR1 et RR2 était identique chez les isolats provenant d'un même élevage <sup>(93)</sup>.

### **2.4.3 Analyse des nombres variables de répétitions en tandem de multiple loci**

L'analyse des VNTR à de multiple loci (Multiple Loci VNTR Analysis ou MLVA) est une technique basée sur l'amplification d'une région contenant un élément répété en tandem. La taille des amplicons varie donc en fonction du nombre de répétitions en tandem présent dans la séquence amplifiée. Chez les bactéries, le nombre de répétition retrouvé à un locus varie selon la souche <sup>(46)</sup>. En analysant plusieurs loci, cela crée un profil numérique spécifique à chaque isolat et permet leur comparaison. Cette technique permet facilement les échanges entre les laboratoires puisque les données sont numériques. De plus, elle possède un très bon pouvoir discriminant et peut être exécuté rapidement <sup>(27)</sup>. Malheureusement, il ne peut y avoir développement d'un test que lorsque l'espèce bactérienne est séquencée (C. Marois, communication personnelle). En ce moment, il n'y a aucune étude publiée concernant l'utilisation de la MLVA pour le typage de *M.*

*hyopneumoniae*. Toutefois, en France, les résultats sembleraient montrer une hétérogénéité dans un même élevage ainsi qu'entre les élevages (C. Marois, communication personnelle).

#### **2.4.4 Polymorphisme de longueur de fragments amplifiés**

Le polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (Amplified-Fragment Length Polymorphism ou AFLP) est une méthode de typage du génome complet basée sur l'amplification sélective de fragments de restriction. Plus précisément, le génome à l'étude est traité avec une enzyme de restriction puis les fragments sont ligués à des adaptateurs dont la séquence est connue. Ensuite, des fragments sont amplifiés grâce à des amorces spécifiques aux adaptateurs puis ceux-ci sont analysés sur gel. Cette technique combine la puissance de la PCR au caractère informatif de l'analyse à l'aide d'enzymes de restriction<sup>(113)</sup>. Les motifs de bandes obtenus sont complexes avec différentes intensités, ce qui rend l'analyse plus difficile. De plus, cette technique demande une grande quantité de travail. Toutefois, la technique est reproductible et possède un très bon pouvoir discriminant (>99%)<sup>(52, 93)</sup>. Kokotovic et al. (1999) ont démontré par cette technique que des mycoplasmes humains, porcins et bovins avaient une grande diversité au niveau génétique<sup>(52)</sup>. Dans le cas de *M. hyopneumoniae*, les analyses AFLP ont montré une très grande hétérogénéité au sein des isolats sauf pour trois fermes, où tous les isolats étaient identiques<sup>(93)</sup>.

#### **2.4.5 Polymorphisme d'ADN amplifié aléatoirement**

Le polymorphisme d'ADN amplifié aléatoirement (Random Amplified Polymorphic DNA ou RAPD ou AP-PCR) est une réaction de PCR dans laquelle les segments d'ADN amplifiés ne sont pas choisis par l'expérimentateur, mais amplifiés au hasard. Ceci donnera

un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ ce qui permettra de différencier les souches <sup>(115)</sup>. La technique est facile d'exécution et possède un bon taux de discrimination (95%). D'un autre côté, le RAPD possède un faible taux de reproductibilité et ne donne qu'un faible nombre de bandes <sup>(93)</sup>. Selon Artiushin et al. (1996), *M. hyopneumoniae* est diversifié génétiquement et les isolats testés peuvent être divisés en au moins six sous-groupes épidémiologiques basés sur leur motif RAPD. Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec précaution car si deux produits PCR différents migrent au même niveau, cela peut empêcher de déterminer la variabilité dans une région <sup>(6)</sup>. Un fragment RAPD de 5000 pb a été associé aux souches de haute et de moyenne virulence alors qu'il était absent des souches de faible virulence. De plus amples études devront être effectuées pour voir si cette bande pourra être utilisée comme un marqueur de la virulence chez *M. hyopneumoniae* <sup>(110)</sup>. Stakenborg et al. (2006) ont montré que les isolats provenant d'un même élevage avaient des patrons RAPD identiques sauf pour quatre exceptions. D'un autre côté, plusieurs isolats provenant de différents troupeaux possédaient aussi des profils identiques <sup>(93)</sup>.

#### **2.4.6 PCR-Polymorphisme de longueur de fragments de restriction**

La PCR-polymorphisme de longueur de fragments de restriction (PCR-restriction fragment length polymorphism ou PCR-RFLP) du gène codant pour la lipoprotéine P146, est une nouvelle méthode de typage. Le principe est que la distance entre les sites de restriction varie entre les souches due à des insertions, délétions ou transversions. Ceci cause donc la variation de la longueur des fragments entre les souches et permet une discrimination des échantillons <sup>(97)</sup>. Cette méthode possède un haut taux de discrimination (>98%), est reproductible, facile d'exécution et ne nécessite pas de culture pure.

Malheureusement, le RFLP est limité par la faible proportion de la région génomique sous étude. Cette technique a démontré une grande diversité du gène P146 chez différents isolats de *M. hyopneumoniae*. Malgré cette variation, les isolats provenant d'une même ferme possédaient un profil identique dans 60% des cas <sup>(93)</sup>. Après comparaison de deux séquences d'ADN, les auteurs ont observé plusieurs régions répétées hautement variables situées dans la portion C-terminal de la protéine P146. Ces régions incluent une chaîne polysérine de longueur variable, une région de longueur variable riche en résidus proline et glutamine ainsi qu'une chaîne polyalanine variable située avant le codon stop de la protéine. Ces multiples régions variables seraient en grande partie la cause de cette très grande diversité du gène P146 <sup>(93)</sup>.

### **3. RÉSULTATS**

## **Contribution à l'article**

J'ai effectué toutes les manipulations à l'exception de la détection et de la quantification des virus SRRP, CVP2 et influenza, de la détection des bactéries en coinfection, des examens pathologiques ainsi que des calculs statistiques. J'ai également rédigé l'article dans son ensemble sauf la partie histopathologie.

### 3.1 Article scientifique

(en préparation pour le Canadian Journal of Veterinary Research)

Genetic diversity and antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates  
from Canada

Audrey Charlebois<sup>1</sup>, Pierre Hélie<sup>2</sup>, Carl A. Gagnon<sup>1</sup>, Marcelo Gottschalk<sup>1</sup> and Marie  
Archambault<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP) and Centre de  
recherche en infectiologie porcine (CRIP), <sup>2</sup>Department of Pathology and Microbiology,  
University of Montreal, Faculty of Veterinary Medicine, 3200 Sicotte Street, Saint-  
Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada

\*Corresponding author: Tel: 450-773-8521 ext 8679; Fax: 450-778-8108;

## Abstract

*Mycoplasma hyopneumoniae*, the causative agent of porcine enzootic pneumonia, is present in swine herds worldwide. However, little is known about the prevalence of this microorganism in Quebec and Canadian herds. A total of 160 swine lungs with lesions suggestive of enzootic pneumonia were recovered from two slaughterhouses. They were cultured and tested by PCR for *M. hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* and for the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the influenza virus, and the porcine circovirus type 2 (PCV2). Samples were also cultured for other commonly encountered swine pathogenic bacteria. Ninety percent of the samples were positive for *M. hyopneumoniae* (Real-time PCR) whereas 5.6% were positive only for *M. hyorhinis* (PCR). Among 25 selected *M. hyopneumoniae* positive lungs (culture or real-time PCR), 10 demonstrated a co-infection with *Pasteurella multocida*, 12 with *Streptococcus suis*, 9 with PCV2 and 2 with the PRRSV. Multiple loci variable number of tandem repeats analysis (MLVA) and PCR-restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) analyses showed a high diversity among field *M. hyopneumoniae* isolates. However, there seemed to be greater homogeneity within the same herd. The MLVA analysis also demonstrated that almost half of the field isolates presented less than 55% homology with the vaccine and reference strains used in this study. The absence of amplification of one locus (locus 1) of *M. hyopneumoniae* was significantly associated with lower numbers of bacteria and a lower severity of lung lesions. All *M. hyopneumoniae* isolates showed low to intermediate MICs against the antimicrobials tested. Isolates with intermediate MICs for tetracyclines, macrolides and lincosamides were tested for the presence of previously described resistance genes *tetM*, *ermB* and L4, L22 and 23S rRNA point mutations. None of these genes were

found, although one point mutation, G2057A, was identified. This mutation is responsible for the intrinsic resistance of *M. hyopneumoniae* against 14-membered macrolides. These results indicate that there is probably no antimicrobial resistance within these isolates.

**Keywords:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, porcine enzootic pneumonia, genotyping, antimicrobial resistance, MLVA, PCR-RFLP

## Introduction

*Mycoplasma hyopneumoniae* is present in the majority of swine herds around the world. It is the causative agent of porcine enzootic pneumonia<sup>(23)</sup>. Its importance is also linked to its ability to increase the severity of infections caused by viruses, such as porcine circovirus type 2 (PCV2), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and influenza virus<sup>(34, 48, 49)</sup>, as well as bacteria, such as *Pasteurella multocida*<sup>(9, 35)</sup>. When these pathogens are in coinfection with *M. hyopneumoniae*, severity of the pneumonia and of the respiratory lesions is increased. Moreover, *M. hyopneumoniae* can enhance the quantity and the persistence of PCV2 antigens and can increase the incidence of the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in swine<sup>(2-6)</sup>.

At the genomic level, a high heterogeneity has been demonstrated between *M. hyopneumoniae* isolates throughout the world using various typing techniques such as random amplified polymorphic DNA (RAPD)<sup>(2)</sup>, amplified fragment length polymorphism (AFLP)<sup>(24)</sup>, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)<sup>(41)</sup> and analysis of polyserine repeats motif of the LppS homolog P146<sup>(31)</sup>. However, the RAPD technique and the analysis of polyserine repeats both have weak reproductibility rates, and the AFLP and PFGE techniques are fastidious. Thus, new techniques based on DNA amplification have been developed in the last few years. The multiple loci variable number of tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA) and the PCR combined with restricted fragments length polymorphism (PCR-RFLP) are two PCR-based typing methods that can be easily performed, are reproducible and have a high discriminatory power (personal communication, C. Marois)<sup>(42)</sup>.

Very little antimicrobial resistance has been described for *M. hyopneumoniae*. In addition to natural resistance to antimicrobials targeting the cell wall and the folic acid pathway, resistance to tetracyclines, macrolides, lincosamides, and fluoroquinolones have previously been reported<sup>(20, 21, 40, 51, 52)</sup>. Nevertheless, most of the isolates tested in many countries are susceptible to the majority of the antimicrobials used for the treatment of enzootic pneumonia<sup>(21, 52-54)</sup>.

In Canada, however, little is known about *M. hyopneumoniae* isolates found throughout the country. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of *M. hyopneumoniae* isolated from single or mixed infections and to determine their antimicrobial susceptibilities.

## Materials and Methods

### Sample collection and histopathology

A total of 160 swine lungs presenting gross lesions suggestive of porcine enzootic pneumonia, originating from 48 farms, were recovered from two slaughterhouses located in the province of Quebec (Canada) from October 2008 to March 2009. The lungs were all scored for pneumonic lesions as previously described by Straw et al.<sup>(46)</sup>. For *M. hyopneumoniae* isolation, swabs from the trachea and lungs were re-suspended in 1 mL of buffered peptone water. Samples were taken from 25 *M. hyopneumoniae* positive lungs by real-time PCR (10 positive in culture and 15 randomly selected samples) for the detection of *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bacteriology laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal), PRRSV (PRRSV real-time PCR diagnostic test kit, Tetracore, Rockville, Maryland, USA), PCV2<sup>(14)</sup> and influenza viruses<sup>(38)</sup> (Virology laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal). A portion of each affected lobe was fixed in 10% neutral buffered formalin for histopathology examinations. A minimum of four and a maximum of five sections were embedded in paraffin, cut at 5µm, and stained with hematoxylin, eosin, phloxin B and saffron for light microscopic examination.

### *M. hyopneumoniae* isolation

For each sample, one hundred µl of the initial buffered peptone water dilutions was inoculated in 900 µl of Friis medium<sup>(13)</sup> supplemented with bacitracin (150 µg/mL)

(Sigma, Oakville, Canada), amphotericin B (2.5 µg/mL) (Sigma, Oakville, Canada), ampicillin (100 µg/mL) (Sigma, Oakville, Canada) and colistin (7.5 µg/mL) (Sigma, Oakville, Canada) to optimise *M. hyopneumoniae* recovery<sup>(30)</sup>. Tubes were incubated at 37°C until the culture developed an acid colour change or up to 30 days. The cultures were then ten-fold serially diluted up to 10<sup>-2</sup> and 10 µl of each dilution was plated onto NHS agar for purification. Plates were incubated à 37°C with 5 % CO<sub>2</sub> for 1-2 weeks. Isolated colonies were recovered, inoculated in 1 mL of Friis medium and incubated until color shift.

### **Real-time PCR**

Initial buffered peptone water dilutions were examined for the presence and the quantification of *M. hyopneumoniae* by real-time PCR. Primers and conditions were used as described by Strait et al.<sup>(45)</sup> with slight modifications. Briefly, DNA extraction was performed with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Canada). The Quantitect Probe PCR kit (Qiagen, Mississauga, Canada) was used for the reaction. The PCR mix contained 1X PCR buffer, 400 nM of each primer, 120 nM of TaqMan probe, 5 µl of DNA and completed to 25 µl with sterile water without RNase (Table 1). DNA amplification was carried out using a Cepheid SmartCycler<sup>®</sup> system (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) with the following conditions: 15 min at 95°C then 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C. *M. hyopneumoniae* ATCC 25095 was used as a positive control. For the quantification, Ct values of the samples were compared to the standard curve. The standard curve was elaborated with serial dilutions of known concentrations of DNA from

*M. hyopneumoniae* ATCC 25095. The detection limit of this technique was 1000 genomes/mL.

### **Conventional PCR**

Initial buffered peptone water dilutions and shifted cultures were examined for the presence of *M. hyopneumoniae* in a single PCR and for *M. hyorhinis* and *Mycoplasma flocculare* in a multiplex PCR. Primers and conditions were as described by Stakenborg et al.<sup>(39)</sup> with slight modifications (Table 1). Briefly, DNA extraction was performed with the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Mississauga, Canada) following the "DNA purification from tissues" protocol. The PCR mixture contained 1X PCR buffer, 200 µM of dNTPs, 160 nM of each forward primer, 240 nM of the reverse primer, 1 unit of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ontario, Canada), and 5 µL of the DNA template in a total volume of 50 µl (Table 1). Amplification was performed in a Whatman Biometra thermocycler (Montreal Biotech Inc, Quebec, Canada). The reaction procedure consisted of 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, primer annealing at 54.6°C for 15 sec, and extension at 68°C for 1 min. A volume of 10 µl of each PCR product was separated for 30 min at 150 V on a 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide. *M. hyopneumoniae* ATCC 25095, *M. hyorhinis* ATCC 17981 and *M. flocculare* ATCC 27399 were used as positive controls.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

Antimicrobial susceptibilities were determined by minimum inhibitory concentration (MIC) for 18 antimicrobials using Sensititre<sup>®</sup> plates (#BOPO6F, Nova Century Scientific,

Ontario, Canada) as described by Wu and al. <sup>(54)</sup> without the use of *M. hyorhinis* antibodies. Briefly, 50 µl of a *M. hyopneumoniae* culture at a concentration of 10<sup>3</sup> CCU/mL was inoculated in each well. The plates were covered with a transparent adhesive film and incubated at 37°C until the positive control showed growth. Strains *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality controls. There are no breakpoints available from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) for *M. hyopneumoniae*.

### **PCR for antimicrobial resistance genes**

Cultures with intermediate MICs for tetracyclines, macrolides and lincosamides were tested for the presence of previously described resistance genes <sup>(14-18)</sup>. The 23S rRNA gene and the ribosomal proteins L4 and L22 were amplified by PCR, sequenced, and analysed as described elsewhere <sup>(40)</sup>. In addition, the samples were examined by PCR for the presence of the *tetM* and *ermB* genes <sup>(10, 36, 47)</sup>. The positive controls for these PCR were: *M. hyopneumoniae* ATCC 25934 for the amplification of L4, L22 and 23S rRNA genes, *Escherichia coli* PJ13 for the *tetM* gene and *Staphylococcus aureus* CCRI-1317 for the *ermB* gene.

### **MLVA**

DNA extracts from the initial buffered peptone water dilutions and the isolates were analyzed by MLVA to determine their genotype. Primers and conditions for locus P97-RR1 and locus P97-RR2 were used as described by Stakenborg et al. <sup>(42)</sup> with a few

modifications. The PCR mixture contained 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM of dNTPs, 400 nM of each primer (Table 1), 1 units of Taq DNA polymerase (New England Biolabs), and 5 μL of the DNA template in a total volume of 50 μL. Amplification was performed in a Whatman Biometra thermocycler. The reaction procedure consists of 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, primer annealing at 54°C for 30 sec, and extension at 72°C for 1 min. Primers and conditions for locus 1 and 2 were provided by C. Marois, Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), France. Ten μL of each PCR product was run for 40 min at 125 V on a 2% agarose gel which was stained with ethidium bromide for 30 min. *M. hyopneumoniae* ATCC 25934 was used as a positive control.

### **PCR-RFLP analysis of the p146 encoding gene**

PCR-RFLP analysis was performed as described by Stakenborg et al. <sup>(42)</sup>. Briefly, the p146 gene was amplified in the following conditions: 1x PCR buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM of dNTPs, 20 pmol of both primers (Table 1) and 2.5 U of Taq DNA polymerase (New England Biolabs). The amplification reaction was 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, primer annealing at 52.5°C for 30 sec, and extension at 68°C for 3 min followed by 15 min at 68°C. Seventeen μL of the final PCR product was digested for 3 h at 37°C in a mix containing 10 U of restriction enzyme *AluI* (New England Biolabs, Ontario, Canada). Restricted fragments were separated for 60 min at 120 V on a 2% agarose gel which was then stained with ethidium bromide for 30 min.

### **Cluster and data analysis**

Digital images of PCR-RFLP gels and MLVA profiles, created from the number of repeats for each of the VNTR loci, were imported to the BioNumerics software (Applied Maths, Texas, USA). The unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) was used for clustering. For PCR-RFLP, bands were marked following standardisation using the TrackIt 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Ontario, Canada). Band position tolerance and optimisation were set to 1 %. Bands smaller than 175 pb were omitted <sup>(42)</sup>. The discriminatory power of the MLVA and PCR-RFLP techniques were calculated by using the Simpson's index of diversity <sup>(19)</sup>. Two different indexes were calculated for each technique, one including all *M. hyopneumoniae* isolates and one excluding all isolates demonstrating an identical fingerprint and originating from a single herd.

Exact Chi2 test was performed to evaluate the relationships between *M. hyopneumoniae* and other pathogens found in co-infections. Student "t" test was performed to evaluate the relationship between the absence of amplification of locus 1 and the lower concentration of bacteria and percentage of lesions. All statistics were done with the SAS software v.9.1. (Cary, N.C.). A  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## Results

### Conventional and real-time PCR analysis

Ninety percent of the tested lungs (144/160) were positive by real-time PCR for *M. hyopneumoniae* with a concentration of bacteria ranging from  $1.17 \times 10^5$  to  $3.37 \times 10^9$  genomes per mL. Sixteen of all the samples (10%) were positive for *M. hyorhinis* and 14 (8.8%) for *M. flocculare* in multiplex PCR. Of these, two (1.25%) demonstrated a mixture of the three mycoplasmas. Seven lungs (4.4%) were positive for *M. hyorhinis* only and none were positive for *M. flocculare* only. No mycoplasmas were detected in seven lungs (4.4%).

### Bacterial isolation and co-infection

A total of 10 *M. hyopneumoniae* and 11 *M. hyorhinis* isolates were recovered from the 160 cultured lungs. All *M. hyopneumoniae* isolates were in mixed culture with *M. hyorhinis*. The isolates were from the slaughterhouse #2 only (24% of recovery for slaughterhouse #2). Among 25 *M. hyopneumoniae* positive lungs were selected (10 positive on culture and real-time PCR and 15 randomly selected positive on real-time PCR only), 9 demonstrated co-infection with *M. hyorhinis*, 12 with *S. suis* and 10 with *P. multocida*. In addition, nine demonstrated a co-infection with PCV2, two with PRRSV and none with influenza (Table 2).

### Pathology and Histopathology

In these selected *M. hyopneumoniae* positive lungs, the pneumonic lesion scores ranged from 2 to 84 % and lesions were confirmed by histopathological examination. Mild post-

mortem changes were present in all samples, although preservation of tissues was adequate. Lymphoid hyperplasia of the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) was moderate to marked, except in 3 pigs for which it was mild. Evidence of compression of bronchioles by lymphoid nodules/follicles was sometimes present. In all but one pig, hyperplasia was associated with suppurative bronchitis/bronchiolitis or bronchopneumonia, mucus being admixed with the neutrophils in the bronchi of a few pigs. Intra-alveolar edema and macrophages were observed multifocally, the number of macrophages being moderate to high in 14/25 pigs, and low in the others. Bronchiolitis obliterans was observed in 22/25 pigs, usually not marked or extensive except in 3 pigs where it was prominent. Finally, in 9/25 pigs, a few to several small alveolar and/or bronchiolar granulomata associated with plant material were present.

## **MLVA**

MLVAs were performed on *M. hyopneumoniae* cultures as well as directly on all positive lungs. Results obtained from a culture and the originating lungs were identical. No amplification was observed for *M. hyorhinis* and *M. flocculare*. A total of 87 MLVA types were identified from the lungs and separated in three clusters, the first two containing the majority of the isolates (Figure 2). The first cluster contained also all three reference strains and all vaccine strains. When all the isolates with identical fingerprints and originating from the same farm were excluded, the Simpson's index of diversity was of 0.997, which is a high discrimination rate. When all *M. hyopneumoniae* isolates were taken onto account, the index was of 0.991, which is lower than the first index but still is a high discrimination

rate. Seventeen isolates were non-typeable due to the incapacity to amplify one of the four loci.

### **PCR-RFLP analysis of the p146 encoding gene**

PCR-RFLPs were also performed on *M. hyopneumoniae* cultures as well as directly on all positive lungs and the results obtained from a culture and the originating lungs were indistinguishable. There was no amplification for *M. hyorhinitis* and *M. flocculare*. Samples from all positive lungs were separated into 83 different patterns and regrouped in five clusters (Figure 3). The first cluster contained all reference strains. The Simpson's index of diversity was of 0.986, which is an average discrimination rate, when isolates with the same fingerprint and isolated from the same farm were excluded. When all *M. hyopneumoniae* isolates were taken into account, the index was of 0.971, which is also average. Forty-one samples and the vaccine strains were non-typeable because of the absence of amplification of the P146 gene.

### **Antimicrobial susceptibilities and resistance genes**

Antimicrobial susceptibility testing was performed on mixed cultures (all with *M. hyorhinitis*) due to the inability to separate isolates on solid medium. All cultures demonstrated high MICs to the naturally resistant antimicrobials: ampicillin (>16 µg/mL), ceftiofur (>8 µg/mL), penicillin (>8 µg/mL), sulfadimethoxine (>256 µg/mL) and trimethoprim/ sulfamethoxazol (>2/38 µg/mL). However, low MICs were obtained for spectinomycin (≤ 8 µg/mL), tiamulin (≤ 0.5 µg/mL), danofloxacin (≤0.125 µg/mL), enrofloxacin (≤0.125 µg/mL) and tulathromycin (≤ 1 µg/mL). The MICs for the other

antimicrobials varied from 0.5 µg/mL to 16 µg/mL depending on the isolate (Table 3). For those cultures with slightly higher MICs to antimicrobials (chlortetracycline, 2 and 4 µg/mL; florfenicol, 0.5 µg/mL; gentamicin, 2 µg/mL; neomycin, 8 and 16 µg/mL; oxytetracycline, 1 µg/mL and tylosin, 2 µg/mL), the antimicrobial resistance genes *tetM* and *ermB*, and point mutations in L4, L22 and 23S rRNA genes were not detected by PCR. However, the G2057A mutation was present in all isolates.

## Discussion

As *M. hyopneumoniae* is a fastidious organism, its isolation may be difficult. The mean rate of isolation is commonly between 15 and 30 % (personal communication, C. Marois, AFSSA), which is higher than the rate found in this study. It is interesting to note that no mycoplasma were isolated from slaughterhouse # 1 in our study. The major difference between the two slaughterhouses is the use of asphyxiation with CO<sub>2</sub> instead of electrocution before exsanguination at establishment # 2. It is tempting to speculate that electrocution may have affected on the recovery of *M. hyopneumoniae* isolates from establishment #1. Similarly, Chen et al. (2003)<sup>(7)</sup> could not isolate *M. hyopneumoniae* from animals which had been electrocuted. The use of antimicrobials before slaughtering and the vaccinal status of the pigs may also have influenced the recovery of mycoplasmas, although this information was not available.

*M. hyopneumoniae* is often associated with other infectious agents, bacteria or viruses, in order to initiate the porcine respiratory disease complex<sup>(22)</sup>. The association between *M. hyopneumoniae* and *P. multocida* has been described elsewhere<sup>(1, 9, 35)</sup>, although the proportions of samples positive for *P. multocida* that were reported were lower (8.9 to 35 %) than in this study. *S. suis* is often recovered, in 28.9 to 98 % of swine lungs<sup>(27, 29, 35)</sup>. To date, there is no report which describes the interaction between *M. hyopneumoniae* and *S. suis* in pigs at the slaughterhouse. The absence of positive samples for *H. parasuis* can be explained by the fact that these infections are mainly encountered in nurseries<sup>(33)</sup>. It can also be explained by the fragility of the bacterium<sup>(37)</sup>. The storage of swabs at -70°C before culture detection could have resulted in bacterial damage.

In a study from Germany, PRRSV and PCV2 were detected in 34.7 % and 78.2 % of lungs with lesions of pneumonia, which is higher than what is seen in the present study<sup>(35)</sup>. In 2007, Dorr et al.<sup>(12)</sup> detected *M. hyopneumoniae* in 33 % of swine lungs positive with PCV2. These results may be explained by the fact that the swine in this study were 8 months of age. PCV2 infections are most commonly found in pigs around 4 to 8 weeks of age; whereas PRRS infections are mostly commonly found at 5 to 12 weeks of age<sup>(8, 18)</sup>. The absence of swine influenza virus may be explained by the fact that, as SIV virus production mainly occurs at the beginning of the infection (< 48 h)<sup>(25)</sup>, clinical signs can persist up to two weeks, and sick pigs are not shipped to slaughterhouses, there is no remaining virus when the pigs are processed.

The percentage of positive lungs by PCR is higher than what was previously reported by other groups<sup>(32, 35)</sup>. In addition to using a real-time PCR technique, lungs in this study were selected based on the presence of pneumonia lesions whereas others examined lungs both with and without lesions, combined with conventional PCR as detection technique. For these studies, the mean number of positive samples was around 25 %. Verdin et al. (2000) found concentrations between  $10^4$  and  $10^8$  *M. hyopneumoniae* cells per mL of clinical specimen, which is lower than the results in this study<sup>(50)</sup>. In a study from Spain, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis* and *M. flocculare* were isolated from 33 %, 37 % and 24 % of lungs with enzootic pneumonia, respectively<sup>(3)</sup>. The results in the present study, when compared to theirs, seem lower for the latter two mycoplasmas but much higher for *M. hyopneumoniae*. The isolation of *M. hyorhinitis* alone from lungs with enzootic pneumonia has been reported once in Taiwan<sup>(26)</sup> but not, to our knowledge, in Canada.

MLVA analysis was performed on both lung samples and *M. hyopneumoniae* cultures to determine whether genotyping could be done directly on lung tissues. Patterns obtained from cultures were identical to those from the lungs, indicating that this technique could be used without the culture step. This procedure could be appropriate for epidemiological studies since results can be obtained rapidly. Overall, 45 % of the isolates had less than 55 % homology with vaccinal and reference strains. It was previously reported that beneficial effects conferred by current commercial vaccines are variable among infected herds. Different factors could explain this variation such as antigenic differences between field strains and vaccine strains <sup>(28)</sup>. Fifteen isolates had no repetition for the locus 1 and these lungs samples presented between 100 and 10,000 times fewer bacteria than when locus 1 was present. The absence of the locus 1 was significantly correlated to lower concentrations of bacteria and percentages of lesions. For the group of isolates possessing the locus 1, the mean concentration of *M. hyopneumoniae* was higher ( $p < 0.0001$ ) and the severity of lesions was greater ( $p < 0.0001$ ); suggesting that the locus 1 of *M. hyopneumoniae* may be associated with a higher virulence in field isolates. The gene amplified at the locus 1 codes for a hypothetical protein. On the other hand, the p146 encoding gene was non detectable in many field isolates from Canada. In this study, only 71.5 % of the samples were typeable by the PCR-RFLP analysis. In contrast to a previous study <sup>(42)</sup>, in our hands, this technique has a lower discriminatory power than the MLVA. However, the authors used only 2 loci for the MLVA whereas the present report used 4 loci, thus enhancing the discriminatory power of the MLVA.

Similarly to previously reported data, when comparing patterns of the isolates, using MLVA or PCR-RFLP, there is an heterogeneity between herds <sup>(2, 31, 41)</sup>. However, when isolates from the same farm were compared, the outcome depended on the farm, demonstrating that some isolates were different and others identical. These results were confirmed by the Simpson indexes of diversity. These findings may be due to the different production systems or the proximity of other farms. The all-in/all-out production system is known to result in a uniform population of bacteria compared to the traditional production system which lead to a more heterogeneous group of isolates <sup>(28)</sup>. The proximity of other farms can lead to the introduction of new strains of *M. hyopneumoniae* in a farm, resulting in more heterogeneity among isolates. Airborne transmission seems to be a mechanism of reinfection for this mycoplasma and may occur between farms being up to 4.7 km apart <sup>(11, 16, 22, 43)</sup>. Relations between the variability of isolates from simple and mixed infections with the PRRSV and/or the PCV2 and/or the influenza virus were assessed. No pattern was associated to the presence of viruses. Moreover, no relation was found between the clusters determined by MLVA and PCR-RFLP.

High MICs to ampicillin, ceftiofur, penicillin, sulfamethoxine and trimethoprim/sulfamethoxazol were consistent with the literature as mollicutes are naturally resistant to  $\beta$ -lactams, sulfonamides and trimethoprim, since they lack a cell wall and do not produce folic acid <sup>(4, 5)</sup>. For the other antimicrobials tested, the low MICs obtained are in agreement with results of other investigations <sup>(5, 15, 52, 54)</sup>. Hannan et al. (1997) suggested that mycoplasma isolates having MIC levels  $> 16 \mu\text{g/mL}$  for tetracyclines should be defined as resistant to these antimicrobials <sup>(17)</sup>. All MICs were done on mixed cultures due

to the incapacity of purifying them. The use of anti-*M. hyorhinis* antibodies could have inhibited the growth of this mycoplasma. Moreover, the presence of the two mycoplasmas in the different wells could have been determined by PCR. Even though the mechanism for tetracycline resistance is not yet known for *M. hyopneumoniae*, the *tetM* gene has been associated with this resistance in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* <sup>(6)</sup>. For macrolides and lincosamides, two point mutations in the 23S rRNA gene, G2057A and A2058G, have been associated with MICs > 64 µg/mL except for tylosin, which was between 8-16 µg/mL <sup>(40)</sup>. The G2057A mutation was observed in all *M. hyopneumoniae* isolates, conferring a natural resistance against 14-membered macrolides <sup>(44)</sup>. Fluoroquinolone resistance has been linked to two point mutations, a C264A mutation in the *parC* gene and a C635T mutation in the *gyrA* gene. The isolates showing these mutations demonstrated MIC levels > 16 µg/mL for flumequine and > 1 µg/mL for enrofloxacin <sup>(51)</sup>.

In this study, no significant association was found between the presence of PRRSV, *S. suis*, or PCV2 and the severity of pneumonia lesions (p=0.12, p=0.41 and p=0.40 respectively). This is in contrast with the findings of Thacker et al. (1999) <sup>(3)</sup> where pigs infected with both *M. hyopneumoniae* and PRRSV had greater lesion severities than those infected with only one of the two pathogens. This discrepancy could be explained by the fact that swine lungs were selected at the slaughterhouse, where pigs are in average 8 months of age, whereas Thacker et al. selected lungs from swine of 6 to 7 weeks of age, which better reflects situation on the farm (4 to 8 weeks of age) <sup>(37)</sup>.

In conclusion, this study showed that *M. hyopneumoniae* isolates from Canada differ between herds and, in some cases, even within the same herd. Moreover, the isolates were separated by the MLVA into two major distinctive groups (< 55% homology), one group containing all reference and vaccinal strains. The absence of amplification of locus 1 was significantly associated with lower levels of *M. hyopneumoniae* and severity of lesions. The results also indicated that there was no acquired antimicrobial resistance in the tested isolates. Finally, this article report for the first time in Canada, the isolation of *M. hyorhinis* alone in lung lesions of enzootic pneumonia.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Pfizer Animal Health, the "Fédération des Producteurs de Porcs du Québec" (FPPQ) and the "Centre de Recherche en Infectiologie Porcine" (CRIP). The authors are grateful to C. Marois and Dr. M. Kobisch for providing us with *M. hyopneumoniae* isolates and to Guy Beauchamp for his expertise in statistics.

## References

1. **Amass, S. F., L. K. Clark, W. G. van Alstine, T. L. Bowersock, D. A. Murphy, K. E. Knox, and S. R. Albregts.** 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. Journal of the American veterinary medical association **204**:102-107.
2. **Artiushin, S., and F. C. Minion.** 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. Int J Syst Bacteriol **46**:324-8.
3. **Assuncao, P., C. De la Fe, B. Kokotovic, O. Gonzalez, and J. B. Poveda.** 2005. The occurrence of mycoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria (Spain). Vet Res Commun **29**:453-62.
4. **Bébéar, C. M., B. de Barbeyrac, S. Pereyre, and C. Bébéar.** 2007. Mycoplasmes et Chlamydiae: Sensibilité et résistance aux antibiotiques. Revue francophone des laboratoires:77-85.
5. **Bébéar, C. M., and I. Kempf.** 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, p. p.535- p.568. In A. a. G. B. Blanchard (ed.), Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Horizon bioscience, Wymondham.
6. **Blanchard, A., D. M. Crabb, K. Dybvig, L. B. Duffy, and G. H. Cassell.** 1992. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: *tetM* confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. FEMS Microbiol Lett **74**:277-81.

7. **Chen, H. H., J. H. Lin, H. P. Fung, L. L. Ho, P. C. Yang, W. C. Lee, Y. P. Lee, and R. M. Chu.** 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Can J Vet Res* **67**:283-90.
8. **Cho, J. G., and S. A. Dee.** 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* **66**:655-62.
9. **Ciprian, A., C. Pijoan, T. Cruz, J. Camacho, J. Tortora, G. Colmenares, R. Lopez-Revilla, and M. de la Garza.** 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* **52**:434-8.
10. **De Leener, E., A. Martel, A. Decostere, and F. Haesebrouck.** 2004. Distribution of the *erm (B)* gene, tetracycline resistance genes, and *Tn1545*-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* **10**:341-5.
11. **Dee, S., S. Otake, S. Oliveira, and J. Deen.** 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* **40**:39.
12. **Dorr, P. M., R. B. Baker, G. W. Almond, S. R. Wayne, and W. A. Gebreyes.** 2007. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *J Am Vet Med Assoc* **230**:244-50.
13. **Friis, N. F.** 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* **27**:337-9.

14. **Gagnon, C. A., J. R. del Castillo, N. Music, G. Fontaine, J. Harel, and D. Tremblay.** 2008. Development and use of a multiplex real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of Porcine circovirus-2 genotypes 2a and 2b in an epidemiological survey. *J Vet Diagn Invest* **20**:545-58.
15. **Godinho, K. S.** 2008. Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Vet Microbiol* **129**:426-32.
16. **Goodwin, R. F.** 1985. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet Rec* **116**:690-4.
17. **Hannan, P. C., H. M. Windsor, and P. H. Ripley.** 1997. *In vitro* susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor), tiamulin and enrofloxacin and the *in vitro* development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Res Vet Sci* **63**:157-60.
18. **Harding, J., Edward G. Clark, John H. Strokappe, Phil I. Willson and John A. Ellis.** 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. *Swine Health and Production* **6**:249-254.
19. **Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology* **26**:2465-2466.
20. **Inamoto, T., H. Takahashi, K. Yamamoto, Y. Nakai, and K. Ogimoto.** 1994. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. *J Vet Med Sci* **56**:393-4.

21. **Kobayashi, H., T. Morozumi, G. Munthali, K. Mitani, N. Ito, and K. Yamamoto.** 1996. Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1030-2.
22. **Kobisch, M.** 2007. Les affections liées aux mycoplasmes chez le porc. *Le nouveau praticien vétérinaire*:64-67.
23. **Kobisch, M., and N. F. Friis.** 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* **15**:1569-605.
24. **Kokotovic, B., N. F. Friis, J. S. Jensen, and P. Ahrens.** 1999. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *Journal of clinical microbiology* **37**:3300-3307.
25. **Kothalawala, H., M. J. Toussaint, and E. Gruys.** 2006. An overview of swine influenza. *Vet Q* **28**:46-53.
26. **Lin, J. H., S. P. Chen, K. S. Yeh, and C. N. Weng.** 2006. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet Microbiol* **115**:111-6.
27. **MacInnes, J. I., M. Gottschalk, A. G. Lone, D. S. Metcalf, S. Ojha, T. Rosendal, S. B. Watson, and R. M. Friendship.** 2008. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* **72**:242-8.
28. **Maes, D., J. Segales, T. Meyns, M. Sibila, M. Pieters, and F. Haesebrouck.** 2007. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*.

29. **Marois, C., R. Cariolet, H. Morvan, and M. Kobisch.** 2007. Transmission of pathogenic respiratory bacteria to specific pathogen free pigs at slaughter. *Vet Microbiol.*
30. **Marois, C., J. Le Carrou, M. Kobisch, and A. V. Gautier-Bouchardon.** 2007. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet Microbiol* **120**:96-104.
31. **Mayor, D., F. Zeeh, J. Frey, and P. Kuhnert.** 2007. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Vet Res* **38**:391-8.
32. **Morrison, R. B., C. Pijoan, H. D. Hilley, and V. Rapp.** 1985. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med* **49**:129-137.
33. **Oliveira, S., and C. Pijoan.** 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol* **99**:1-12.
34. **Opriessnig, T., E. L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X. J. Meng, and P. G. Halbur.** 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* **41**:624-40.
35. **Palzer, A., M. Ritzmann, G. Wolf, and K. Heinritzi.** 2008. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec* **162**:267-71.
36. **Poeta, P., D. Costa, Y. Saenz, N. Klibi, F. Ruiz-Larrea, J. Rodrigues, and C. Torres.** 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors

- in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**:396-402.
37. **Rapp-Gabrielson, V. J.** 1999. *Haemophilus parasuis*, p. 475-481. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (ed.), Diseases of swine.
  38. **Spackman, E., D. A. Senne, T. J. Myers, L. L. Bulaga, L. P. Garber, M. L. Perdue, K. Lohman, L. T. Daum, and D. L. Suarez.** 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* **40**:3256-60.
  39. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, H. Imberechts, J. Peeters, A. De Kruif, F. Haesebrouck, and D. Maes.** 2006. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. *Vet Res Commun* **30**:239-47.
  40. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, D. Maes, F. C. Minion, J. Peeters, A. De Kruif, and F. Haesebrouck.** 2005. Characterization of *In Vivo* acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microb Drug Resist* **11**:290-4.
  41. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck.** 2005. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* **109**:29-36.
  42. **Stakenborg, T., J. Vicca, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, F. Haesebrouck, and P. Butaye.** 2006. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. *J Microbiol Methods* **66**:263-75.

43. **Stark, K. D., H. Keller, and E. Eggenberger.** 1992. Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. *Vet Rec* **131**:532-5.
44. **Stemke, G. W., Y. Huang, F. Laigret, and J. M. Bove.** 1994. Cloning the ribosomal RNA operons of *Mycoplasma flocculare* and comparison with those of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* **140 (Pt 4)**:857-60.
45. **Strait, E. L., M. L. Madsen, F. C. Minion, J. Christopher-Hennings, M. Dammen, K. R. Jones, and E. L. Thacker.** 2008. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Clin Microbiol* **46**:2491-8.
46. **Straw, B., Lennart Backstrom, Allen D. Leman.** 1986. Examination of swine at slaughter. Part 2. Findings at slaughter and their significance. *The compendium on continuing education* **8**:S106-S110.
47. **Sutcliffe, J., A. Tait-Kamradt, and L. Wondrack.** 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1817-24.
48. **Thacker, E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech, and B. J. Thacker.** 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J Clin Microbiol* **37**:620-7.
49. **Thacker, E. L., B. J. Thacker, and B. H. Janke.** 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol* **39**:2525-30.

50. **Verdin, E., M. Kobisch, J. M. Bove, M. Garnier, and C. Saillard.** 2000. Use of an internal control in a nested-PCR assay for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection and quantification in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Probes* **14**:365-72.
51. **Vicca, J., D. Maes, T. Stakenborg, P. Butaye, F. Minion, J. Peeters, A. de Kruif, A. Decostere, and F. Haesebrouck.** 2007. Resistance Mechanism Against Fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates. *Microb Drug Resist* **13**:166-170.
52. **Vicca, J., T. Stakenborg, D. Maes, P. Butaye, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck.** 2004. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4470-2.
53. **Wu, C. C., T. R. Shryock, T. L. Lin, M. Faderan, and M. F. Veenhuizen.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Microbiol* **76**:25-30.
54. **Wu, C. C., T.R. Shryock, T.L. Lin and M. Fleck.** 1997. Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae in vitro*. *Swine Health and Production* **5**:227-230.

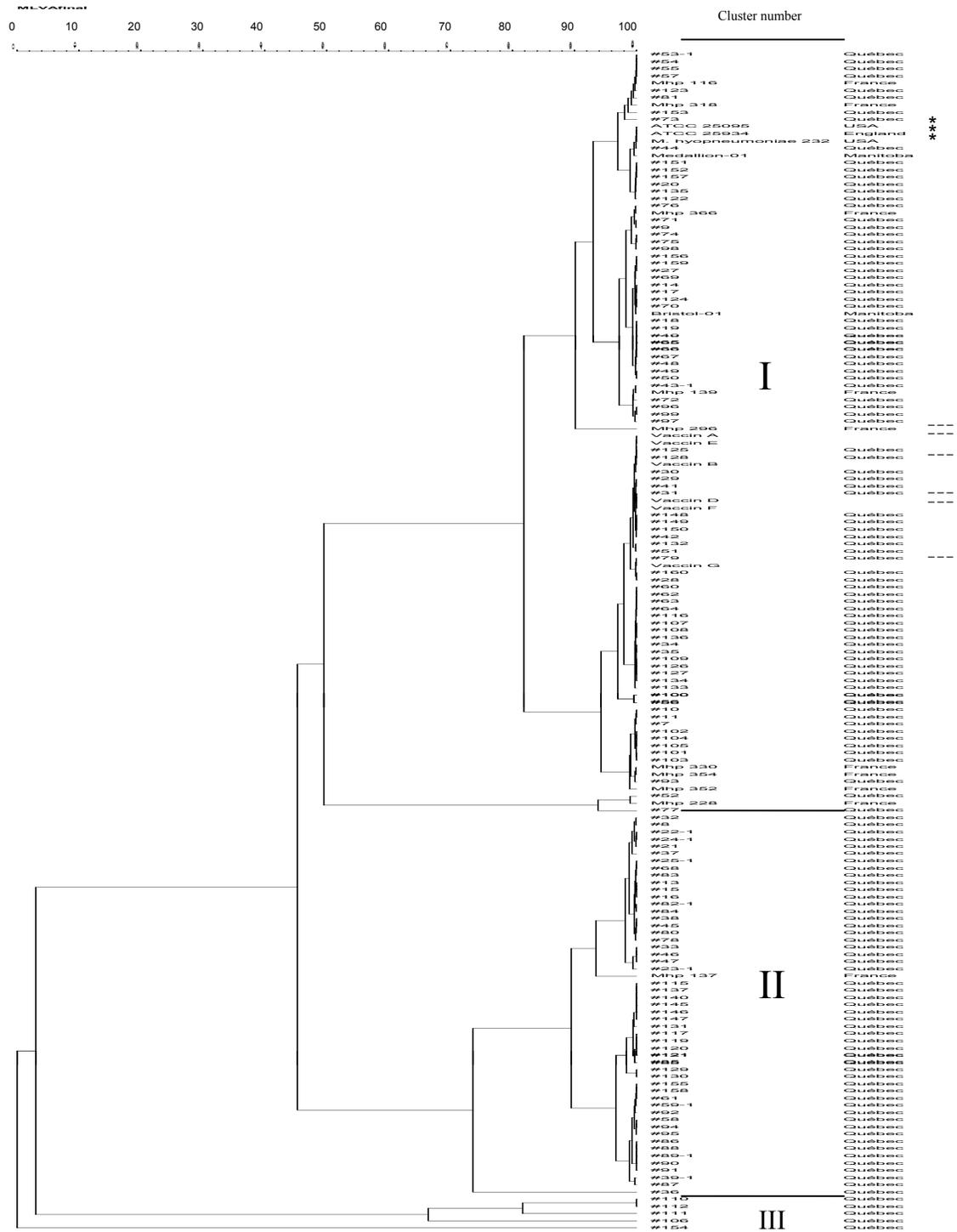
**Table 1:** PCR primers used in this study.

PCR	Primers and probes	Sequence (5`-3`)	Products Length (bp)	Reference
Real-time PCR	Mhp 165 F	TGCCCAGGATATTTCCGATCCAGA	132	Strait et al. <sup>(45)</sup>
	Mhp 165 R	AGACCTGAAGAACGTGCATGGAGA		
	Mhp 165 P	Cy5-GCGATCTCAACAAATACCGGGATTGGT-BHQ-2		
Multiplex PCR	M-HYOP-F	TTCAAAGGAGCCTTCAAGCTTC	1000	Stakenborg et al. <sup>(39)</sup>
	M-HYOR-F	CGGGATGTAGCAATACATTGAG	1129	
	M-FLOC-F	GGGAAGAAAAAATTAGGTAGGG	754	
	M-REV	AGAGGCATGATGATTGACGTC		
MLVA	Locus1-F	AAACTCCAAAAAATCGATAAAAA	18	Marois et al. (personal communication)
	Locus1-R	CTTTTTTTCGCGTAATAAGGTTAT		
	Locus2-F	TTTGTGCTTGGTAAAGTTAAATT	12	
	Locus2-R	AGAGATTACAACCAAGAAGCAA		
	P97-RR1-F	GAAGCTATCAAAAAAGGGGAAACTA	15	Stakenborg et al. <sup>(42)</sup>
	P97-RR1-R	GGTTTATTGTAAAGTAAAAGCCAG		
	P97-RR2-F	AGCGAGTATGAAGAACAAGAA	30	
P97-RR2-R	TTTTTACCTAAGTCAGGAAGG			
RFLP	P146-F	GCTTCCATGTTTGGCATT	2724	Stakenborg et al. <sup>(42)</sup> and this article
	P146-R	CCACAGACAAGTTCTTCGCA		

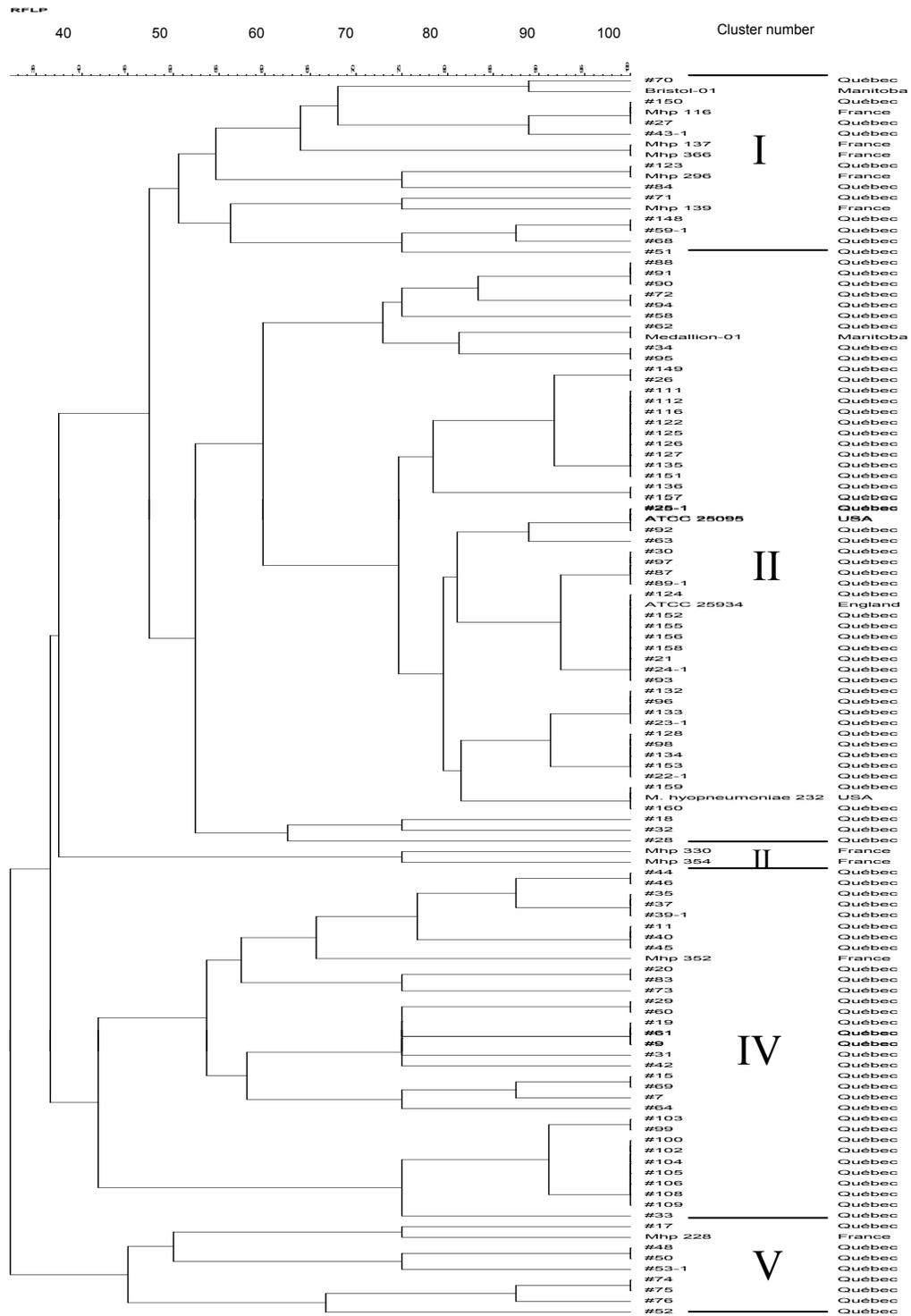
**Table 2:** Presence of *M. hyorhinis* and different viral and bacterial pathogens in 25 *M. hyopneumoniae* positive lungs samples.

Severity of lesions (%)	Isolate identification number	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> quantification (genomes/ ml)	Number of cases positive for:								
			<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	PRRS <sup>*</sup>	PCV2 <sup>*</sup>	SIV <sup>*</sup>	<i>Streptococcus suis</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus suis</i>
≥ 40 %	Mhp101		+	-	-	-	+	+	-	-	-
	#084		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mhp105		+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Mhp112	9,20E+06	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	#091	to	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	#056	1,20E+09	-	+	+	-	-	+	-	-	-
	#014		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#070		-	-	+	-	-	+	-	-	-
	Mhp122		-	-	-	-	-	+	-	-	-
			3	2	2	0	3	5	0	0	0
< 39 %	#028		-	-	+	-	+	+	-	-	-
	#042		-	-	+	-	-	-	-	-	-
	#021		-	-	+	-	-	-	-	-	-
	#077		-	-	+	-	+	-	-	-	-
	Mhp125		+	-	-	-	+	-	-	-	-
	Mhp127		+	-	-	-	-	+	-	-	-
	#119	1,14E+06	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Mhp135	to	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	#035	1,59E+09	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	#049		-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Mhp149		+	-	+	-	-	+	-	-	-
	Mhp123		+	-	-	-	+	+	-	-	-
	Mhp132		+	-	+	-	+	-	-	-	-
	#007		-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#063		-	-	-	-	-	-	-	-	-
#120		-	-	-	-	+	-	-	-	-	
			6	0	7	0	9	5	0	0	0

\* PRRS: Porcine reproductive and respiratory syndrome; PCV2: Porcine circovirus type 2; SIV: Swine influenza virus



**Figure 1:** Percentages of homology of the isolates compared to the vaccine and reference strains as demonstrated by MLVA (broken line: reference strains; star: vaccine strains). Cluster analysis was performed with UPGMA using Pearson coefficient.



**Figure 2:** Percentages of homology of the isolates compared to the reference strains as demonstrated by PCR-RFLP (star: reference strains). Cluster analysis was performed with UPGMA using Dice coefficient.



## **4. DISCUSSION GÉNÉRALE**

Le projet de recherche avait comme objectif d'évaluer la diversité génétique d'isolats québécois de *M. hyopneumoniae* provenant d'infections simples ou mixtes à l'abattoir. Le deuxième objectif était de déterminer la variabilité dans la susceptibilité aux antimicrobiens des isolats de *M. hyopneumoniae* pour démontrer si ce facteur pouvait contribuer à la propagation d'une souche en particulier.

Afin d'atteindre ces objectifs, 160 échantillons pulmonaires avec des lésions de pneumonie ont été récupérés, et ceci dans deux abattoirs québécois. Il est à noter ici que les porcs plus âgés, comme ceux retrouvés à l'abattoir, possèdent souvent des lésions pulmonaires non-spécifiques à *M. hyopneumoniae*, et ceci constitue une limite à cette étude. De plus, lors de l'échaudage, si les porcs sont trop entassés, les poumons absorbent une grande quantité d'eau qui s'écoule ensuite par la voie nasale. Ceci pourrait donc diminuer la quantité de bactéries d'intérêt retrouvées au niveau de la muqueuse respiratoire ou augmenter la contamination par d'autres bactéries. En effet, Marois et al. (2007)<sup>(61)</sup> ont observé que des porcs axéniques, lors du processus d'abattage, pouvaient être contaminés par l'environnement et par l'eau utilisée lors de l'échaudage. Toutefois, aucun poumon n'a été testé positif par PCR pour la présence de *M. hyopneumoniae*. L'échantillonnage directement à la ferme pourrait être une alternative intéressante malgré qu'elle soit plus compliquée à préparer pour *M. hyopneumoniae*. L'utilisation du lavage trachéobronchique, au lieu de l'écouvillonnage, permettrait d'éviter l'euthanasie des porcelets et serait donc plus avantageuse pour le producteur. Par contre, cette technique est beaucoup plus fastidieuse et la logistique organisationnelle est plus compliquée.

*M. hyopneumoniae* est un micro-organisme très fastidieux et, se faisant, son isolement est assez difficile. Plusieurs essais ont été effectués au laboratoire pour faciliter sa culture. Premièrement, l'utilisation d'un broyat, ainsi que l'utilisation d'écouvillons, ont été testés pour déterminer laquelle des deux méthodes permettaient une meilleure récupération du mycoplasme. Le broyage semblait trop agressif pour *M. hyopneumoniae*. Ces bactéries sembleraient trop fragiles pour ce procédé car elles ne possèdent pas de paroi. L'écouvillon a donc été utilisé, et ce, dans les poumons ainsi que dans la trachée, pour augmenter les chances de récupérer *M. hyopneumoniae*. Deuxièmement, suite à la resuspension des écouvillons, une filtration (0.45 µm) du milieu de culture a été utilisée pour tenter d'éliminer les bactéries non-désirées. Toutefois, cette technique n'a pas fonctionnée. En effet, comme les mycoplasmes sont associés intimement aux cellules épithéliales pulmonaires et que ces dernières ne passent pas à travers les pores du filtre, très peu de bactéries étaient récupérées dans le filtrat. Pour ce qui est de la culture sur gélose, l'ajout de DEAE-Dextran a facilité l'obtention de micro-colonies de *M. hyopneumoniae*, comme proposé précédemment par Friis <sup>(32)</sup>. L'augmentation de la croissance des mycoplasmes grâce au DEAE-dextran semble être due à son habilité à se lier aux polysaccharides sulfatés du milieu de culture, qui sont néfastes pour ces micro-organismes <sup>(99)</sup>.

Dans la présente étude, le taux d'isolement de *M. hyopneumoniae* était de 6.9% (10/144). Ce taux est plus bas que ceux déjà publiés <sup>(8)</sup>. En effet, le taux moyen d'isolement se situe entre 15 et 30 % (communication personnelle, C. Marois, AFSSA). En séparant les deux abattoirs, aucun isolat n'a été récupéré de l'établissement #1 alors que dans le

deuxième, un taux de 20% a été obtenu. La différence entre les deux se situe au niveau du traitement des animaux avant l'exsanguination, le premier utilisant l'électrocution alors que le deuxième utilise l'asphyxie au dioxyde de carbone. Dans la présente étude, l'électrocution a pu causer un effet néfaste sur l'isolement de *M. hyopneumoniae* à partir des échantillons provenant de l'abattoir #1. Ce phénomène a été remarqué dans une étude publiée par Chen et al. (2003) <sup>(19)</sup>, où ils ont tenté, de façon infructueuse, d'isoler *M. hyopneumoniae* à partir de poumons de porcs électrocutés. L'échantillonnage directement à la ferme pourrait, de nouveau, contourner ce problème. L'utilisation d'antimicrobiens avant l'abattage ou le statut vaccinal des animaux pourrait aussi avoir eu un effet sur l'isolement de mycoplasmes mais cette information n'était pas disponible.

*M. hyopneumoniae* est souvent associé à d'autres agents infectieux bactériens ou viraux, pour initier le complexe respiratoire porcin <sup>(48)</sup>. Dans cette étude, *Pasteurella multocida* et *Streptococcus suis* ont été isolés dans 38.5% et 46.2% des échantillons testés, respectivement. L'interaction entre *M. hyopneumoniae* et *P. multocida* a été décrite dans d'autres études <sup>(4, 24, 74)</sup>. En effet, il semblerait que l'infection primaire par *M. hyopneumoniae* favoriserait la colonisation et l'infection par *P. multocida*, qui est une bactérie pathogène opportuniste. Toutefois, dans ces articles, le nombre de cas positifs pour *P. multocida* était plus faible (8.9 à 35%) que dans la présente étude. *S. suis* est souvent isolé de poumons et de trachées de porcs, entre 28.9 et 98% des cas, ce qui vient appuyer les hauts pourcentages de positivité pour cette bactérie <sup>(58, 61, 74)</sup>. Il n'y a aucune interaction décrite dans la littérature avec *M. hyopneumoniae*. Les bactéries *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis* et *Actinobacillus pleuropneumoniae* ont également été regardées et

aucune n'a été détectée dans cette étude. L'absence d'échantillon positif pour *H. parasuis* peut être expliquée par le fait que les infections à ce micro-organisme sont plus souvent retrouvées en pouponnière <sup>(72)</sup>. L'absence de la bactérie pourrait aussi être due à sa fragilité <sup>(81)</sup>. Comme les écouvillons étaient congelés à -70°C avant la détection par culture, ceci pourrait avoir été néfaste pour la bactérie. L'utilisation de la PCR pour la détection, au lieu de la culture, aurait permis d'obtenir de meilleurs résultats puisque cette technique semble plus sensible que la culture et que la présence des bactéries non-vivantes aurait pu être détectée. Par contre, ceci aurait également augmenté la détection de ces bactéries en tant que contaminants.

Pour ce qui est des virus, *M. hyopneumoniae* a été retrouvé en coinfection avec le CVP2 dans 34.6%, avec le VSRRP dans 7.7% des cas, et le virus influenza n'a pas été détecté dans les échantillons. Ces taux sont plus bas que ceux déjà rapportés dans la littérature <sup>(28, 74)</sup>. En effet, en Allemagne, le VSRRP a été détecté dans 34.7% et le CVP2, dans 78.2% des porcs avec pneumonie <sup>(74)</sup>. En 2007, Dorr et al. <sup>(28)</sup> ont détecté le CVP2 en coinfection avec *M. hyopneumoniae* dans 33% des cas à l'étude. Les taux plus faibles de positivité de la présente étude pourraient s'expliquer par le fait que les tests PCR ont été effectués sur des porcs à l'abattoir, âgés d'environ 8 mois. Normalement, les infections par le CVP2 et le virus SRRP sont retrouvées, de façon plus importante, autour de 4 à 8 semaines d'âge pour le virus SRRP et autour de 5 à 12 semaines d'âge pour le CVP2 <sup>(22, 39)</sup>. L'absence du virus de l'influenza dans les échantillons pourrait s'expliquer par le fait que la production du virus est principalement concentrée en début d'infection, soit à l'intérieur de 48h. Comme les signes cliniques peuvent persister pendant 2 semaines et que les porcs ne

sont pas envoyés à l'abattoir s'ils présentent des signes cliniques, il n'y a alors plus de virus dans les poumons lorsqu'ils sont abattus <sup>(53)</sup>. Pour vérifier l'association entre *M. hyopneumoniae* et ces virus d'intérêt, l'échantillonnage à la ferme de porcs et de porcelets de tous âges serait donc plus approprié à étudier au Québec.

Pour la détection des mycoplasmes, plusieurs types de PCR ont été testés. Premièrement, pour *M. hyopneumoniae*, une PCR nichée, publiée par Calsamiglia et al. <sup>(17)</sup>, a été testée. Par contre, cette technique résultait en plusieurs faux-positifs dus à des amplifications non-spécifiques parmi les échantillons négatifs pour *M. hyopneumoniae*. Une PCR simple a alors été utilisée pour la détection du mycoplasme <sup>(90)</sup>. Après quelques essais, une nouvelle technique de PCR en temps réel, qui offrait une meilleure sensibilité pour la détection directement dans le poumon, a été publiée <sup>(96)</sup>. De plus, elle permettait de faire une quantification de *M. hyopneumoniae* permettant ainsi de regarder les relations entre la présence, ainsi que la concentration, de *M. hyopneumoniae* et la sévérité des lésions. Pour ce qui est de la détection de *M. hyorhinis* et de *M. flocculare*, une multiplex PCR a été utilisée, décrite par Stakenborg et al. <sup>(90)</sup>. Pour cette technique, les bandes pour *M. hyopneumoniae* étaient très fortes et cela empêchait la détection de *M. hyorhinis* et *M. flocculare*. Ceci s'expliquerait en partie par le fait que *M. hyopneumoniae*, dans la majorité des cas, serait présent au niveau des poumons en plus grande concentration que les deux autres. Les amorces pourraient également avoir plus d'affinité pour *M. hyopneumoniae* que pour les autres mycoplasmes. Les amorces pour *M. hyopneumoniae* ont donc été éliminées. Finalement, la détection pour *M. hyopneumoniae* a été effectuée à l'aide de la PCR en temps réel alors que pour *M. hyorhinis* et *M. flocculare*, une PCR multiplex a été utilisée.

Le nombre de cas positifs par PCR pour *M. hyopneumoniae* dans cette étude était de 90%, ce qui est plus élevé que dans les articles précédemment publiés<sup>(68, 74)</sup>. Des poumons négatifs ont permis de confirmer que les résultats étaient de vrais positifs. Ce haut pourcentage de positivité s'explique probablement par le fait qu'une PCR en temps réel a été utilisée, celle-ci possédant une sensibilité beaucoup plus grande que la PCR traditionnelle. En effet, la PCR en temps réel peut détecter de 10-15 génomes alors que la PCR peut détecter environ 1000 génomes<sup>(90, 96)</sup>. De plus, les poumons à l'étude ont été choisis avec des lésions de pneumonie alors que les autres auteurs ont sélectionnés des poumons possédant ou non des lésions. Pour ces études, la moyenne de cas positifs était autour de 25%. Les études quantitatives par PCR en temps réel ont démontré que les titres de *M. hyopneumoniae* dans les poumons étaient de  $10^5$  à  $10^9$  génomes par mL de matériel resuspendu. Des titres de  $10^4$  à  $10^8$  cellules de *M. hyopneumoniae* par mL de lavage trachéobronchique ont déjà été publiés, ces titres étant légèrement plus faibles que les nôtres<sup>(106)</sup>. Ceci peut possiblement s'expliquer par le fait que dans la présente étude, les titrages ont été effectués sur des écouvillons de tissus pulmonaires. En effet, cette technique pourrait permettre de récupérer plus de bactéries puisqu'elle entraîne le décollement des mycoplasmes des cellules épithéliales.

*M. hyorhinis* et *M. flocculare* ont été détectés en coinfection avec *M. hyopneumoniae* dans 10% et 8.75% des poumons examinés. Dans une étude espagnole, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* ont été isolés de poumons avec pneumonie enzootique dans 33%, 37% et 24% des cas respectivement<sup>(8)</sup>. En comparaison, les résultats de cette étude démontrent des taux d'isolement plus faibles pour *M. hyorhinis* et *M.*

*flocculare*. Par contre, ceux-ci sont plus élevés pour ce qui est de *M. hyopneumoniae*. Dans la présente étude, *M. hyorhinis* a aussi été isolé seul dans 5.6% des poumons avec pneumonie enzootique. Ceci a déjà été rapporté à Taiwan <sup>(56)</sup> mais pas au Québec.

Les analyses de génotypage MLVA ont été réalisées sur les écouvillons directement prélevés des poumons et sur les isolats cultivés de *M. hyopneumoniae* pour vérifier si la technique pouvait être effectuée directement sur les poumons. Les patrons déterminés pour les isolats provenant de cultures étaient identiques à ceux retrouvés directement dans les poumons. Ceci démontre que cette technique pourrait être utilisée directement sur les poumons. Cette procédure de génotypage pourrait donc être intéressante pour des études épidémiologiques puisque les résultats peuvent être obtenus rapidement. Au total, 45% des isolats possédaient moins de 55% d'homologie avec les souches vaccinales et de référence. Sur le terrain, on remarque que les effets bénéfiques conférés par les vaccins commerciaux présentement sur le marché sont variables à travers les différents élevages. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette variation dont les différences antigéniques entre les souches vaccinales et celles retrouvées sur le terrain <sup>(59)</sup>. Autre donnée importante obtenue par MLVA est que 15 isolats ne possédaient aucune répétition pour le locus 1. Ceci semble avoir un effet sur la concentration de *M. hyopneumoniae* au niveau du poumon puisque dans ces échantillons on observait une baisse de 2 à 4 log<sub>10</sub>. Le locus 1 pourrait donc être impliqué dans la pathogénicité de *M. hyopneumoniae*, possiblement au niveau de la colonisation ou de la multiplication.

Au départ, le PFGE était la deuxième technique de génotypage pour *M. hyopneumoniae* à l'étude mais dû aux problèmes de croissance de cette bactérie, la PCR-RFLP, qui demande un volume plus faible de culture, a été utilisée. Cette méthode a également été testée directement sur les poumons, comme le MLVA, et a donné les mêmes résultats de concordance entre isolats provenant de culture et ceux directement identifiés dans les poumons. D'après les résultats, le gène p146 semble être non-déTECTABLE chez plusieurs souches québécoises de *M. hyopneumoniae*. En effet, seulement 71.5% des échantillons étaient typables par analyse PCR-RFLP. Cette technique s'est avérée moins discriminante que le MLVA, contrairement à ce qui a été précédemment publié par Stakenborg et al. <sup>(93)</sup>. Toutefois, puisque la discrimination des isolats s'effectue seulement sur les différences d'un seul gène, cette technique pourrait être utilisée pour confirmer l'identité entre des isolats.

En comparant les patrons MLVA ou PCR-RFLP des différents échantillons, une hétérogénéité entre les élevages a été observée comme précédemment décrit dans d'autres études <sup>(6, 65, 92)</sup>. Si les isolats d'une même ferme sont comparés entre eux, alors les associations dépendent de la ferme, c'est-à-dire que certains isolats sont différents alors que d'autres sont identiques pour une même ferme. Ceci peut s'expliquer par les différents systèmes de production ou par la proximité d'une autre ferme. Le système tout-plein, tout-vide produit en général une population bactérienne plus uniforme alors que le système plus traditionnel entraîne un groupe plus hétérogène de souches <sup>(59)</sup>. La proximité d'autres fermes pourrait introduire de nouvelles souches de *M. hyopneumoniae* dans la ferme, apportant plus de diversité dans les isolats. La transmission aérienne semble être un

mécanisme de réinfection pour ce mycoplasme; et ceci peut se produire entre des fermes séparées jusqu'à 4.7 km de distance<sup>(26, 34, 48, 94)</sup>. Des relations entre la variabilité des isolats provenant d'infection simple ou mixte avec le VSRRP et/ou le CVP2 et/ou le virus influenza ont tenté d'être identifiées. Toutefois, aucun motif n'a été associé à la présence des virus SRRP et/ou CVP2.

Pour ce qui est de la variabilité de la susceptibilité aux antimicrobiens, tous les isolats avaient une CMI élevée pour l'ampicilline, le ceftiofur, la pénicilline, la sulfatiméthoxine, le sulfaméthoxazol et le triméthoprim. Ceci est en accord avec la littérature puisque les mollicutes possèdent une résistance naturelle face aux  $\beta$ -lactamines, sulfonamides et le triméthoprim puisqu'ils n'ont pas de paroi et ne produisent pas d'acide folique<sup>(9, 10)</sup>. Pour ce qui est des autres antimicrobiens testés, les faibles CMI retrouvées sont en accord avec d'autres études<sup>(10, 33, 111, 119)</sup>. Tous les CMI ont été déterminées à partir de cultures mixtes dû à l'incapacité de les purifier. Toutefois, l'utilisation d'anticorps anti-*M. hyorhinis* aurait pu permettre d'inhiber la croissance de ce mycoplasme. De plus, des tests PCR sur les différents puits auraient pu permettre de déterminer quels mycoplasmes étaient présents. Parmi ces isolats, des PCR sur les gènes de résistance *tetM* et *ermB* et l'analyse de mutations ponctuelles des gènes L4, L22 et de l'ARNr 23S ont été effectuées et les résultats se sont tous avérés négatifs. L'utilisation de plaques Sensititre<sup>®</sup> s'est révélée une bonne option pour tester la sensibilité aux antimicrobiens des mycoplasmes puisque cette technique n'est pas fastidieuse et que des résultats répétitifs ont été obtenus avec les souches contrôles et les isolats de *M. hyopneumoniae*.

Dans cette étude, la sévérité des lésions semblait être en relation avec quelques paramètres. Aucune association significative entre la présence du virus SRRP, de *S. suis* ou du CVP2 n'a été observée (respectivement  $p=0.12$ ,  $p=0.41$  et  $p=0.40$ ). Finalement, l'absence du locus 1 semble avoir un effet de baisse de la sévérité des lésions pulmonaires ainsi que de la concentration de bactéries. En effet, dans le groupe possédant le locus 1, la moyenne était significativement plus élevée pour ce qui est de la concentration de *M. hyopneumoniae* ( $p<0.0001$ ) et pour la sévérité des lésions pulmonaires ( $p<0.0001$ ). Le locus 1 pourrait donc être impliqué dans la virulence de *M. hyopneumoniae*.

## **5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Ces travaux visaient à évaluer la diversité des isolats québécois de *M. hyopneumoniae*, d'identifier la relation entre la variabilité des isolats provenant d'infection simple ou mixte avec le VSRRP et/ou le CVP2 et/ou le virus influenza ainsi qu'à déterminer la sensibilité des mycoplasmes aux antimicrobiens. Cette étude a démontré que les isolats de *M. hyopneumoniae* du Québec sont hétérogènes entre les élevages et, dans certains cas, à l'intérieur d'un même élevage. De plus, les isolats ont été séparés en deux groupes distincts par l'analyse MLVA, le premier contenant toutes les souches de référence et vaccinales. Aussi, l'absence du locus 1 semble être reliée à une baisse de la concentration de *M. hyopneumoniae* et à une diminution de la sévérité des lésions pulmonaires. Les résultats démontrent aussi qu'il y a une sensibilité aux antimicrobiens parmi les isolats testés puisque toutes les CMI étaient faibles et qu'aucun gène de résistance n'a été détecté. Également, pour la première fois au Québec, la bactérie *M. hyorhinis* a été détectée seule au niveau de lésions de pneumonie enzootique.

Il serait intéressant, dans les prochaines études, d'évaluer l'importance de *M. hyorhinis* dans les cas de pneumonie enzootique au Québec. Dans ce travail, il a été démontré que ce mycoplasme était présent seul au niveau de lésions pulmonaires de quelques échantillons. Un échantillonnage plus important permettrait d'avoir une meilleure idée du phénomène. De plus, l'ajout d'une infection expérimentale *in vivo* de porcelets avec *M. hyorhinis* pourrait aussi aider à confirmer l'hypothèse que ce mycoplasme peut causer la pneumonie enzootique. Cette étude a permis d'évaluer la sensibilité aux antimicrobiens chez quelques isolats, n'apportant qu'un aperçu de la situation québécoise. Une recherche

comportant plus d'isolats permettrait d'avoir une meilleure idée de la sensibilité de *M. hyopneumoniae* face aux antimicrobiens utilisés au Québec.

Étant donné que le locus 1, utilisé dans l'analyse MLVA, semble être associé à la concentration de bactéries au niveau du poumon, une analyse plus poussée de ce gène permettrait de confirmer son implication dans la pathogenèse du mycoplasme. Le gène complet pourrait être amplifié puis cloné dans un vecteur d'expression. En insérant le vecteur chez *E. coli*, la protéine pourra être produite puis purifiée. Suite à une analyse SDS-PAGE, la taille de la protéine pourra être obtenue. Des essais pour déterminer les possibles activités enzymatiques de la protéine ainsi que sa capacité à lier les cellules épithéliales ciliaires porcines pourraient être effectués. Ces expériences permettraient de caractériser la protéine davantage et d'élucider son rôle chez la bactérie.

Un des objectifs de l'étude était de comparer les isolats québécois de *M. hyopneumoniae* avec les souches vaccinales utilisées actuellement. Les résultats démontrent que les isolats québécois sont divisés en deux groupes, le premier comportant toutes les souches vaccinales et de référence. Il serait donc intéressant de faire des tests ELISA et d'immunobuvardages, avec des sérums de porcs immunisés et non-immunisés, pour vérifier si les anticorps reconnaissent les isolats provenant des deux groupes clonaux. Les immunobuvardages permettraient aussi de comparer leurs profils protéiques immunogènes.

En conclusion, ces travaux ont permis de mieux connaître les souches québécoises de *M. hyopneumoniae* et ces résultats ouvrent la porte sur d'autres questions de recherche.

## **6. SOURCES DOCUMENTAIRES**

1. 1984. The Mycoplasmataceae, p. 760-761. In J. C. Holt (ed.), Berger's manual of systematic bacteriology, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
2. **Abiven, P., and P. Pommier.** 1993. Tracheobronchial lavage technique using the transnasal route for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in living non-anesthetized swine. Vet Res **24**:515-22.
3. **Amanfu, W., C. N. Weng, R. F. Ross, and H. J. Barnes.** 1984. Diagnosis of mycoplasmal pneumoniae of swine: sequential study by direct immunofluorescence. American journal of veterinary research **45**:1349-1352.
4. **Amass, S. F., L. K. Clark, W. G. van Alstine, T. L. Bowersock, D. A. Murphy, K. E. Knox, and S. R. Albregts.** 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. Journal of the American veterinary medical association **204**:102-107.
5. **Ameri-Mahabadi, M., E. M. Zhou, and W. H. Hsu.** 2005. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. J Vet Diagn Invest **17**:61-4.
6. **Artiushin, S., and F. C. Minion.** 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. Int J Syst Bacteriol **46**:324-8.
7. **Artiushin, S., L. Stipkovits, and F. C. Minion.** 1993. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Mol Cell Probes **7**:381-5.

8. **Assuncao, P., C. De la Fe, B. Kokotovic, O. Gonzalez, and J. B. Poveda.** 2005. The occurrence of mycoplasmas in the lungs of swine in Gran Canaria (Spain). *Vet Res Commun* **29**:453-62.
9. **Bébéar, C. M., B. de Barbeyrac, S. Pereyre, and C. Bébéar.** 2007. Mycoplasmes et Chlamydiae: Sensibilité et résistance aux antibiotiques. *Revue francophone des laboratoires*:77-85.
10. **Bébéar, C. M., and I. Kempf.** 2005. Antimicrobial therapy and antimicrobial resistance, p. p.535- p.568. *In* A. a. G. B. Blanchard (ed.), *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Horizon bioscience, Wymondham.
11. **Blanchard, A., D. M. Crabb, K. Dybvig, L. B. Duffy, and G. H. Cassell.** 1992. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: *tetM* confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. *FEMS Microbiol Lett* **74**:277-81.
12. **Blanchard, B., M. Kobisch, J. M. Bove, and C. Saillard.** 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Probes* **10**:15-22.
13. **Blanchard, B., M. M. Vena, A. Cavalier, J. Le Lannic, J. Gouranton, and M. Kobisch.** 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **30**:329-41.
14. **Boye, M., T. K. Jensen, P. Ahrens, T. Hagedorn-Olsen, and N. F. Friis.** 2001. *In situ* hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *Apmis* **109**:656-64.

15. **Burnett, T. A., K. Dinkla, M. Rohde, G. S. Chhatwal, C. Uphoff, M. Srivastava, S. J. Cordwell, S. Geary, X. Liao, F. C. Minion, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 2006. P159 is a proteolytically processed, surface adhesin of *Mycoplasma hyopneumoniae*: defined domains of P159 bind heparin and promote adherence to eukaryote cells. *Mol Microbiol* **60**:669-86.
16. **Calsamiglia, M., and C. Pijoan.** 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Vet Rec* **146**:530-2.
17. **Calsamiglia, M., C. Pijoan, and A. Trigo.** 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* **11**:246-51.
18. **Caron, J., M. Ouardani, and S. Dea.** 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* **38**:1390-6.
19. **Chen, H. H., J. H. Lin, H. P. Fung, L. L. Ho, P. C. Yang, W. C. Lee, Y. P. Lee, and R. M. Chu.** 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Can J Vet Res* **67**:283-90.
20. **Chen, J. R., J. H. Lin, C. N. Weng, and S. S. Lai.** 1998. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **62**:97-110.
21. **Chen, Y. L., S. N. Wang, W. J. Yang, Y. J. Chen, H. H. Lin, and D. Shiuan.** 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun* **71**:1155-60.

22. **Cho, J. G., and S. A. Dee.** 2006. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* **66**:655-62.
23. **Chopra, I., and M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**:232-60; second page, table of contents.
24. **Ciprian, A., C. Pijoan, T. Cruz, J. Camacho, J. Tortora, G. Colmenares, R. Lopez-Revilla, and M. de la Garza.** 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* **52**:434-8.
25. **DeBey, M. C., and R. F. Ross.** 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* **62**:5312-8.
26. **Dee, S., S. Otake, S. Oliveira, and J. Deen.** 2009. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* **40**:39.
27. **Dégrange, S., C. Cazanave, A. Charron, H. Renaudin, C. Bébéar, and C. M. Bébéar.** 2009. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **47**:914-923.
28. **Dorr, P. M., R. B. Baker, G. W. Almond, S. R. Wayne, and W. A. Gebreyes.** 2007. Epidemiologic assessment of porcine circovirus type 2 coinfection with other pathogens in swine. *J Am Vet Med Assoc* **230**:244-50.

29. **Dubosson, C. R., C. Conzelmann, R. Miserez, P. Boerlin, J. Frey, W. Zimmermann, H. Hani, and P. Kuhnert.** 2004. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet Microbiol* **102**:55-65.
30. **Erlandson, K. R., R. E. Evans, B. J. Thacker, M. W. Wegner, and E. L. Thacker.** 2005. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine health and production* **13**:198-203.
31. **Etheridge, J. R., G. S. Cottew, and L. C. Lloyd.** 1979. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs. *Aust Vet J* **55**:356-9.
32. **Friis, N. F.** 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. *Nord Vet Med* **27**:337-9.
33. **Godinho, K. S.** 2008. Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Vet Microbiol* **129**:426-32.
34. **Goodwin, R. F.** 1985. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet Rec* **116**:690-4.
35. **Goodwin, R. F., A. P. Pomeroy, and P. Whittlestone.** 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *Vet Rec* **77**:1247-1249.
36. **Hannan, P. C.** 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. *Vet Res* **31**:373-95.

37. **Hannan, P. C., H. M. Windsor, and P. H. Ripley.** 1997. *In vitro* susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor), tiamulin and enrofloxacin and the *in vitro* development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res Vet Sci **63**:157-60.
38. **Harasawa, R., K. Koshimizu, O. Takeda, T. Uemori, K. Asada, and I. Kato.** 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. Mol Cell Probes **5**:103-9.
39. **Harding, J., Edward G. Clark, John H. Strokappe, Phil I. Willson and John A. Ellis.** 1998. Postweaning multisystemic wasting syndrome: Epidemiology and clinical presentation. Swine Health and Production **6**:249-254.
40. **Herschleb, J., G. Ananiev, and D. C. Schwartz.** 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. Nat Protoc **2**:677-84.
41. **Hooper, D. C.** 2001. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. Clinical infectious diseases **32**:S9-15.
42. **Hsu, T., and F. C. Minion.** 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect Immun **66**:4762-6.
43. **Hsu, T., and F. C. Minion.** 1998. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Gene **214**:13-23.
44. **Inamoto, T., H. Takahashi, K. Yamamoto, Y. Nakai, and K. Ogimoto.** 1994. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. J Vet Med Sci **56**:393-4.

45. **Jenkins, C., J. L. Wilton, F. C. Minion, L. Falconer, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 2006. Two domains within the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin bind heparin. *Infect Immun* **74**:481-7.
46. **Keim, P., L. B. Price, A. M. Klevytska, K. L. Smith, J. M. Schupp, R. Okinaka, P. J. Jackson, and M. E. Hugh-Jones.** 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **182**:2928-36.
47. **Kobayashi, H., T. Morozumi, G. Munthali, K. Mitani, N. Ito, and K. Yamamoto.** 1996. Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1030-2.
48. **Kobisch, M.** 2007. Les affections liées aux mycoplasmes chez le porc. *Le nouveau praticien vétérinaire*:64-67.
49. **Kobisch, M., B. Blanchard, and M. F. Le Potier.** 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res* **24**:67-77.
50. **Kobisch, M., and N. F. Friis.** 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* **15**:1569-605.
51. **Kobisch, M. e. C. M.** 2008. Les mycoplasmoses porcines. *Bulletin de l'académie vétérinaire de France* **161**:179-184.
52. **Kokotovic, B., N. F. Friis, J. S. Jensen, and P. Ahrens.** 1999. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *Journal of clinical microbiology* **37**:3300-3307.

53. **Kothalawala, H., M. J. Toussaint, and E. Gruys.** 2006. An overview of swine influenza. *Vet Q* **28**:46-53.
54. **Kurth, K. T., T. Hsu, E. R. Snook, E. L. Thacker, B. J. Thacker, and F. C. Minion.** 2002. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. *J Vet Diagn Invest* **14**:463-9.
55. **Le Grand, A., and M. Kobisch.** 1996. Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res* **27**:241-53.
56. **Lin, J. H., S. P. Chen, K. S. Yeh, and C. N. Weng.** 2006. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet Microbiol* **115**:111-6.
57. **Lin, J. H., C. N. Weng, C. W. Liao, K. S. Yeh, and M. J. Pan.** 2003. Protective effects of oral microencapsulated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine prepared by co-spray drying method. *J Vet Med Sci* **65**:69-74.
58. **MacInnes, J. I., M. Gottschalk, A. G. Lone, D. S. Metcalf, S. Ojha, T. Rosendal, S. B. Watson, and R. M. Friendship.** 2008. Prevalence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, and *Streptococcus suis* in representative Ontario swine herds. *Can J Vet Res* **72**:242-8.
59. **Maes, D., J. Segales, T. Meyns, M. Sibila, M. Pieters, and F. Haesebrouck.** 2007. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*.

60. **Maes, D., M. Verdonck, H. Deluyker, and A. de Kruif.** 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Q* **18**:104-9.
61. **Marois, C., R. Cariolet, H. Morvan, and M. Kobisch.** 2007. Transmission of pathogenic respiratory bacteria to specific pathogen free pigs at slaughter. *Vet Microbiol.*
62. **Marois, C., D. Dory, C. Fablet, F. Madec, and M. Kobisch.** 2009. 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.*
63. **Marois, C., M. Gottschalk, H. Morvan, C. Fablet, F. Madec, and M. Kobisch.** 2009. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **135**:283-91.
64. **Mattsson, J. G., K. Bergstrom, P. Wallgren, and K. E. Johansson.** 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by *in vitro* amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* **33**:893-7.
65. **Mayor, D., F. Zeeh, J. Frey, and P. Kuhnert.** 2007. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Vet Res* **38**:391-8.
66. **Meyns, T., J. Dewulf, A. de Kruif, D. Calus, F. Haesebrouck, and D. Maes.** 2006. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* **24**:7081-6.

67. **Minion, F. C., C. Adams, and T. Hsu.** 2000. R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infect Immun* **68**:3056-60.
68. **Morrison, R. B., C. Pijoan, H. D. Hilley, and V. Rapp.** 1985. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med* **49**:129-137.
69. **Murphy, D., W. G. Van Alstine, L. K. Clark, S. Albrechts, and K. Knox.** 1993. Aerosol vaccination of pigs against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Am J Vet Res* **54**:1874-80.
70. **Ogawa, Y., E. Oishi, Y. Muneta, A. Sano, H. Hikono, T. Shibahara, Y. Yagi, and Y. Shimoji.** 2009. Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* **27**:4543-50.
71. **Okamba, F. R., E. Moreau, K. Cheikh Saad Bouh, C. A. Gagnon, B. Massie, and M. Arella.** 2007. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clin Vaccine Immunol* **14**:767-74.
72. **Oliveira, S., and C. Pijoan.** 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. *Vet Microbiol* **99**:1-12.
73. **Opriessnig, T., E. L. Thacker, S. Yu, M. Fenaux, X. J. Meng, and P. G. Halbur.** 2004. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Vet Pathol* **41**:624-40.

74. **Palzer, A., M. Ritzmann, G. Wolf, and K. Heinritzi.** 2008. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec* **162**:267-71.
75. **Park, S. C., S. Yibchok-Anun, H. Cheng, T. F. Young, E. L. Thacker, F. C. Minion, R. F. Ross, and W. H. Hsu.** 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun* **70**:2502-6.
76. **Pilo, P., J. Frey, and E. M. Vilei.** 2007. Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J* **174**:513-21.
77. **Pinto, P. M., C. S. Klein, A. Zaha, and H. B. Ferreira.** 2009. Comparative proteomic analysis of pathogenic and non-pathogenic strains from the swine pathogen *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proteome Sci* **7**:45.
78. **Prescott, J. F.** 2000. Lincosamides, Macrolides, and Pleuromutilins, p. 229-262. *In* J. F. Prescott, J.D. Baggot and R.D. Walker (ed.), *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. Iowa State University press, Ames.
79. **Raherison, S., P. Gonzalez, H. Renaudin, A. Charron, C. Bebear, and C. M. Bebear.** 2002. Evidence of active efflux in resistance to ciprofloxacin and to ethidium bromide by *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:672-9.
80. **Raherison, S., P. Gonzalez, H. Renaudin, A. Charron, C. Bebear, and C. M. Bebear.** 2005. Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:421-4.

81. **Rapp-Gabrielson, V. J.** 1999. *Haemophilus parasuis*, p. 475-481. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (ed.), Diseases of swine.
82. **Razin, S., and E. Jacobs.** 1992. Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol **138**:407-22.
83. **Razin, S., D. Yogev, and Y. Naot.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev **62**:1094-156.
84. **Ross, R. F.** 1999. Mycoplasmal diseases. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W.L. Mengeling, D.J. Taylor (ed.), Diseases of swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
85. **Ross, R. F.** 2006. *Pasteurella multocida* and its role in porcine pneumonia. Anim Health Res Rev **7**:13-29.
86. **Shahhosseiny, M. H., Z. Hosseiny, H. R. Khoramkhorshid, S. Azari, and M. A. Shokrgozar.** 2009. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction. J Basic Microbiol.
87. **Sibila, M., M. Pieters, T. Molitor, D. Maes, F. Haesebrouck, and J. Segales.** 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Vet J **181**:221-31.
88. **Sibila, M., M. Pieters, T. Molitor, D. Maes, F. Haesebrouck, and J. Segales.** 2008. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Vet J.
89. **Solov'eva, S. V., E. G. Tsoi, N. A. Zigangirova, N. A. Gamova, I. V. Rakovskaia, and A. L. Gintsburg.** 1998. Detection of tetracycline- and

- erythromycin-resistant urogenital *Mycoplasma* strains using PCR. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol:3-7.
90. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, H. Imberechts, J. Peeters, A. De Kruif, F. Haesebrouck, and D. Maes.** 2006. A multiplex PCR to identify porcine mycoplasmas present in broth cultures. Vet Res Commun **30**:239-47.
  91. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, D. Maes, F. C. Minion, J. Peeters, A. De Kruif, and F. Haesebrouck.** 2005. Characterization of *In Vivo* acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. Microb Drug Resist **11**:290-4.
  92. **Stakenborg, T., J. Vicca, P. Butaye, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck.** 2005. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. Vet Microbiol **109**:29-36.
  93. **Stakenborg, T., J. Vicca, D. Maes, J. Peeters, A. de Kruif, F. Haesebrouck, and P. Butaye.** 2006. Comparison of molecular techniques for the typing of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates. J Microbiol Methods **66**:263-75.
  94. **Stark, K. D., H. Keller, and E. Eggenberger.** 1992. Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. Vet Rec **131**:532-5.
  95. **Stark, K. D., J. Nicolet, and J. Frey.** 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. Appl Environ Microbiol **64**:543-8.
  96. **Strait, E. L., M. L. Madsen, F. C. Minion, J. Christopher-Hennings, M. Dammen, K. R. Jones, and E. L. Thacker.** 2008. Real-time PCR assays to address

- genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J Clin Microbiol **46**:2491-8.
97. **Swaminathan, B., and G. M. Matar.** 1993. Molecular typing methods, p. 26-50. In D. H. Persing, T. F. Smith, and F. C. Tenover (ed.), Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. ASM Press.
98. **Taraskina, A. E., A. M. Savicheva, T. A. Akopian, A. E. Soroka, K. T. Momynaliev, and V. M. Govorun.** 2002. Drift of *tetM* determinant in urogenital microbiocenosis containing mycoplasmas during treatment with a tetracycline antibiotic. Bull Exp Biol Med **134**:60-3.
99. **Tauraso, N. M.** 1967. Effect of diethylaminoethyl dextran on the growth of *Mycoplasma* in agar. J Bacteriol **93**:1559-64.
100. **Ter Laak, E. A., A. Pijpers, J. H. Noordergraaf, E. C. Schoevers, and J. H. Verheijden.** 1991. Comparison of methods for *in vitro* testing of susceptibility of porcine *Mycoplasma* species to antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother **35**:228-33.
101. **Thacker, E. L.** 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Anim Health Res Rev **5**:317-20.
102. **Thacker, E. L., P. G. Halbur, R. F. Ross, R. Thanawongnuwech, and B. J. Thacker.** 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J Clin Microbiol **37**:620-7.
103. **Thacker, E. L., B. J. Thacker, T. B. Boettcher, and H. Jayappa.** 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection

- induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Swine Health and Production **6**:107-112.
104. **Thacker, E. L., B. J. Thacker, and B. H. Janke.** 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. J Clin Microbiol **39**:2525-30.
105. **Thacker, E. L., B. J. Thacker, T. F. Young, and P. G. Halbur.** 2000. Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine **18**:1244-52.
106. **Verdin, E., M. Kobisch, J. M. Bove, M. Garnier, and C. Saillard.** 2000. Use of an internal control in a nested-PCR assay for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection and quantification in tracheobronchiolar washings from pigs. Mol Cell Probes **14**:365-72.
107. **Verdin, E., C. Saillard, A. Labbe, J. M. Bove, and M. Kobisch.** 2000. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. Vet Microbiol **76**:31-40.
108. **Vester, B., and S. Douthwaite.** 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother **45**:1-12.
109. **Vicca, J., D. Maes, T. Stakenborg, P. Butaye, F. Minion, J. Peeters, A. de Kruif, A. Decostere, and F. Haesebrouck.** 2007. Resistance Mechanism Against Fluoroquinolones in *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates. Microb Drug Resist **13**:166-170.

110. **Vicca, J., T. Stakenborg, D. Maes, P. Butaye, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck.** 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol* **97**:177-90.
111. **Vicca, J., T. Stakenborg, D. Maes, P. Butaye, J. Peeters, A. de Kruif, and F. Haesebrouck.** 2004. *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4470-2.
112. **Vilei, E. M., and J. Frey.** 2001. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:85-92.
113. **Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and et al.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**:4407-14.
114. **Waites, K. B., D. M. Crabb, L. B. Duffy, and G. H. Cassell.** 1997. Evaluation of the Etest for detection of tetracycline resistance in *Mycoplasma hominis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **27**:117-22.
115. **Welsh, J., and M. McClelland.** 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**:7213-8.
116. **Wilton, J., C. Jenkins, S. J. Cordwell, L. Falconer, F. C. Minion, D. C. Oneal, M. A. Djordjevic, A. Connolly, I. Barchia, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 2009. Mhp493 (P216) is a proteolytically processed, cilium and heparin binding protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Microbiol* **71**:566-82.

117. **Wilton, J. L., A. L. Scarman, M. J. Walker, and S. P. Djordjevic.** 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* **144 (Pt 7)**:1931-43.
118. **Wu, C. C., T. R. Shryock, T. L. Lin, M. Faderan, and M. F. Veenhuizen.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. *Vet Microbiol* **76**:25-30.
119. **Wu, C. C., T.R. Shryock, T.L. Lin and M. Fleck.** 1997. Testing antimicrobial susceptibility against *Mycoplasma hyopneumoniae in vitro*. *Swine Health and Production* **5**:227-230.
120. **Zhang, Q., T. F. Young, and R. F. Ross.** 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect Immun* **63**:1013-9.

## **7. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS**

Article :

Charlebois, A., P. Hélie, C.A. Gagnon, M. Gottschalk and M. Archambault, 'Genetic diversity and antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from Canada', Article en préparation

## **8. ANNEXE**

Article:

Charlebois, A. et M. Archambault. 'Methicillin-Resistant-*Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical infections in dogs at a university hospital'. Article en préparation