

JUDITH CARON

**VALEUR DIAGNOSTIQUE ET VARIABILITÉ DE LA PROTÉINE
CYTOSOLIQUE P36 DE *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE***

Mémoire
présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie et biotechnologie

Décembre 1999
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

À mes parents

Pour leur amour, leur soutien et leur confiance

À Mark

Pour son amour, son aide et sa patience

TABLE DES MATIÈRES

	Page
Page titre	i
Dédicaces	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	viii
Sommaire	x
Introduction générale	1
PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Revue bibliographique	6
1.1 Caractéristiques biochimiques et biologiques des mycoplasmes	7
1.1.1 Introduction	7
1.1.2 Classification	7
1.1.3 Structure	11
1.1.4 Habitat	15
1.1.5 Pathogénèse	15
1.1.6 Activation du système immunitaire de l'hôte	17
1.1.7 Évasion du système immunitaire	18
1.2 Mycoplasmes porcins	19
1.2.1 Généralités	19
1.2.2 <i>Mycoplasma flocculare</i>	20
1.2.3 <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	22
1.2.4 <i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	22
1.3 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	23
1.3.1 Caractéristiques de la maladie	23
1.3.2 Propriétés générales de <i>M. hyopneumoniae</i>	25
1.3.3 Pathogénèse de l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	26

	Page
1.3.4 Protéines immunodominantes de <i>M. hyopneumoniae</i>	27
1.3.5 Diagnostic de l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	31
1.3.5.1 Diagnostic clinique et pathologique	31
1.3.5.2 Diagnostic immunohistochimique	31
1.3.5.3 Diagnostic sérologique	32
1.3.5.4 Diagnostic moléculaire de l'infection par <i>M. hyopneumoniae</i>	33
1.3.6 Prophylaxie	34
1.3.7 Contrôle et prévention	35
1.3.8 Vaccin	36
PARTIE II: MÉTHODOLOGIE, RÉSULTATS ET DISCUSSION	39
2. Article 1: Detection and differentiation of <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> and <i>Mycoplasma hyorhinis</i> infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes	40
3. Article 2: Species-specific monoclonal antibodies to <i>E. coli</i> expressed p36 cytosolic protein of <i>M. hyopneumoniae</i>	74
PARTIE III: DISCUSSION GÉNÉRALE	
4. Discussion	114
Bibliographie	127
Remerciements	143
Annexe I: Milieu de culture solide et liquide pour <i>M. hyopneumoniae</i>	145
Annexe II: Séquences des gènes p36 et p46 de <i>M. hyopneumoniae</i> et p37 de <i>M. hyorhinis</i>	148
Annexe III: Extraction de l'ADN génomique de <i>M. hyopneumoniae</i> utilisant la trousse TriPure™	156
Annexe IV: Liste des présentations et séances d'affiches	159
Annexe V: Accusés de réception des articles	161

LISTES DES TABLEAUX

	Page
TABLEAU 1: Taxonomie et propriétés des <i>Mollicutes</i> .	10
TABLEAU 2: Comparaison des mycoplasmes avec les bactéries et les virus.	14
TABLEAU 3: Mycoplasmoses porcines.	21
TABLEAU 4: Caractéristiques des amorces nucléotidiques utilisées dans les PCR simple et multiplex. (Oligonucleotide primers used for the single and multiplex PCR assays).	56
TABLEAU 5: Virus et bactéries utilisés pour tester la spécificité des amorces nucléotidiques. (Microorganisms used for testing the specificity of <i>M. hyopneumoniae</i> primers).	57
TABLEAU 6: Détection du gène de la p36 à partir d'écouvillons trachéobronchiolaires. (Detection of the p36 gene of <i>M. hyopneumoniae</i> from porcine tracheobronchial swabs).	58
TABLEAU 7: Détection de fragments de différentes grandeurs des gènes de la p36 et p46 de <i>M. hyopneumoniae</i> et du gène de la p37 de <i>M. hyorhinae</i> à partir des poumons de porcs sains et malades. (Detection of <i>M. hyopneumoniae</i> variable length fragments of the p36 and p46 genes and <i>M. hyorhinae</i> p37 gene from lung specimens of healthy and clinically-affected pigs).	59
TABLEAU 8: Analyse de ou des épitope(s) de la protéine cytosolique p36 de la souche ATCC 25934 de <i>M. hyopneumoniae</i> par une épreuve ELISA de compétition utilisant sept AcMo. (Epitope analysis of the cytosolic p36 protein of <i>M. hyopneumoniae</i> strain ATCC 25934 by the additivity test using seven of the anti-p36 MAbs).	95

LISTES DES FIGURES

	Page
FIGURE 1: Amplification par PCR des ORFs codant pour les quatre gènes immunodominants de <i>M. hyopneumoniae</i> . (PCR amplification of the ORFs encoding the four immunodominant genes of <i>M. hyopneumoniae</i>).	60
FIGURE 2: Amplification par PCR de différents fragments d'ADN des gènes p36 et p46. (Electrophoretic profiles of DNA fragments amplified from the p36 and p46 genes).	62
FIGURE 3: Spécificité des amorces nucléotidiques des gènes p36 et p46 pour l'amplification par PCR simple de l'ADN de <i>M. hyopneumoniae</i> . (Specificity of selected p36 and p46 primer pairs for single PCR amplification of <i>M. hyopneumoniae</i>).	64
FIGURE 4: Sensibilité de la technique PCR en utilisant deux paires d'amorces du gène p36 pour la détection de l'ADN génomique de <i>M. hyopneumoniae</i> . (Sensitivity of the p36 PCR in detecting extracted genomic <i>M. hyopneumoniae</i> DNA using two sets of primer pairs).	66
FIGURE 5: Sensibilité de la technique PCR en utilisant deux paires d'amorces du gène p46 pour la détection de l'ADN génomique de <i>M. hyopneumoniae</i> . (Sensitivity of the p46 PCR in detecting extracted genomic <i>M. hyopneumoniae</i> DNA using two sets of primer pairs).	68
FIGURE 6: Différenciation entre <i>M. hyopneumoniae</i> et <i>M. hyorhinis</i> par amplification enzymatique des gènes codant pour les protéines p36 et p37. (Differentiation between <i>M. hyopneumoniae</i> and <i>M. hyorhinis</i> following PCR amplification of extracted genomic DNA with specific p36 and p37 primer pairs).	70
FIGURE 7: Profil électrophorétique des amplicons de la p36 et la p46 obtenus avec la PCR multiplex. (Electrophoretic pattern of p36 and p46 amplicons obtained by the mutliplex PCR assay).	72

	Page
FIGURE 8: Amplification par PCR de l'ORF codant pour la protéine cytosolique p36 de la souche ATCC 25934 de <i>M. hyopneumoniae</i> . (PCR amplification of the ORF encoding the cytosolic p36 protein of <i>M. hyopneumoniae</i> [strain ATCC 25934]).	96
FIGURE 9: Expression dans <i>E. coli</i> de la protéine de fusion recombinante GST-p36. (Expression of the recombinant GST-p36 protein in <i>E. coli</i>).	98
FIGURE 10: Réactivité du sérum polyclonal monospécifique de lapin envers la protéine recombinante GST-p36. (Reactivity of monospecific rabbit hyperimmune serum to the recombinant GST-p36 fusion protein).	100
FIGURE 11: Réactivité des AcMo anti-p36 contre l'antigène complet de <i>M. hyopneumoniae</i> et contre la protéine recombinante p36 coupée. (Reactivity of the anti-p36 MAbs against whole <i>M. hyopneumoniae</i> antigen and against the cleaved recombinant p36 protein).	102
FIGURE 12: Spécificité des AcMo anti-p36 déterminée par immunobuvardage de type Western. (Specificity of the anti-p36 MAbs as determined by Western immunoblotting).	104
FIGURE 13: Réactivité du sérum de porc hyperimmun et des AcMo anti-p36 envers les souches de références homologues et les isolats de champs de <i>M. hyopneumoniae</i> . (Reactivity pattern of hyperimmune porcine serum and anti-p36 MAbs towards the homologous and Quebec field strains of <i>M. hyopneumoniae</i>).	106
FIGURE 14: Observations histologiques des poumons de porcs contrôles et infectés expérimentalement par <i>M. hyopneumoniae</i> . (Histological findings in the lungs of control and experimentally-infected pigs).	108
FIGURE 15: Détection de <i>M. hyopneumoniae</i> à partir de coupes de poumons congelés provenant de porcs expérimentalement infectés utilisant une technique d'immunofluorescence indirecte basée sur l'utilisation d'AcMo anti-p36. (Immunofluorescent staining by anti-p36 MAbs of frozen sections of lungs from experimentally-infected pigs).	112

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a a	acide(s) aminé(s)
A	adénine
AcMo	anticorps monoclonal
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
C	cytosine
DEPC	diéthylpyrocarbonate
EDTA	acide éthylènediamine tétra-acétique
ELISA	épreuve immunoenzymatique
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
GST	glutathion sulfotransférase
G	guanine
IIF	immunofluorescence indirecte
Ig	immunoglobuline
IFNγ	interféron γ
Il	interleukine
IPTG	isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside
kb	kilobases
kpb	kilopaires de bases
kDa	kiloDalton
MAb	anticorps monoclonal
MLO	Mycoplasma- ou Mollicutes-Like Organism
NK	cellules natural killer
nt	nucléotides
ORF	cadre de lecture ouvert
pb	paires de bases
PBS	tampon salin phosphaté
PCR	réaction de la polymérase en chaîne

p.i.	post-infection
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
PPLO	Pleuropneumonia-Like Organism
PPO	Pleuropneumonia Organism
SDS-PAGE	électrophorèse en gels de polyacrylamide en présence de SDS
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPF pigs	Specific Pathogen Free pigs
TAE	tampon Tris-acetate
TBS	tampon Tris-HCl et saline
TBS-T	tampon Tris-HCl et Tween-20 ou 80
T	thymidine
TNFα	tumor necrosis factor α
U	unité

SOMMAIRE

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent causal de la pneumonie enzootique porcine. Il s'agit d'une maladie respiratoire chronique qui engendre beaucoup de problèmes de santé et des pertes économiques considérables pour l'industrie de l'élevage des porcs de plusieurs pays.

M. hyopneumoniae est un microorganisme très fastidieux qui partage des déterminants antigéniques communs et beaucoup de séquences homologues avec d'autres mycoplasmes porcins, notamment *M. hyorhinis* et *M. flocculare*. De plus, il y a présence d'hétérogénéité antigénique et génomique parmi les différentes souches de *M. hyopneumoniae*. Conséquemment, ces difficultés entraînent une diminution de l'efficacité des méthodes de diagnostic présentement utilisées, en plus d'entraver la mise en place de mesures d'épidémiosurveillance et de prophylaxie.

L'objectif principal de cette recherche était d'étudier la valeur diagnostique de la protéine cytosolique p36 de *M. hyopneumoniae* et de mettre au point des techniques de dépistage rapides et fiables à la disposition de l'industrie porcine. Cette étude fut divisée en deux volets, le premier étant un volet de diagnostic moléculaire et le deuxième un volet de diagnostic immunohistochimique.

La première partie de l'étude consistait au développement d'une technique d'amplification des gènes par la réaction de la polymérase en chaîne (PCR). Le gène ciblé fut celui codant pour la protéine cytosolique p36 reconnue comme étant spécifique d'espèces, antigéniquement stable et hautement immunogène. Les amorces d'oligonucléotides synthétisées pour l'amplification de la p36 se sont avérées spécifiques à *M. hyopneumoniae*, ne permettant pas l'amplification de l'ADN et/ou l'ARN des autres espèces de mycoplasmes, de bactéries et de virus communément associés aux problèmes respiratoires porcins. Comparativement aux amorces utilisées pour l'amplification de fragments de gène codant pour la protéine membranaire p46, les amorces dirigées contre le gène de la p36 se sont avérées plus sensibles puisque des amplicons de la taille

attendue ont été obtenus à partir de préparations ne contenant que de 0,5 à 50 pg/ml d'ADN génomique. D'autre part, les amorces dirigées contre la p46 n'ont amplifié que 0,5 ng/ml d'ADN génomique. Cette méthode PCR a été utilisée avec succès sur des spécimens cliniques, tels des homogénats de poumons et des écouvillons trachéobronchiolaires, une très bonne corrélation ayant été obtenue avec la mise en évidence de lésions pulmonaires et de signes cliniques chez les porcs testés. Une approche multiplex, permettant l'amplification simultanée du gène entier de la p36 (948 pb) et d'un fragment interne du gène codant pour la protéine p46 (580 pb), a été préconisée pour augmenter la spécificité du test.

En comparaison avec d'autres tests de détection présentement utilisés, la PCR s'avère très rapide, prenant deux jours pour l'obtention des résultats, sensible et spécifique. Aucun cas faux-positif n'a été identifié. La PCR basée sur l'amplification du gène de la p36 s'est avérée un outil extrêmement efficace pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae* qui pourra éventuellement être utilisé pour la surveillance de la présence de cet agent dans un troupeau.

Le volet sérologique consistait en la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la p36 et à l'étude de leur potentiel diagnostique dans un test d'immunofluorescence indirecte sur des coupes de poumons congelés, de même que pour l'identification sérologique de l'agent après isolement en milieu de culture.

Le gène de la p36 a été cloné et exprimé sous forme de protéine de fusion avec la glutathione S-transférase (GST). La protéine GST-p36 recombinante a été scindée suite à une digestion avec la thrombine, et la portion p36 enrichie a servi à l'immunisation de souris. Ces dernières développèrent une forte réponse en anticorps telle que confirmée à l'aide d'une épreuve ELISA indirecte et par immunobuvardage. Les splénocytes des souris hyperimmunes ont été utilisés dans une expérience de fusion avec les cellules myélomateuses P3x63Ag8.653 murines. Les hybridomes sécréteurs d'anticorps monoclonaux dirigés contre la p36 ont été criblés à l'aide d'une épreuve ELISA indirecte et la spécificité des anticorps a été confirmée par immunobuvardage contre la protéine

p36 recombinante de même que contre la protéine native présente dans les lysats préparés à partir d'une culture de *M. hyopneumoniae*. Les AcMo anti-p36, d'isotype IgG1 κ , se sont avérés très spécifiques à *M. hyopneumoniae*, ne démontrant aucune réactivité envers les autres mycoplasmes porcins, notamment *M. arginini*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* et *A. laidlawii*, par ELISA et immunobuvardage de type western. En tout, 9 hybridomes sécréteurs d'AcMo anti-p36 ont été établis et sous-clonés. Des liquides d'ascites ont été préparés chez des souris pristanées, leurs titres en anticorps anti-p36 étant supérieurs à 1:50000 par ELISA indirecte.

Un test d'immunofluorescence indirecte sur des coupes de poumons congelés basé sur l'utilisation d'AcMo anti-p36 a été évalué sur des spécimens provenant de porcs expérimentalement infectés à l'aide d'une souche Québécoise de *M. hyopneumoniae*, IAF-DM9827. Les lésions macroscopiques observées étaient confinées aux poumons, et les principaux changements histologiques consistaient en une infiltration péribronchique et périvasculaire par des cellules lymphomonocytaires, accompagnée d'une légère hyperplasie de l'épithélium des bronchioles. Aucun dommage alvéolaire n'a été observé. Il a été possible à l'aide de la technique d'IFI de détecter la présence d'antigène de *M. hyopneumoniae* à la surface des cellules épithéliales ciliées des bronches et bronchioles. Aucune fluorescence n'a été observée dans les coupes de poumons des porcelets contrôles ne démontrant aucune lésion.

Les méthodes immunohistochimiques sont couramment utilisées par les pathologistes comme outils de diagnostic pour l'infection causée par *M. hyopneumoniae*, car elles permettent aussi une observation histologique des organes respiratoires. Les techniques d'immunofluorescence présentement appliquées utilisent des sérums polyclonaux, d'où la possibilité de résultats faux-positifs attribuables à la présence au niveau des poumons d'autres mycoplasmes qui partagent certains déterminants antigéniques de *M. hyopneumoniae*. L'immunofluorescence indirecte utilisant les AcMo anti-p36 s'est avérée une méthode très spécifique, éliminant les faux-réacteurs et les réactions croisées, et très rapide, ne prenant que 2 à 3 heures pour l'obtention des résultats.

Finalement, ces AcMo se sont avérés très efficaces pour l'identification sérologique d'isolats cultivés en milieu de culture, puisqu'une réaction spécifique en immunobuvardage ne fut démontrée que contre *M. hyopneumoniae*, et non contre *M. hyorhinis* et *M. flocculare*.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Mycoplasma hyopneumoniae est l'agent étiologique de la pneumonie enzootique porcine (Goodwin *et al*, 1965; Maré et Switzer, 1965). C'est une maladie respiratoire chronique qui est endémique dans les élevages de porcs. Elle se caractérise par des hauts taux de morbidité, mais ne cause que rarement des infections mortelles. Cette pneumonie est très contagieuse, se transmettant par aérosols, et est répandue mondialement. Les porcs infectés ont un appétit normal mais leur croissance est retardée de quelques semaines. L'infection par *M. hyopneumoniae* cause plus de 50 % des condamnations d'organes dans les abattoirs; on prétend qu'entre 30 et 80 % des porcs apportés à l'abattoir sont porteurs de lésions pulmonaires typiques de cette infection (Ross, 1992; Kobish et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). *M. hyopneumoniae* est aussi considéré comme l'un des agents secondaires les plus importants dans le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP), surtout chez les animaux en engraissement (Molitor, 1994; Van Alstine *et al*, 1996; Thacker *et al*, 1999). De plus, ce mycoplasme favorise les infections pulmonaires secondaires par les bactéries, notamment par *P. multocida* et *A. pleuropneumoniae* (Ross, 1992; Ciprian *et al*, 1994; Sørensen *et al*, 1997). Ces pathogènes augmentent donc la sévérité de l'infection et les taux de mortalité.

Le diagnostic de l'infection par *M. hyopneumoniae* fait face à plusieurs problèmes. Premièrement, c'est un organisme très fastidieux. Sa mise en culture et son isolement peut prendre plus de 1 mois. Cet agent requiert un milieu de culture très riche en sérum de porc et de cheval (Friis, 1975). Conséquemment, des protéines sériques peuvent s'absorber au niveau de la membrane de *M. hyopneumoniae*, et celles-ci peuvent réagir de façon non spécifique avec les sérum de porcs (Freeman *et al*, 1984). Une infection mixte avec *M. hyorhinae* est souvent rencontrée chez les porcs. Ce dernier, étant moins fastidieux, peut facilement être isolé en milieu de culture et le plus souvent sa croissance va interférer avec celle de *M. hyopneumoniae*, d'où un résultat faux-positif (Ross, 1992; Kobish et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996).

M. hyopneumoniae partage certains déterminants antigéniques avec d'autres mycoplasmes porcins, dont *M. hyorhinae* et, surtout, *M. flocculare* (Freeman *et al*, 1984; Armstrong *et al*, 1987; Bölske *et al*, 1987). *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare* ont des

homologies de séquences extensives, jusqu'à plus de 95 % dans leur ARN ribosomal 16S (Stemke, 1992, 1994). Ces déterminants communs favorisent les réactions croisées. En plus, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* sont des agents opportunistes qui envahissent le système respiratoire inférieur porcin et qui sont souvent présents dans les lésions pulmonaires avec *M. hyopneumoniae* (Kobish et Friis, 1996).

L'émergence de différents sérotypes chez *M. hyopneumoniae* interfère aussi avec l'efficacité des tests de dépistage sérologique du mycoplasme (Frey *et al*, 1992). Des séquences répétées sont en partie responsables de l'hétérogénéité des souches et l'organisme exprime aussi ses déterminants antigéniques majeurs à différentes fréquences et différentes combinaisons de grandeurs (Ferrell *et al*, 1989; Harasawa *et al*, 1995). Cette variabilité a pour effet de contrer le système immunitaire du porc.

Tous ces problèmes ont pour conséquences de retarder le diagnostic de *M. hyopneumoniae*, de diminuer la spécificité des tests en augmentant les résultats faux-positifs; donc, les tests de dépistage présentement utilisés sont d'une très faible efficacité. Ces problèmes interfèrent avec la mise en place de mesures d'épidémiologie et de prophylaxie qui dépendent en grande partie des tests de laboratoire utilisés pour le dépistage des animaux porteurs cliniquement sains qui sont la principale source d'infection dans les troupeaux.

M. hyopneumoniae possède plusieurs déterminants antigéniques spécifiques. La protéine cytosolique p36 en est un bon exemple. Cette protéine a été caractérisée comme étant une lactate déshydrogénase (Strasser *et al*, 1991; Haldimann *et al*, 1993). C'est une protéine hautement immunogénique qui suscite une réponse immunitaire hâtive chez les porcs infectés naturellement et expérimentalement par *M. hyopneumoniae*, à partir de la 4^{ème} semaine post infection (Stipkovits *et al*, 1991; Frey *et al*, 1994). La p36 est spécifique à *M. hyopneumoniae*, elle ne partage pas de séquences avec les protéines homologues d'autres mycoplasmes porcins ou d'autres animaux de la ferme et l'homme. De plus, cette protéine est conservée à travers les différentes souches de *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et al*, 1991). Les anticorps produits contre la p36 peuvent être

utilisés efficacement pour l'identification sérologique des isolats de *M. hyopneumoniae*. Finalement, on ne retrouve pas dans le gène codant pour la p36 le codon OPAL (TGA) stoppant la traduction, donc le gène peut être clonée et exprimée dans sa totalité sans avoir recours à la mutagenèse. Dans le cas des mycoplasmes, le codon OPAL code de préférence pour l'acide aminé tryptophane, plutôt que d'agir en tant que signal de terminaison comme c'est le cas pour *E. coli* et les cellules de mammifères (Dybvig, 1990; Bové, 1993).

Le but de ce projet était la mise au point de méthodes de dépistage de *M. hyopneumoniae* plus rapides, plus spécifiques et moins dispendieuses pour la surveillance de la présence du pathogène dans les élevages porcins.

La protéine cytosolique p36 représente un cible intéressante pour le diagnostic d'une infection causée par *M. hyopneumoniae*. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour l'amplification de la p36 ont servi à la mise au point d'un test PCR pour la détection de cet agent dans des spécimens cliniques d'animaux malades ou porteurs asymptomatiques. De plus, le clonage de la p36 et son expression sous forme de protéine de fusion, GST-p36, dans *E. coli* a permis d'obtenir des quantités suffisantes de protéine pure pour le développement d'un test sérologique et la production d'anticorps pouvant être utilisés dans des épreuves immunohistochimiques pour détecter *M. hyopneumoniae* dans des coupes de tissus porcins, de même que pour l'identification sérologique de l'agent après isolement en milieu de culture.

Le premier volet du projet, le diagnostic du mycoplasme par PCR, comprenait deux objectifs principaux. Le premier était de synthétiser des amorces d'oligonucléotides spécifiques aux gènes de la p36 et la p46 de *M. hyopneumoniae*. Une approche multiplex PCR fut utilisée pour augmenter la spécificité de la méthode. Le deuxième objectif consistait à évaluer l'efficacité du PCR comme outil de diagnostic pour *M. hyopneumoniae* à partir de spécimens cliniques reçus d'animaux affectés de problèmes respiratoires aigus ou chroniques.

Pour le volet sérologique, la p36 a tout d'abord été clonée et exprimée dans *E. coli*. Par la suite, une expérience de fusion fut réalisée afin d'obtenir des anticorps monoclonaux. Ces AcMo ont par la suite été évalués pour leur capacité à permettre l'identification sérologique d'isolats cultivés à partir de cas cliniques (spécificité et sérotypage) et leur efficacité à permettre la détection de l'agent dans les tissus des animaux (diagnostic immunohistochimique). La technique préconisée fut l'immunofluorescence indirecte sur coupes congelées de poumons.

**PARTIE I:
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

1. Revue bibliographique

1.1 Caractéristiques biochimiques et biologiques des mycoplasmes

1.1.1 Introduction

C'est en 1898, par Nocard et Roux, qu'a été isolé le premier mycoplasme chez des bovins atteints de pleuropneumonie infectieuse (Nocard et Roux, 1898). Les microbiologistes de cette époque, ne sachant pas dans quel groupe classifier cet agent, l'ont nommé PPO ou "Pleuropneumonia Organism". Au fil des années, d'autres organismes semblables ont été isolés mais n'ont pas pu être classifiés ni avec les bactéries, ni avec les virus. On les a alors appelé PPLO ou "Pleuropneumonia-Like Organisms" (Maniloff, 1992). Ce n'est que soixante-dix ans plus tard qu'on les a regroupé dans le genre *Mycoplasma* (Edward *et al*, 1967), mais que très récemment, à mesure que d'autres agents similaires mais appartenant vraisemblablement à d'autres genres, ont été isolés qu'on les a regroupé dans la classe des *Mollicutes* (du latin mollis:mou; cutis:peau) (Razin et Freundt, 1984).

1.1.2 Classification

Les *Mollicutes* font parti des *Ténéricutes* (bactéries sans paroi rigide). La division des *Ténéricutes* est l'une des quatre qui appartiennent au règne des *Procaryotae*. Les autres divisions incluent les *Firmicutes* (bactéries gram-positives), les *Gracilicutes* (bactéries gram-négatives) et les *Mendosicutes* (archaébactéries) (Razin et Freundt, 1984; Maniloff, 1992).

Les *Mollicutes* sont divisés en quatre ordres: les *Mycoplasmatales*, les *Entomoplasmatales*, les *Acholeplasmatales* et les *Anaeroplasmatales*. De plus, les *Mollicutes* contiennent des espèces qui ne sont pas classifiées car elles n'ont pas encore été cultivées. Elles sont appelées "mollicutes- ou mycoplasma-like organisms", MLO (Table 1) (Razin et Freundt, 1984; Maniloff, 1992; Tully *et al*, 1993; Dybvig et Voelker,

1996). L'ordre des *Mycoplasmatales* comprend une famille: les *Mycoplasmataceae*. La famille des *Mycoplasmataceae* comprend deux genres: les *Mycoplasma*, les *Ureaplasma*. Tous ces genres ont des espèces qui infectent les humains, les animaux, les plantes et les insectes. Le genre *Mycoplasma* est celui qui a le plus d'espèces reconnues, soit quatre-vingt neuf (Weisburg *et al*, 1989; Maniloff, 1992). Le facteur qui différencie les *Ureaplasma* des mycoplasmes est leur capacité d'hydrolyser l'urée. Toutes les espèces reconnues des *Mycoplasmataceae* ont besoin de cholestérol pour survivre et se reproduire (Razin, 1984; Razin et Freundt, 1984; Maniloff, 1992).

L'ordre des *Entomoplasmatales* est celui qui a été caractérisé le plus récemment (Tully *et al*, 1993). Il comprend deux familles: les *Entomoplasmataceae* et les *Spiroplasmataceae*. La famille des *Entomoplasmataceae* contient deux genres: les *Entomoplasma* et les *Mesoplasma*. Les espèces de ces deux genres sont retrouvées chez les insectes et les plantes. Les mésoplasmes n'ont pas besoin de cholestérol pour survivre, ils peuvent croître en présence de 0,04% Tween 80 seulement. Quelques espèces des genres *Mycoplasma* et *Acholeplasma* ont été assignées aux genres *Entomoplasma* et *Mesoplasma*, respectivement (Tully *et al*, 1993; Dybvig et Voelker, 1996). Le genre *Spiroplasma* est le seul de la famille des *Spiroplasmataceae* (Tully *et al*, 1987; Bové, 1989). Ces espèces infectent les arthropodes et les plantes et ils sont en forme de filaments hélicoïdaux. Parmi les *Mollicutes*, ce sont les spiroplasmes qui possèdent le plus grand génome (Maniloff, 1992).

L'ordre des *Acholeplasmatales* ne contient qu'une seule famille, *Acholeplasmataceae*, avec un genre, *Acholeplasma* (Freundt *et al*, 1984; Razin et Freundt, 1984). Comme l'indique le nom, les acholéplasmes n'ont pas besoin de cholestérol pour croître. Ils sont retrouvés chez les animaux, les plantes et les insectes (Razin et Freundt, 1984; Maniloff, 1992; Tully *et al*, 1993).

Le dernier ordre est celui des *Anaeroplasmatales*. Ces microorganismes sont des anaérobies obligatoires et on les a retrouvés dans le rumen des bovins et des ovins (Robinson et Freundt, 1987). Deux genres sont présentement reconnus dans la famille des *Anaeroplasmataceae*: les *Anaeroplasma*, qui ont besoin de cholestérol, et les

Asteroplasma, qui n'en requièrent pas (Razin et Freundt, 1984; Maniloff, 1992; Tully *et al*, 1993).

Les MLOs ne sont pas encore classifiés car personne n'a réussi à les cultiver jusqu'à maintenant. Ils sont retrouvés chez les plantes, les insectes et, fort probablement, les humains et les animaux (Maniloff, 1992; Dybvig et Voelker, 1996).

Jusqu'à présent, le critère de sélection principal pour la classification d'un microorganisme dans la division des *Mollicutes* est l'absence d'une paroi rigide et de peptidoglycan. Avec les progrès obtenus en biologie moléculaire, d'autres outils sont en plus utilisés pour la taxonomie des mycoplasmes. Les *Mollicutes* sont classifiés en différents groupes d'après la grandeur de leur génome (580-2220 kpb), le faible pourcentage de guanine et de cytosine dans leur ADN (23-41%), le profil électrophorétique bi-dimensionnel sur gel de polyacrylamide de leurs protéines, des expériences d'hybridation entre l'ADN et l'ARN et, surtout, d'après les séquences de nucléotides conservées au niveau de leur ARN ribosomal 16s (Razin, 1985; Weisburg *et al*, 1989; Neimark et Lange, 1990; Bové, 1993). De plus, certains tests déterminant leurs activités métaboliques sont obligatoires, tels la fermentation du glucose, l'hydrolyse de l'arginine et de l'urée et la détermination du besoin en cholestérol (Razin, 1984; Razin, 1985).

TABLEAU 1: Taxonomie et propriétés des *Mollicutes*^a

Classification	Nombre d'espèces	Grandeur du génome ^b (kpb)	% G + C dans l'ADN	Besoin en stérol	Propriétés distinctives	Habitat
Ordre I: <i>Mycoplasmatales</i> Famille I: <i>Mycoplasmataceae</i> Genre I: <i>Mycoplasma</i>	89	580-1300	23-41	+		Humains, animaux, plantes, insectes
Genre II: <i>Ureaplasma</i>	5	730-1160	27-30	+	Uréase positif	Humains, animaux
Ordre II: <i>Entomoplasmatales</i> Famille I: <i>Entomoplasmataceae</i> Genre I: <i>Entomoplasma</i>	1	790-1140	27-30	+		Insectes
Genre II: <i>Mesoplasma</i>	2	870-1100	26-30	-		Plantes, Insectes
Famille II: <i>Spiroplasmataceae</i> Genre I: <i>Spiroplasma</i>	11	940-2200	25-31	+	Filaments hélicoïdaux	Arthropodes, plantes
Ordre II: <i>Acholeplasmatales</i> Famille I: <i>Acholeplasmataceae</i> Genre I: <i>Acholeplasma</i>	12	Environ 1600 ^c	27-36	-		Animaux, plantes, insectes
Ordre III: <i>Anaeroplasmatales</i> Famille I: <i>Anaeroplasmataceae</i> Genre I: <i>Anaeroplasma</i>	4	Environ 1600 ^c	29-33	+	Anaérobies obligatoires	Rumen des ovins et bovins
Genre II: <i>Asteroleplasma</i>	1	Environ 1600 ^c	40	-	Anaérobies obligatoires	Rumen des ovins et bovins
MLOs non cultivés		500-1185	23-29	N.D.	Non cultivés	Plantes, insectes

^a Mis à jour et modifié de Maniloff (1992)

^b Données obtenues par expériences de PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) excepté où indiqué

^c Données obtenues par expériences de cinétique de renaturation

1.1.3 Structure

Les mycoplasmes sont des microorganismes procaryotes dépourvus de paroi cellulaire rigide. Ils sont composés d'une membrane plasmique, de ribosomes et d'ADN (Razin, 1984; Razin et Freundt, 1984). La membrane est typique des membranes plasmiques des autres bactéries. Elle est composée de phospholipides, de stérols, de glycolipides, de lipoglycans et de protéines, surtout des lipoprotéines. La réplication de leur génome est semi-conservative (Razin 1984; Razin et Freundt, 1984; Razin, 1985). Elle précède et, pour la majorité des mycoplasmes, n'est pas nécessairement synchronisée avec la division du cytoplasme. L'absence de paroi rigide et le manque de coordination entre la réplication génomique et la division cellulaire résultent en microorganismes pléomorphes (Razin, 1984; Razin et Freundt, 1984; Razin, 1985). Si les mycoplasmes se reproduisent par fission binaire, ils sont de forme sphérique, de 0,3 à 0,8 μm de diamètre. Par contre, ils peuvent apparaître sous forme ovoïde organisée en chaînettes ou en filaments, ayant une longueur de quelques μm à 150 μm , lorsqu'il n'y a pas de synchronisme entre la réplication et la division. De plus, l'absence de paroi rigide rend les mycoplasmes très sensibles aux différents changements de leur environnement, plus particulièrement aux changements osmotiques (Razin, 1984; Razin et Freundt, 1984; Razin, 1985; Bové, 1993). Ils sont très sensibles à la lyse par les détergents, les alcools, les anticorps spécifiques et le complément (Marshall *et al*, 1985). Ils sont résistants aux antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse de la paroi rigide, comme les β -lactames. La majorité des mycoplasmes sont non motils et n'ont pas de flagelles, mais quelques espèces, par exemple *M. pneumoniae* et *M. penetrans*, ont une organelle spécialisée qui leur permet de glisser sur certaines surfaces ou de s'adhérer aux cellules-hôtes (Razin, 1984). Cette structure représente possiblement un cytosquelette primitif (Kirchhoff *et al*, 1984; Baseman, 1996; Baseman et Tully, 1997). Les spiroplasmes se déplacent par rotation et par fléchissement dans des milieux liquides ou semi-solides (Razin, 1984).

Considérés comme les plus simples et les plus primitifs microorganismes capable de se répliquer et de se reproduire par eux-mêmes, les mycoplasmes possèdent un très petit génome, la longueur variant de 580 à 2220 kpb seulement (Razin, 1985; Bové, 1993). Leur ADN a un contenu extrêmement faible en cytosine et guanine, soit de 23 à

41%. La majorité des mycoplasmes ont un pourcentage G+C plus petit que 30% et seulement *M. pneumoniae* a un contenu G+C atteignant un pourcentage de l'ordre de 41%. Le pourcentage élevé d'adénine et de thymine dans l'ADN des mycoplasmes a fait en sorte que le codon universel d'arrêt TGA est utilisé pour l'acide aminé tryptophane à une fréquence dix fois plus élevée que le codon TGG (Bové, 1993; Dybvig, 1990). Ce phénomène cause des problèmes pour l'expression des protéines des mycoplasmes dans les systèmes d'expression procaryotes et eucaryotes. Les mycoplasmes sont des anaérobies facultatifs qui ont un système de transport d'électrons dont la cascade se termine par la flavine tronquée et qui n'implique pas de quinones et de cytochromes (Dybvig et Voelker, 1996). Les colonies sont très petites, moins que 1 mm en diamètre, et ont normalement une apparence d'oeuf frit miroir sur gélose (Razin, 1984; Razin et Freundt, 1984). Les mycoplasmes poussent dans l'agar pour obtenir le maximum de nutriments, d'où le centre plus foncé des colonies, avec un halo moins dense autour. Ces microorganismes utilisent le glucose ou l'arginine comme sources majeures d'énergie.

À cause de la capacité limitée de codage de leur génome, les mycoplasmes n'ont l'aptitude d'utiliser que certaines voies enzymatiques, certaines étant défectueuses. Par exemple, ils n'ont pas les systèmes enzymatiques nécessaires pour la production de paroi cellulaire rigide ou celui *de novo* pour la biosynthèse des purines et des pyrimidines (Baseman et Tully, 1997). De plus, ils ne possèdent pas un cycle TCA (Tricarboxylic Acid Cycle) fonctionnel et de cytochromes (Finch et Mitchell, 1992; Pollack, 1992; Fraser *et al*, 1995; Dybvig et Voelker, 1996). Conséquemment, les *Mollicutes* sont extrêmement fastidieux et doivent obtenir le plus de nutriments et de précurseurs biologiques possible de leur hôte pour pouvoir survivre, ils sont des parasites obligatoires (Baseman et Tully, 1997). Ils peuvent aussi croître dans des milieux synthétiques très riches, tels les milieux utilisés pour la culture cellulaire et tissulaire. Il existe des milieux très spécialisés pour certaines espèces de mycoplasmes (Dybvig et Voelker, 1996).

Toutes ces différentes caractéristiques démontrent les raisons pour lesquelles les mycoplasmes ont souvent été comparés aux virus, ce qui a causé des problèmes pour leur classification (Chastel, 1995). Tout comme les virus, les mycoplasmes passent à travers les filtres biologiques de porosité inférieure à 0,2 μm , sont des parasites obligatoires,

quoique généralement extracellulaires, peuvent pousser sur des cultures cellulaires et sont inhibés par des anticorps spécifiques. Par contre, ils se divisent par fission et subdivision du cytoplasme, ils poussent sur des milieux synthétiques, forment des colonies sur géloses et sont inhibés par certains antibiotiques, tout comme les bactéries. Leurs principales caractéristiques sont décrites dans le Tableau 2.

TABLEAU 2: Comparaison des mycoplasmes avec les bactéries et les virus

Caractéristiques	Bactéries	Mycoplasmes	Virus
Diamètre	> 0,22 µm	< 0,22 µm	< 0,22 µm
Type d'acide nucléique	ADN et ARN	ADN et ARN	ADN ou ARN
Parasitisme	Extra ou Intracellulaire	Parasites extracellulaires intracellulaires?	Parasitisme obligatoire
Multiplication	Fission binaire	Fission et subdivision	Réplication
Culture	Milieux synthétiques	Milieux synthétiques, cultures cellulaires	Cultures cellulaires
	Besoins nutritifs peu exigeants	Milieux enrichis	Machinerie répliquative de la cellule hôte
	Colonies grandes (>0.1 mm), formes variées	Colonies très petites (<0.1 mm), formes d'oeuf frit	NA ^a
Paroi	Paroi rigide	Absence de paroi	NA
Morphologie	Formes définies	Pléomorphes	Formes géométriques définies
Inhibition	Inhibition avec antibiotiques	Inhibition avec antibiotiques et anticorps	Inhibition avec anticorps

^aNon applicable

1.1.4 Habitat

La majorité des mycoplasmes ont une spécificité d'hôte et un tropisme tissulaire restreint (Tully, 1996). Cette caractéristique est l'une des plus saillantes des *Mollicutes*; par contre, il y a quelques exceptions, tels *M. arginini*, *M. canis*, et quelques espèces d'acholéplasmes qui ont été retrouvés chez différentes espèces animales (Tully, 1996). Les mycoplasmes ont une grande affinité pour les muqueuses respiratoires, urogénitales et gastrointestinales (Tully, 1993). On peut aussi les retrouver au niveau de la conjonctive des yeux, les glandes mammaires et les articulations d'animaux malades et sains (Tully, 1996). De plus, certains mycoplasmes sont considérés comme des microorganismes commensaux faisant parti de la flore normale de l'animal (Tully, 1996). Ayant une prédilection pour la surface des muqueuses, les mycoplasmes sont des parasites extracellulaires. Cependant, il y a de plus en plus d'évidences qui démontrent l'invasion des tissus et la location intracellulaire de certains mycoplasmes humains, notamment *M. fermentans* et *M. penetrans* (Baseman et Tully, 1997). Probablement qu'un pourcentage variable des populations de mycoplasmes peuvent envahir les tissus, soit pour se protéger ou contrer la réponse immunitaire de l'hôte ou pour l'établissement d'une infection chronique.

1.1.5 Pathogénèse

Comme dans le cas d'autres bactéries, la source de l'infection peut être exogène ou endogène. Les mycoplasmes peuvent être acquis par contact direct ou par moyens secondaires, tels les aérosols, les fientes, la nourriture et/ou l'eau, les insectes, les objets contaminés, etc (Tully, 1996). De plus, les animaux porteurs-sains ou les individus convalescents ayant récupéré cliniquement d'une infection aiguë peuvent transmettre l'infection par les mycoplasmes, comme dans la propagation de l'infection de *M. hyopneumoniae*.

Les mycoplasmes adhèrent très fermement à la surface des cellules épithéliales des différentes muqueuses de l'hôte (Baseman et Tully, 1997). Ils obtiennent les

nutriments et précurseurs biologiques qui leur permettent de croître sans causer trop de dommages aux cellules eucaryotiques. Généralement, les mycoplasmes établissent des infections de nature plutôt chroniques, mais qui peuvent devenir aiguës et mortelles lorsque d'autres agents pathogènes sont impliqués.

Le modèle du mécanisme de pathogénèse accepté des mycoplasmes est le suivant. Les mycoplasmes s'adhèrent intimement aux cellules épithéliales par l'entremise de protéines de surface spécialisées et d'adhésines (Marshall *et al*, 1995; Tully, 1996; Baseman et Tully, 1997). Les récepteurs cellulaires sont des protéines riches en résidus sialiques ou des glycolipides conjugués au sulfate. Des molécules d'adhésion accessoires sont probablement nécessaires pour l'adhérence optimale. L'adhésion des mycoplasmes est une étape critique pour la colonisation et l'établissement de l'infection (Kahane, 1995). De plus, certains mycoplasmes, dont *M. hyopneumoniae*, sont entourés d'une capsule (Tajima *et al*, 1982). Cette capsule est formée d'homopolymères de sucres. La capsule, vue par microscopie électronique, semble médier l'attachement du pathogène aux cellules hôtes. Après plusieurs passages *in vitro*, une souche de *M. hyopneumoniae* a perdu cette structure et, ainsi, sa virulence chez le porc (Tajima et Yagihashi, 1982); donc, la capsule semble être d'une importance primordiale pour la pathogénicité de certains mycoplasmes.

Les mycoplasmes endommagent les cellules-hôtes par différents moyens. Premièrement, ces parasites produisent des radicaux d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène en s'attachant aux tissus, occasionnant un stress oxydatif (Marshall *et al*, 1995; Baseman et Tully, 1997). Les radicaux induisent l'oxydation des lipides de la membrane des cellules-hôtes, affectant sa fluidité. Parfois, ils interfèrent avec certaines voies métaboliques, comme la réduction/oxydation du glutathione et les voies de synthèse des leucotriènes et de la prostaglandine. La déplétion des nutriments et des précurseurs biologiques peut perturber la survie et les fonctions des cellules atteintes (Ruuth et Praz, 1989; Baseman et Tully, 1997). Étant donné l'attachement intime entre les parasites et l'hôte, leurs membranes peuvent se fusionner ou s'échanger certains éléments et, ainsi, les mycoplasmes peuvent sécréter des enzymes (Kist *et al*, 1982; Kahane, 1995), tels les phospholipases, ATPases, hémolysines, protéases et nucléases, causant le bris des tissus

et des aberrations chromosomiques (Bové, 1993; Baseman et Tully, 1997). En dernier lieu, la capsule des plus pathogènes peut leur conférer certaines activités immunorégulatrices, leur permettant d'induire des cytokines et ainsi d'endommager la membrane de l'hôte.

1.1.6 Activation du système immunitaire de l'hôte

Peu de notions sont connues concernant la réponse immunitaire protectrice de l'hôte suite à une infection par les mycoplasmes. La première ligne de défense contre ces pathogènes est la phagocytose (Sibille et Reynolds, 1990; Marshall *et al*, 1995). Des macrophages et leukocytes polymorphonucléaires patrouillent les muqueuses respiratoires et urogénitales et s'infiltrent où il y a présence d'infection. Ces cellules phagocytent les mycoplasmes et stimulent la production de cytokines inflammatoires tels l'IFN γ , le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6 (Ruuth et Praz, 1989; Marshall *et al*, 1995). Des monocytes périphériques du sang sont aussi recrutés au site de l'infection. Chez les souris, des expériences ont démontré que les cellules NK étaient très importantes pour tuer les mycoplasmes (Davidson *et al*, 1988; Lai *et al*, 1990). Un peu plus tard dans la cinétique de l'infection, les lymphocytes et, surtout les plasmocytes, sont activés et des anticorps de type IgG et IgA sont sécrétés (Messier *et al*, 1990; Ruuth et Praz, 1989). Ceux-ci opsonisent les pathogènes et facilitent leur absorption (Marshall *et al*, 1995). Les mycoplasmes sont des activateurs polyclonaux des lymphocytes B et semblent être des mitogènes des lymphocytes T (Messier *et al*, 1990; Ruuth et Praz, 1989). Le complément sert aussi d'opsonine non spécifique. Les mycoplasmes sont sensibles à l'inhibition de croissance et lyse par le complément et les anticorps (Marshall *et al*, 1995).

1.1.7 Évasion du système immunitaire

En général, les infections par les mycoplasmes sont de nature chronique. Ces microorganismes ont trouvé plusieurs moyens d'échapper à la réponse immunitaire de leur l'hôte. Premièrement, la capsule possède des propriétés antiphagocytaires

(Rosenbusch et Minion, 1992). Elle prévient la déposition non-spécifique des opsonines, c'est-à-dire du complément et des anticorps, à la surface des mycoplasmes et, donc, en réduit la lyse et la phagocytose. De plus, elle réduit l'hydrophobicité de la membrane plasmique, ce qui augmente aussi la résistance à la phagocytose (Marshall *et al*, 1995). La capsule pourrait aussi être toxique pour les cellules eucaryotes.

Plus particulièrement, les mycoplasmes fuient le système immunitaire en s'adaptant rapidement aux changements de leur microenvironnement (Rosengarten et Wise, 1990; Bové, 1993). Ils possèdent certains mécanismes, encore non compris, qui leur permettent de varier le niveau d'expression et de modifier leurs protéines antigéniques majeures de surface (Bové, 1993; Rosengarten et Yogev, 1996; Baseman et Tully, 1997; Citti *et al*, 1997). Les mycoplasmes ont une membrane plasmique qui est composée principalement de lipoprotéines. Celles-ci forment une couche de surface qui a certaines propriétés protectrices des parois cellulaires rigides comme d'autres bactéries. Étant donné leur facilité à réarranger leur ADN génomique par l'entremise de séquences répétées, les mycoplasmes expriment leurs lipoprotéines sous différentes grandeurs et différentes combinaisons de grandeurs (Rosengarten et Wise, 1990; Citti *et al*, 1997). Ce phénomène crée une très grande diversité de surface qui permet au parasite de se protéger (Citti *et al*, 1997). Ces mutations peuvent aussi changer le tropisme cellulaire.

Un autre moyen d'évasion est d'affecter leur propre virulence. Les mycoplasmes doivent s'attacher aux cellules eucaryotes pour pouvoir coloniser et infecter l'hôte, donc induire la protection immunitaire. Ils expriment donc leur adhésines et/ou protéines cytoadhérentes sous différentes grandeurs, ce qui leur permet, ou non, d'adhérer aux cellules épithéliales (Baseman et Tully, 1997). Une autre façon de se protéger contre les drogues et le système immunitaire est d'envahir les tissus, donc d'avoir une localisation intracellulaire (Marshall, 1995; Dybvig et Voelker, 1996; Baseman et Tully, 1997). Le mécanisme d'entrée n'est pas connu et cette hypothèse demeure encore controversée.

1.2 Mycoplasmes porcins

1.2.1 Généralités

Le porc peut être infecté par plusieurs microorganismes responsables de gastroentérites, des troubles de la reproduction, des problèmes nerveux, métaboliques et, surtout, respiratoires. Les principaux agents infectieux sont les virus, tels le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcine (SRRP) et le virus de l'influenza, les bactéries, telles *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae*, *Strep. suis*, et les mycoplasmes. Tous ces agents ont la capacité de causer d'énormes problèmes de santé, de mortalité et des pertes économiques majeures pour l'industrie de l'élevage du porc au Québec et ailleurs au Canada.

Les infections animales par les mycoplasmes ont beaucoup d'importance car elles causent des problèmes de santé graves chez les animaux commerciaux et expérimentaux. En plus d'occasionner des pertes économiques significatives pour les fermiers, les mycoplasmes peuvent interférer avec les travaux de recherches médicales et biologiques car ils affectent tous les animaux de laboratoire, sauf le lapin, et contaminent les cultures cellulaires (Maniloff, 1992). Ils peuvent altérer les résultats et sont difficiles à détecter, la décontamination étant souvent sans succès.

Le porc peut être infecté par plusieurs espèces de mycoplasmes, notamment *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinae*, *M. flocculare*, *M. hyopharyngis*, *M. suis* et différentes espèces d'acholéplasmes (Ross, 1992). La majorité de ces bactéries sont retrouvées chez les porcs sains et leur pathogénicité demeure incertaine jusqu'à présent. Les mycoplasmes porcins les plus souvent retrouvés et les mieux connus sont les quatre suivants: *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, *M. hyorhinae*, *M. flocculare* (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Le porc est le seul hôte naturel pour ces mycoplasmes (Table 3).

1.2.2 *Mycoplasma flocculare*

M. flocculare est une espèce qui réside principalement dans le tractus respiratoire des porcs (Kobisch et Friis, 1996). Ce microorganisme est aussi retrouvé dans des poumons sains ou présentant des lésions de pneumonie enzootique. C'est, de plus, un commensal des yeux et du nez. Ce mycoplasme a une distribution universelle dans les élevages de porcs (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Les porcelets sont infectés par leurs mères ou les autres porcs par contact direct avec leurs sécrétions nasales ou par aérosols. Les résultats obtenus lors d'infections expérimentales suggèrent de considérer *M. flocculare* comme un agent non-pathogène (Strasser *et al*, 1992); donc, le développement des traitements et mesures de prophylaxies semblent être superflus.

L'intérêt scientifique porté pour *M. flocculare* est dû à sa grande ressemblance à *M. hyopneumoniae*, l'agent de la pneumonie enzootique du porc. Ces deux espèces de mycoplasme possèdent plusieurs déterminants antigéniques communs et beaucoup de similarité de séquence. On dénote plus de 95% d'homologie de séquence pour leur ARN ribosomal 16s (Stemke *et al*, 1992; Stemke *et al*, 1994). Le diagnostic de *M. hyopneumoniae* par les techniques sérologiques conventionnelles est parfois entravé à cause des réactions croisées existant entre ces deux microorganismes (Freeman *et al*, 1984; Strasser *et al*, 1992).

TABLEAU 3: Mycoplasmoses porcines

Agent	Cause
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Pneumonie enzootique Très virulent Tous les âges
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Polysérosite, arthrite, pneumonie Peu virulent Porcelets
<i>Mycoplasma hyosynoviae</i>	Polyarthrite sérofibrineuse Modérément virulent Porcs en engraissement
<i>Mycoplasma flocculare</i>	Peu virulent Commensal des muqueuses respiratoires et des yeux Parfois retrouvé dans les lésions pulmonaires avec <i>M.hyopneumoniae</i>

1.2.3 *Mycoplasma hyorhinis*

M. hyorhinis est fréquemment retrouvé dans les élevages porcins. Aux Etats-Unis, *M. hyorhinis* infecte de 2 à 5 % des porcs (Maniloff, 1992). Ses habitats normaux sont les membranes muqueuses du système respiratoire supérieur et les amygdales (Friis et Feenstra, 1994). C'est un agent opportuniste qui envahit le système respiratoire inférieur et qui est associé au complexe étiopathologique de la pneumonie chez les porcelets (Friis, 1971). *M. hyorhinis* est aussi dans certaines circonstances associé à de l'arthrite et de la polysérosite chez les porc d'engraissement (Kobisch et Friis, 1996). Il infecte les porcelets de trois à dix semaines d'âge et est transmis par contact direct avec les truies ou d'autres porcs plus vieux (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Le diagnostic de l'infection se fait par différents tests sérologiques, tels la fixation du complément et l'hémagglutination indirecte. Les porcs infectés peuvent être traités avec des antibiotiques, mais les résultats ne sont pas toujours satisfaisants (Ross, 1992).

M. hyorhinis est l'un des contaminants principaux des cultures cellulaires. C'est aussi un contaminant des cultures de *M. hyopneumoniae*. La culture est encore une technique importante pour le diagnostic et l'identification de *M. hyopneumoniae*. Étant donné que *M. hyorhinis* pousse beaucoup plus rapidement, il interfère souvent avec l'isolement de *M. hyopneumoniae* et contamine souvent les cultures de ce dernier. Cet agent pathogène possède aussi des déterminants antigéniques communs avec *M. hyopneumoniae* et les réactions croisées gênent les résultats obtenus par les tests sérologiques effectués pour *M. hyopneumoniae* (Freeman *et al*, 1984).

1.2.4 *Mycoplasma hyosynoviae*

M. hyosynoviae colonise les tissus articulaires des porcs (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Il est la principale cause de la polyarthrite sérofibrineuse. On peut quelques fois le mettre en évidence dans les voies respiratoires. C'est un agent pathogène qui est retrouvé partout à travers le monde, qui se propage très rapidement résultant en des taux élevés de morbidité (Kobisch et Friis, 1996). L'infection se répand graduellement chez

les animaux pour atteindre des taux de morbidité approchant 100% (Nielsen *et al*, 1996). Les porcelets sont infectés par leur mère après quatre à six semaines d'âge, les porcelets plus jeunes étant rarement infectés. Cette résistance à l'infection, sans avoir été causée par un contact initial avec cet agent pathogène, est une caractéristique unique parmi les mycoplasmes porcins (Ross et Spear, 1973).

En général, les porcs en engraissement, de 30 à 40 kg et 100 kg et plus, sont les plus atteints par *M. hyosynoviae* (Ross et Duncan, 1970; Nielsen *et al*, 1996). Les symptômes sont normalement aigus. Généralement, les porcs ont de la difficulté à se mouvoir et ils sont atteints de raideur, boitent et ont le dos arché. Ils deviennent éventuellement incapables de se lever.

La suppression des signes cliniques se fait couramment en ajoutant des antibiotiques à la nourriture. Par contre, des rechutes chroniques ont aussi été observées (Kobisch et Friis, 1996). Des facteurs prédisposants, comme la génétique, le sevrage précoce, la propreté de l'établissement, et autres, semblent influencer le développement de la maladie (Kobisch et Friis, 1996). L'infection par *M. hyosynoviae* est le plus souvent dépistée à l'abattoir. Le diagnostic de cet organisme se fait par des tests d'immunofluorescence sur les colonies formées sur les géloses et des épreuves ELISA de compétition. L'infection est traitée avec des antibiotiques (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Peu d'informations pertinentes ont été obtenues sur la vaccination contre *M. hyosynoviae*.

1.3 *Mycoplasma hyopneumoniae*

1.3.1 Caractéristiques de la maladie

M. hyopneumoniae est l'agent principal de la pneumonie enzootique porcine (Goodwin *et al*, 1965; Maré et Switzer, 1965). C'est l'une des maladies les plus chroniques dans les élevages de porcs, causant des pertes économiques considérables. Il s'agit d'une maladie respiratoire caractérisée par des hauts taux de morbidité et des taux

de mortalité faibles (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). On prétend qu'entre 30 et 80% des porcs envoyés à l'abattoir ont des lésions pulmonaires typiques associées à la pneumonie enzootique (Kobisch et Friis, 1996). C'est une maladie répandue mondialement et qui est, la plupart du temps, endémique dans un troupeau. Ce type de pneumonie atteint les porcs dès l'âge de 3 à 10 semaines, mais les porcs de tous les âges semblent également susceptibles à cette infection (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Le principal signe clinique est une toux sèche et non productive qui est observée pendant quelques semaines ou mois, sans toutefois être constante (Ross, 1992; Maes *et al*, 1996). Parfois, une légère fièvre peut accompagner la toux. L'appétit est généralement normale mais la croissance est retardée de quelques semaines. C'est une maladie très contagieuse, qui se transmet par aérosols ou par contact direct, de nez à nez (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). La pneumonie enzootique est plus commune chez les jeunes animaux probablement parce que les adultes ont été exposés à cet agent pathogène auparavant, ce qui les protégerait contre une réinfection. Par contre, lorsqu'un élevage est assaini et devient infecté par *M. hyopneumoniae*, tous les porcs développent une pneumonie aiguë et intense. Les coûts défrayés pour les infections à *M. hyopneumoniae* peuvent atteindre les \$200 millions chaque année aux États-Unis seulement (Kobisch et Friis, 1996). Ce montant inclut les coûts des mesures prophylactiques et thérapeutiques, les retards de croissance qui résultent en faibles indices de conversion alimentaire. Conséquemment, des jours additionnels sont nécessaires pour engraisser les porcs à un poids commercialement accepté d'approximativement 108 kg, et les condamnations d'organes dans les abattoirs peuvent atteindre les 50% (Maes *et al*, 1996). *M. hyopneumoniae* est de plus un agent qui favorise les infections pulmonaires secondaires par les bactéries, notamment *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* et *Bordetella bronchiseptica* (Ross, 1992; Ciprian *et al*, 1994; Sørensen *et al*, 1997). Il est aussi considéré comme l'un des agents secondaires le plus souvent associé au syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) (Thacker *et al*, 1999).

1.3.2 Propriétés générales de *M. hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae a été isolé en 1965 simultanément par Goodwin et collaborateurs en Angleterre, et par Maré et Switzer aux États-Unis. Les premiers auteurs l'ont nommé *M. suisneumoniae*, mais c'est le nom donné par les auteurs américains, *M. hyopneumoniae*, qui est le plus couramment utilisé (Ross *et al*, 1979). Cet agent a été l'un des premiers mycoplasmes à être observé sous le microscope, vers la fin des années 1950 (Chastel, 1995). *M. hyopneumoniae* est une bactérie de forme ronde ou ovoïde possédant un diamètre moyen de 0,20 µm, et qui est composé d'une membrane plasmique, de ribosomes et d'un ADN circulaire double brin (Maes *et al*, 1996). Une couche d'homopolymères de sucres, la capsule, peut être observée autour de la membrane lorsque les cellules sont colorées au rouge de ruthénium (Tajima et Yagihashi, 1982). Le génome est de très petite taille, 1100 kpb seulement; donc, *M. hyopneumoniae* code pour le nombre minimum de protéines. Le pourcentage de G + C est de 28% et le codon d'arrêt universel, TGA, est utilisé pour le tryptophane (Dybvig et Voelker, 1996). *M. hyopneumoniae* peut être cultivé sur milieu synthétique, mais sa croissance est extrêmement lente, de 2 à 30 jours dans certains cas (Ross, 1992; Maes *et al*, 1996). Cette espèce de mycoplasme oxyde le glucose, produit une turbidité légère du bouillon de culture ainsi qu'un changement de couleur dû à l'acidification. Plusieurs passages *in vitro* sont nécessaires pour adapter ce mycoplasme au bouillon et ainsi obtenir une croissance plus rapide (Ross, 1992). *M. hyopneumoniae* pousse aussi sur gélose et les colonies, mesurant en moyenne 0,5 mm de diamètre, doivent être observées sous un microscope (Razin et Freundt, 1984; Ross, 1992; Maes *et al*, 1996). Elles n'ont pas de centre plus foncé, donc elles n'ont pas la forme typique d'un oeuf frit sur le plat observée pour la majorité des autres espèces de mycoplasmes. La croissance sur gélose est plus rapide, de 2 à 15 jours, et nécessite une atmosphère enrichie de 5% CO₂. Le milieu le plus utilisé est celui décrit par Friis (1973), et il nécessite l'ajout de plusieurs facteurs de croissance, tels que de l'extrait de levure frais, du sérum de porc et/ou de cheval ajoutés jusqu'à un volume de 20% comme source de cholestérol. Étant donné la richesse du milieu, une concentration élevée d'antibiotiques doit être incluse pour prévenir la contamination bactérienne, et jusqu'à 5% de sérum spécifique anti-*M. hyorhinis* peut être additionné pour interférer avec la croissance de ce dernier souvent présent en infection mixte dans

les poumons des porcs. Du rouge de phénol doit être présent comme indicateur du niveau d'acidité du milieu. Beaucoup de soins doivent être pris durant la manipulation du milieu et de ses constituants pour éviter la contamination par d'autres microorganismes.

1.3.3 Pathogénèse de l'infection par *M. hyopneumoniae*

Le modèle généralement accepté pour expliquer la pathogénèse de *M. hyopneumoniae* est le suivant. L'organisme entre en contact avec le porc et s'attache intimement aux cils des cellules épithéliales de la trachée et des poumons (Zielinski et Ross, 1993; DeBey et Ross, 1994; Zhang *et al*, 1994). Les premiers signes cliniques de la pneumonie enzootique porcine apparaissent habituellement après une période d'incubation de 2 semaines (Amanfu *et al*, 1984; Ross, 1992; Sørensen *et al*, 1997). Dans certains cas, cette durée est plus variable et dans de nombreux élevages de porcs, où on fait un usage bien contrôlé des antibiotiques, les animaux ne présentent des symptômes et une séroconversion qu'après plusieurs mois. L'adhérence est médiée par l'attachement de l'adhésine de *M. hyopneumoniae*, la protéine membranaire p97, aux récepteurs riches en résidus d'acide sialique des glycolipides des cellules ciliées de l'hôte (Zhang *et al*, 1994a, b; Zhang *et al*, 1995; Hsu *et al*, 1997). D'autres facteurs sont probablement nécessaires pour l'attachement et la virulence de cet agent pathogène, comme la présence d'une capsule (Tajima et Yagihashi, 1982) et de protéines accessoires de surface, mais le mécanisme d'adhésion n'est pas encore parfaitement élucidé. *M. hyopneumoniae* se multiplie d'abord dans les bronchioles et les espaces alvéolaires. Les premiers mécanismes de défense du système respiratoire supérieur du porc, les cils et le mucus sécrété par les cellules épithéliales, entrent en action causant l'aggrégation des cellules bactériennes, ce qui attire aux sites d'infection des macrophages. La toux commence lorsque du mucus et des débris cellulaires obstruent les petits passages d'air. Les plasmocytes et lymphocytes régionaux attaquent les mycoplasmes mais sans trop de succès car ceux-ci sont hors d'atteinte dans les alvéoles. Quand les cellules de *M. hyopneumoniae* se multiplient, les cils perdent leur habileté à fonctionner, se brisent et, éventuellement, se détachent de la surface des cellules épithéliales (DeBey et Ross, 1994). Des cytokines inflammatoires sont produites et le porc devient plus susceptible

aux infections secondaires. La lumière des bronchioles et des bronches est comprimée par la prolifération excessive des cellules épithéliales et l'accumulation de cellules polymorphonucléaires. Les fonctions du poumon sont alors perturbées et les lésions se développent. Les lésions sont surtout associées aux lobes apicaux et cardiaques, le lobe accessoire et la portion crânienne des lobes caudaux des poumons (Kobisch et Friis, 1996). La respiration devient de plus en plus laborieuse, puisant l'énergie qui devrait être utilisée pour la maintenance et la croissance du porc.

1.3.4 Protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae*

Plusieurs protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* ont été identifiées à partir de différentes souches (Scarman *et al*, 1997), dont trois protéines membranaires, p46, p54 et p74 (Geary et Walczak, 1983; Futo *et al*, 1994), quatre lipoprotéines de surface, p44, p50, p65 et p70 (Klinkert *et al*, 1985; Wise and Kim, 1987; Kim *et al*, 1990), une protéine cytosolique, p36 (Strasser *et al*, 1991), et une adhésine, p97 (Zhang *et al*, 1995). Ces protéines peuvent être détectées par immunobuvardage de type Western, après incubation en présence de sérum de porc infecté, dès les premières semaines post-infection et les anticorps contre ces protéines persistent pour un minimum de 20 semaines. Les lipoprotéines, p44, p50, p65 et p70 sont considérées comme antigènes majeures et spécifiques à *M. hyopneumoniae* (Geary et Walczak, 1983; Wise et Kim, 1987). La lipoprotéine p65 s'avère hautement immunogène et son domaine immunogénique est localisé à son extrémité C-terminale. Ce domaine et la majorité de la région adjacente de la p65 sont présents et accessibles à la surface externe de la membrane plasmique de *M. hyopneumoniae* (Kim *et al*, 1990). Ces quatre protéines peuvent être séparées des préparations membranaires suite à des traitements avec des détergents, tel le triton X-114 (Wise et Kim, 1987).

La protéine membranaire p54 a été caractérisée comme étant un facteur cytopathique en se basant sur les dommages que des extraits membranaires ont causé sur des cultures cellulaires (Geary et Walczak, 1983, 1985). Elle contribue probablement au

développement des lésions pulmonaires chez le porc, mais aucune étude n'a été publiée sur sa spécificité et sur son immunogénicité.

Une autre protéine membranaire, p46, est spécifique et élicite une réponse immune hâtive chez le porc, des anticorps anti-p46 étant détectés dès la deuxième semaine post-infection (Mori *et al*, 1988). Les analyses de séquences démontrent que cette protéine a une séquence de tête consensus à une possible lipoprotéine (Futo *et al*, 1995). En plus, la p46 a été utilisée comme antigène pour la production d'un anticorps monoclonal spécifique de *M. hyopneumoniae*, et pour le développement d'une épreuve ELISA double sandwich pour le dépistage des anticorps spécifiques chez le porc (Mori *et al*, 1988; Futo *et al*, 1995).

La dernière protéine de surface, p74, a été préalablement identifiée comme une protéine spécifique à *M. hyopneumoniae* (Brooks et Faulds, 1989), mais une étude plus récente démontre qu'elle partage des déterminants antigéniques avec *M. hyorhinis* et, surtout, *M. flocculare* (Scarman *et al*, 1997). La p74 a un poids moléculaire de 74,5 kDa et elle induit la production d'anticorps neutralisants rapidement lors de l'infection. Elle partage des similarités de séquences avec certaines protéines induisant le choc thermique (Brooks et Faulds, 1989). Cette protéine de surface est utilisée comme antigène dans une épreuve ELISA de compétition disponible commercialement, utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope spécifique à cette protéine (Feld *et al*, 1992).

La p97 est une autre protéine de surface; c'est la première adhésine identifiée de *M. hyopneumoniae* (Zhang *et al*, 1995). Cette protéine suscite une réponse immune très hâtive chez le porc quelques jours plus tôt que d'autres protéines immunogènes du mycoplasme, et semble impliquée dans l'induction d'une immunité locale protectrice. Des anticorps de type IgA et IgM dirigés contre la p97 peuvent être détectés dans les lavages trachéobronchiolaires. Cette protéine est spécifique à *M. hyopneumoniae* et cette spécificité est associée à une région qui comporte des séquences répétées près du domaine C-terminal (Hsu et Minion, 1998). Des études ont démontré que l'expression de ces régions répétées jouent un rôle primordial dans la pathogénie et la virulence de *M. hyopneumoniae* (Wilton *et al*, 1998). Les souches avirulentes, comme la souche J, ont 9

régions réitérées, tandis que les souches pathogènes ont 12 ou plus de ces régions. Ces régions facilitent probablement l'attachement de la p97 aux récepteurs cellulaires et, ainsi, la colonisation et l'infection par *M. hyopneumoniae* (Wilton *et al*, 1998). La majorité des adhésines des mycoplasmes se ressemblent au niveau de leur conformation et la localisation de leurs épitopes majeurs; leurs structures biochimiques sont toutes comparables à l'adhésine la mieux caractérisée, soit la P1 de *M. pneumoniae* (Razin et Jacobs, 1992). En revanche, la p97 de *M. hyopneumoniae* est unique puisqu'elle diffère des adhésines des autres mycoplasmes de par sa conformation et la séquence des acides aminés localisés au niveau du domaine de son extrémité N-terminale (Hsu *et al*, 1997).

Deux autres adhésines potentielles de *M. hyopneumoniae* ont été identifiées. La première est Mhp1, une protéine membranaire de 124 kDa (Wing *et al*, 1997). Le gène codant pour la Mhp1 a été cloné et la protéine a été exprimée. La protéine recombinante a été utilisée comme vaccin pour immuniser les porcs contre *M. hyopneumoniae*. Suite à une infection-défi avec la souche homologue de *M. hyopneumoniae*, les auteurs ont observé une légère diminution des signes cliniques, suggérant que la protéine de fusion aurait bloqué certains récepteurs cellulaires et empêché partiellement l'attachement de *M. hyopneumoniae* (Wing *et al*, 1997). Ces résultats, non significatifs pour la production commerciale d'un vaccin, démontrent tout de même l'importance de Mhp1 pour la colonisation de ce microorganisme. Les auteurs de cette recherche suggèrent que Mhp1 et p97 sont la même adhésine, de par l'homologie de leurs séquences et les données immunologiques obtenues au cours de cette étude (Wing *et al*, 1997). L'adhésine serait exprimée avec plus ou moins de régions répétées selon les différentes souches, 12 et 15 régions pour la p97 et la Mhp1, respectivement.

L'autre adhésine putative est une glycoprotéine de surface de 110 kDa (p110), qui est composée d'une sous unité de 54 kDa (p54) et de deux sous-unités de 28 kDa (p28) (Chen *et al*, 1998). Présentement, aucune étude n'a été faite pour démontrer si l'unité p54 est la même protéine que le facteur cytopathique de *M. hyopneumoniae*. L'unité p54 est la plus antigénique et elle élicite la production d'anticorps très tôt dans l'infection (Chen *et al*, 1998).

L'identification de différentes adhésines suggère que la cytoadhérence de *M. hyopneumoniae* aux cellules épithéliales ciliées est probablement un processus multifactoriel (Zielinski et Ross, 1993).

Une protéine cytosolique de 36 kDa (p36) a aussi été identifiée. La p36 est hautement immunogène et est reconnue, moins précocement que dans le cas de la p46, par les sérums de porcs infectés naturellement et expérimentalement par *M. hyopneumoniae* (Strasser *et al*, 1991). Les anticorps contre la p36 sont sécrétés en deux étapes (Frey *et al*, 1994). La première réponse, relativement faible, est détectée de 5 à 10 semaines post-infection, lorsque les signes cliniques et les lésions sont apparentes. La deuxième réponse est observée à partir de la douzième semaine post-infection, lorsque les signes de la maladie et *M. hyopneumoniae* disparaissent, et persiste jusqu'à la 21ème semaine. Cette protéine est très spécifique à *M. hyopneumoniae*, elle ne démontre aucune réactivité envers *M. flocculare* et *M. hyorhinis* (Stipkovits *et al*, 1991; Strasser *et al*, 1991; Haldimann *et al*, 1993; Scarman *et al*, 1997). De plus, cette protéine ne contient pas de TGA, donc elle a été clonée et exprimée complètement sans avoir eu recours à la mutagenèse (Strasser *et al*, 1991). La p36 est aussi très conservée parmi les différentes souches de *M. hyopneumoniae*. La séquence totale de p36 a été décrite et confirme que celle-ci est une lactate déshydrogénase (Haldimann *et al*, 1993). Son rôle dans la pathogénie de *M. hyopneumoniae* n'est pas connu, mais son immunogénéicité suggère qu'elle est importante pour l'établissement de l'infection. Les auteurs ont démontré que les anticorps contre la p36 sont détectables par immunobuvardage dans des sérums de porcs infectés expérimentalement à partir de la 4ième semaine à plus de 12 semaines après le début de l'infection (Frey *et al*, 1994). Étant donné sa localisation intracellulaire, cette protéine n'induit probablement pas une immunité protectrice chez le porc; cependant, étant une protéine bien conservée chez les différents isolats de *M. hyopneumoniae*, la p36 pourrait être utilisée comme outil de diagnostic.

1.3.5 Diagnostic de l'infection par *M. hyopneumoniae*

1.3.5.1 Diagnostic clinique et pathologique

Les producteurs et les vétérinaires peuvent suspecter une infection par *M. hyopneumoniae* en observant les signes cliniques des porcs, soit une légère fièvre, une toux inconstante qui peut durer jusqu'à deux mois, un faible retard de croissance et une morbidité élevée (Ross, 1992; Maes *et al*, 1996). Les symptômes deviennent plus sévères, le retard de croissance plus marqué et la mortalité augmente lorsque *M. hyopneumoniae* est associé à d'autres pathogènes, comme *P. multocida* et *A. pleuropneumoniae* (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996).

Une infection à *M. hyopneumoniae* peut aussi être dépistée à l'abattoir. Les lésions causées par cet agent sont caractéristiques et diffèrent de celles causées par d'autres pathogènes (Ross, 1992). *M. hyopneumoniae* peut être isolé à partir du mucus de la trachée et des poumons. La culture est l'un des tests les plus fréquemment utilisé pour identifier une infection par *M. hyopneumoniae*. Par contre, cet organisme est extrêmement fastidieux et la culture peut prendre plus d'un mois. Les différents isolats ne sont pas toujours cultivables, et les cultures sont souvent contaminées par *M. hyorhinis* (Maes *et al*, 1996).

1.3.5.2 Diagnostic immunohistochimique

Une technique d'immunofluorescence indirecte sur des coupes congelées de poumons est souvent employée pour diagnostiquer la présence de *M. hyopneumoniae* (Maes *et al*, 1996). Un résultat positif est associé avec des lésions de pneumonie intense. En plus d'un manque de sensibilité, ce test utilise des anticorps polyclonaux dirigés contre *M. hyopneumoniae*, qui partage des déterminants antigéniques avec *M. flocculare* et *M. hyorhinis* (Freeman *et al*, 1984; Stemke *et al*, 1992; Stemke *et al*, 1994). La spécificité du test devient donc arbitraire, et un test positif peut quelques fois être dû aux deux autres mycoplasmes qui sont souvent présents dans les poumons malades. Des tests

d'immunoperoxydase ont aussi été rapportés pour la détection des antigènes au niveau des tissus des animaux infectés (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996).

1.3.5.3 Diagnostic sérologique

Différents tests sérologiques sont utilisés pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae*, dont l'agglutination rapide sur lame, l'hémagglutination indirecte, la fixation du complément et l'ELISA (Freeman *et al*, 1984; Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). Encore une fois, les déterminants communs partagés par *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare* résultent en des réactions croisées et non spécifiques (Freeman *et al*, 1984). De plus, les mycoplasmes absorbent au niveau de leur membrane des protéines sériques lorsqu'ils sont cultivés. La contamination par ces gammaglobulines et albumine contenues dans le sérum peuvent altérer la spécificité des tests sérologiques. Présentement, un test ELISA de compétition est disponible commercialement (Feld *et al*, 1992). Dans ce test, on utilise une protéine membranaire, la p74, comme antigène et un anticorps monoclonal contre cette protéine comme anticorps compétiteur. Les résultats corréleront bien avec ceux obtenus par d'autres tests, mais vu l'incertitude de la spécificité de cette protéine, il peut y avoir des résultats faux-positifs attribuables aux réactions croisées. Une épreuve ELISA double "sandwich" utilisant un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement la protéine membranaire p46 a aussi été développée (Mori *et al*, 1987; Futo *et al*, 1995). Avec cette méthode, la pneumonie enzootique porcine peut être détectée 2 semaines après le début de l'infection. D'autres chercheurs ont mis au point des techniques ELISA utilisant des extraits de membranes obtenus après traitement de la bactérie par différents détergents. Nicolet et collaborateurs (1980) ont développé un ELISA utilisant un antigène extrait au Tween 20. Ils n'ont pas observé de réaction croisée avec *M. flocculare*, mais la spécificité a été augmentée suite à l'utilisation simultanée d'un antigène plus pur et un anticorps monoclonal (ELISA de compétition). D'autres groupes ont utilisé des ELISA pour le suivi sérologique de l'infection par *M. hyopneumoniae* à partir du colostrum de truies, un spécimen qui peut être collecté par les éleveurs de porcs, qui peut se conserver facilement et qui contient plus d'anticorps anti-mycoplasmes que le sérum (Sørensen *et al*, 1993).

1.3.5.4 Diagnostic moléculaire de l'infection par *M. hyopneumoniae*

Avec les progrès faits en biologie moléculaire, d'autres techniques de diagnostic ont été utilisées pour détecter l'infection causée par *M. hyopneumoniae*, notamment l'hybridation *in situ* et l'amplification des gènes par la réaction de polymérase en chaîne (PCR) (Harasawa *et al*, 1991; Artiushin *et al*, 1993). En se basant sur ces techniques, des sondes moléculaires spécifiques aux mycoplasmes porcins ont été développées (Ahrens et Friis, 1991; Abiven *et al*, 1992). Blanchard et collaborateurs (1980) ont utilisé la technique PCR pour détecter *M. hyopneumoniae* dans des lavages trachéobronchiolaires de porcs expérimentalement infectés. Les amorces sélectionnées ont permis l'amplification d'un fragment de 1561 pb provenant de la sonde I141 (numéro d'accès U02537 dans la librairie GenBank/EMBL), qui est un possible gène rapporteur d'ATP. Ce PCR n'amplifie pas l'ADN d'autres mycoplasmes et bactéries, s'avère sensible et une bonne corrélation est obtenue avec les résultats du test d'immunofluorescence sur coupes congelées de tissus. D'autres chercheurs ont développé des PCR utilisant des amorces universelles qui amplifient des fragments de l'ARN ribosomal 16s (Stemke *et al*, 1994; Mattsson *et al*, 1995). Ces PCR sont spécifiques et sensibles quand l'ADN est obtenu d'homogénats de poumons infectés. En plus, ces méthodes de PCR peuvent aussi différencier *M. hyopneumoniae* de *M. hyorhinis* et *M. flocculare* (Stemke *et al*, 1994; Stemke, 1997). À partir de l'ARN 16s, il est aussi possible d'étudier l'hétérogénéité au sein d'une même espèce de mycoplasmes (Artiushin et Minion, 1996). Ces amorces ont aussi été utilisées pour la détection de *M. hyopneumoniae* à partir des écouvillons nasaux (Mattsson *et al*, 1995). Par contre, ces tests perdent beaucoup de sensibilité et la présence de *M. hyopneumoniae* dans les cavités nasales peut être détectée par PCR seulement durant une période de temps limitée. Très récemment, un "nested PCR" a été développé pour dépister le mycoplasme dans les écouvillons nasaux (Calsimiglia *et al*, 1999). Cette PCR utilise deux paires d'amorces qui ont été synthétisées à partir de la séquence de l'ARN ribosomal 16s. Environ 60% des cas positifs ont été identifiés par cette méthode.

La PCR s'avère une technique fort intéressante pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae* (Sørensen *et al*, 1997; Baumeister *et al*, 1998). Dépendant des amorces

utilisées, la PCR est une technique hautement spécifique qui permet de différencier les mycoplasmes porcins et d'éliminer les réactions croisées. C'est aussi une méthode sensible, rapide et fiable. D'autres recherches doivent être faites pour améliorer la détection de *M. hyopneumoniae* dans des spécimens cliniques de porcs vivants, tels les lavages trachéobronchiolaires et les écouvillons nasaux.

1.3.6 Prophylaxie

Les traitements utilisés pour contrôler l'infection causée par *M. hyopneumoniae* sont restreints et les résultats ne sont pas toujours garantis. L'absence de paroi cellulaire rigide rend les mycoplasmes insensibles aux antibiotiques β -lactams, comme la pénicilline et ses analogues, et ils sont généralement résistants aux polymyxines, rifampine et sulfonamides (Maes *et al*, 1996). Présentement, les antibiotiques les plus performants pour traiter les infections par *M. hyopneumoniae* sont les tétracyclines, les macrolides et quelques fluoroquinolones (Kobisch et Friis, 1996). D'autres drogues, comme les aminoglycosides et le chloramphénicol, sont moins puissantes, et le pathogène peut malgré tout coloniser et infecter le porc (Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996).

Beaucoup d'études sont en cours pour trouver d'autres médicaments pour traiter les mycoplasmoses animales. Terr Laak et collaborateurs (1991) ont démontré que la spiramycine, la tylosine, la kitasamycine, la spectinomycine, la tiamuline, la lyncomycine et la clindamycine sont des substances inhibitrices efficaces *in vitro*. Par contre, Hannan et Ripley (1996) ont démontré *in vitro* le développement de résistance chez *M. hyopneumoniae* envers certaines de ces drogues, dont SDZ PMD 296, la tiamuline, la tylosine et l'oxytétracycline. De plus, toutes les souches ne réagissent pas de façon similaire à chaque médicament; dépendant du traitement, quelques souches sont susceptibles, d'autres ne le sont pas. Des agents antimicrobiens qui semblent très efficaces *in vitro* et *in vivo* sont les quinolones (Kobisch et Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). Elles semblent inhiber toutes les souches de *M. hyopneumoniae* testées, et aucune résistance ne leur a été attribuée.

1.3.7 Contrôle et prévention

Pour obtenir un contrôle efficace contre la pneumonie enzootique porcine, les producteurs doivent maintenir un environnement optimal; c'est-à-dire, une bonne qualité d'air, un système de ventilation adéquat, une température constante, des taux d'ammoniac et d'humidité respectable, une nourriture saine et un nombre limité d'animaux dans une même pièce (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Il faut aussi éviter les déménagements trop fréquents. Certains auteurs suggèrent qu'une pièce ne devrait pas combiner des porcs avec des variations d'âge de plus de trois semaines (Clark *et al*, 1989). Cette ségrégation évite la transmission de *M. hyopneumoniae* par les porteurs sains. L'inspection périodique des fermes, l'examen des poumons à l'abattoir, des examens cliniques fréquents et des suivis sérologiques réguliers sont des méthodes nécessaires pour surveiller les troupeaux et les maintenir productifs (Ross, 1992). On sait depuis plusieurs années que les truies plus âgées, rétablies d'une infection par *M. hyopneumoniae*, ont éliminé ce pathogène de leur système respiratoire. Donc, ces truies peuvent être réutilisées pour la reproduction, mais en prenant soin de les isoler des autres porcs de la ferme. Après assainissement d'un troupeau, on devrait ne pas y mettre les animaux de moins d'un an pour une période minimale d'un mois. Cette méthode a été évaluée avec succès au Danemark, les producteurs ayant réussi à éradiquer la pneumonie enzootique de leur élevage (Kobisch et Friis, 1996).

Un autre moyen pour éradiquer et contrôler *M. hyopneumoniae* est de repeupler les troupeaux infectés par des animaux sains. Le programme "SPF pig" est l'un des plus appliqués (Twichaus et Underdahl, 1975). Les porcelets naissent par hystérectomie ou césarienne, ils n'ont aucun colostrum dans leur diète, et ils sont utilisés pour repeupler des fermes stérilisées, propres et vides. Une autre stratégie, "Isowean", consiste à sevrer les porcelets très tôt et de les élever dans trois différents sites isolés pour prévenir la transmission de pathogènes (Harris, 1990). Par contre, cette technique s'avère très dispendieuse.

D'autres méthodes pour prévenir l'établissement de l'infection par *M. hyopneumoniae* incluent l'ajout d'agents antimicrobiens dans la nourriture. Alexander et collaborateurs (1980) ont développé la technique de sevrage "MEW" ou "Medicated

Early Weaning” ou sevrage hâtif médicamenté. Durant la fin de la gestation et immédiatement après la mise-bas, les truies sont sujettes à une antibiothérapie intense. Les porcelets sont séparés des mères avant même la prise du colostrum et maintenus sous allaitement ou alimentation contrôlée, de même ils reçoivent de hautes concentrations d’antibiotiques afin de contrôler les infections bactériennes. Selon différentes études, les porcs de ces élevages peuvent demeurer exempts de *M. hyopneumoniae* ou de *B. bronchiseptica* jusqu’à leur mort (Ross, 1992). Une autre méthode consiste à séparer les porcelets des porcs plus âgés, et de donner de la nourriture contenant de la tiamuline ou de la chlortétracycline/tylosine/sulfadimidine aux truies (Ross, 1992).

L’antibiothérapie seule est une option pour contrôler la pneumonie enzootique porcine. Les antibiotiques peuvent être administrés continuellement ou périodiquement. Différents auteurs ont démontré qu’en donnant 200 ppm de tiamuline et 600 ppm de chlortétracycline à une troupeau chroniquement infecté par *M. hyopneumoniae*, les incidences de pneumonies étaient diminuées de beaucoup mais que l’organisme était toujours présent (LeGrand et Kobisch, 1996).

1.3.8 Vaccin

Toutes les méthodes de contrôle et de prévention contre *M. hyopneumoniae* décrites auparavant font face à plusieurs problèmes. Premièrement, elles sont extrêmement onéreuses, les coûts étant estimés à plusieurs centaines de millions de dollars par année aux États-Unis seulement. Aussi, malgré toutes les précautions prises, les élevages doivent constamment être surveillés car, les porcs n’étant pas immunisés contre *M. hyopneumoniae*, peuvent succomber à la maladie. De plus, de part la résistance du mycoplasme contre plusieurs agents antimicrobiens, l’usage des antibiotiques dans la nourriture d’animaux commerciaux est moins bien perçu, surtout depuis que leurs effets secondaires ont été documentés. Donc, pour prévenir et, éventuellement, éradiquer totalement *M. hyopneumoniae*, la vaccination semble être la meilleure alternative.

Les vaccins diffèrent dans leur préparation et démontrent des degrés d'efficacité variables chez les porcs. Certains vaccins consistant en des préparations de *M. hyopneumoniae* tués avec présence d'adjuvant ont démontré une protection partielle contre le développement de lésions pulmonaires dans des infections expérimentales; cependant, les porcs vaccinés ne semblent pas protégés contre une infection naturelle (Goodwin, 1973; Kristensen *et al*, 1981). Des vaccins faits d'extraits de membranes non purifiées de *M. hyopneumoniae* ont démontré une efficacité de protection variable et, dans certains cas, les lésions étaient plus sévères. Kobisch et collaborateurs (1987, 1990) ont aussi démontré que l'administration de préparations membranaires de *M. hyopneumoniae* aux truies gestantes a résulté en un transfert passif d'une immunité protectrice chez les porcelets.

Plus récemment, des vaccins faits de sous-unités de membrane de *M. hyopneumoniae* ont été décrits. Djordjevic et collaborateurs (1994) ont vacciné les porcs avec un mélange antigénique dénaturé préparé à partir d'extraits de membrane enrichis de protéines dont les poids moléculaires variaient entre 70 et 85 kDa. Avec ce type de préparation antigénique, les porcs vaccinés avaient une réduction significative de l'ampleur des lésions en comparaison aux porcelets contrôles non immunisés. Il n'y avait toutefois pas de corrélation entre la production d'anticorps de type IgA et IgG dans le sérum et les sécrétions respiratoires après la vaccination et le degré de protection contre la pneumonie enzootique (Thacker *et al*, 1998).

Dans une autre étude, une protéine de fusion de 15 kDa, consistant en la portion C-terminale (11 kDa) de la sous-unité R2 de la réductase ribonucléotidique de *M. hyopneumoniae* a été administrée oralement aux souris en utilisant comme véhicule *Salmonella typhimurium aroA* (Fagan *et al*, 1997). Cette immunisation a résulté en une production importante d'IgA dans les poumons, mais pas dans le sérum. Ce genre de vaccin peut stimuler une réponse locale dans les poumons. Cette étude suggère que d'autres vecteurs procaryotes, consistant en des bactéries vivantes atténuées, pourraient fonctionner pour présenter les antigènes spécifiques des mycoplasmes aux cellules du système immunitaire porcin.

Un rapport publié en 1998 a comparé l'efficacité de quatre bactérines commercialement disponibles (Thacker *et al*, 1998). Tous ces vaccins ont induit une protection contre une infection expérimentale, mais à des niveaux extrêmement variables selon les porcs et le type de vaccin. De plus, il y avait une variation importante dans l'apparition des anticorps locaux et des lymphocytes sensibilisés chez les animaux. La spécificité des anticorps envers les différentes protéines immunodominantes de *M. hyopneumoniae* était aussi très variable, certaines de ces protéines n'étant pas reconnues par les sérums des animaux vaccinés. Donc, ces variations doivent être prises en considération lors de l'établissement d'un programme de vaccination à l'échelle des troupeaux.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires en regard du développement et l'évaluation des vaccins contre la pneumonie enzootique porcine. Entre autre, des études portant sur le séquençage du génome de *M. hyopneumoniae*, sur la variabilité des protéines immunodominantes et l'identification des régions associées à l'induction d'une réponse immunoprotectrice sont des pré-requis indispensables au développement de vaccins sous-unitaires efficaces. *M. hyopneumoniae* favorise les infections secondaires, et les infections combinées très courantes avec des agents comme *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* et le virus du SRRP. Ces infections combinées causent beaucoup de dommages et de pertes économiques aux élevages de porcs à travers le monde. Un vaccin efficace contre *M. hyopneumoniae* pourrait non seulement permettre de prévenir et contrôler ce pathogène, mais permettrait de réduire les risques d'infections secondaires mortelles.

**PARTIE II:
MÉTHODOLOGIE, RÉSULTATS ET
DISCUSSION**

**CONTRIBUTION DES COLLABORATEURS DE L'ARTICLE "DETECTION
AND DIFFERENTIATION OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* AND
MYCOPLASMA HYORHINIS BY PCR AMPLIFICATION OF THE P36 AND P46
GENES"**

Pour cet article, j'ai fait la majorité du travail. Mon collègue Mourad Ouardani avait réalisé l'extraction de l'ADN des premiers échantillons cliniques avec le kit TriPure™ (Boehringer Mannheim), c'est-à-dire, à partir d'écouvillons trachéobronchiolaires et de poumons. De plus, il a aidé à déterminer les paramètres des PCR à partir d'ADN génomique et quelques spécimens cliniques. Mourad a aussi aidé à déterminer les séquences des amorces qui ont servi à amplifier le fragment interne de la protéine p46 (580 pb) et les amorces permettant l'amplification du gène p37 de *M. hyorhinis*.

Pour ce qui est de ma contribution, tout d'abord, j'ai fait la recherche de littérature nécessaire, puis j'ai écrit l'article. Toutes les figures et les tableaux présentés dans l'article proviennent de mes travaux. Les amorces servant à amplifier la p36 et la p46 en totalité étaient déjà synthétisées (948 et 1260 pb, respectivement), mais j'ai été surtout impliquée dans la détermination des amorces servant à amplifier les fragments internes du gène de la p36 (300 et 600 pb). J'ai mis au point les conditions du PCR simple et du PCR multiplex. J'ai cultivé les différentes espèces de mycoplasmes et extrait leur ADN génomique. J'ai aussi extrait l'ADN et/ou l'ARN des autres bactéries et virus utilisés dans cette recherche. J'ai vérifié la sensibilité et la spécificité des amorces oligonucléotidiques. Ensuite, j'ai fait la majorité de l'extraction de l'ADN des cas cliniques, fait le PCR et l'analyse des résultats. J'ai mis en culture *M. hyopneumoniae* à partir de ces spécimens et fait le PCR pour confirmer la présence du mycoplasme. De plus, j'ai réalisé tous les PCR visant à différencier *M. hyorhinis* et *M. hyopneumoniae* dans les lésions pulmonaires et dans les cultures de *M. hyopneumoniae*.

Detection and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes

J. CARON, M. OUARDANI, and S. DEA *

Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3

***Corresponding author: Serge Dea**

Mailing address: Institut Armand-Frappier, Centre de microbiologie et biotechnologie, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7N 4Z3.

Fax: (514)686-5627

E-mail: **Serge_Dea@IAF.UQUEBEC.CA**

Key Words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, swine enzootic pneumonia, polymerase chain reaction, immunodominant proteins, detection, clinical specimens

ABSTRACT

The genome of *M. hyopneumoniae* encodes several immunodominant proteins, amongst which a cytosolic protein (p36), three membranous proteins (p46, p65 and p74) and an adhesin (p97). Cross-reactions with *M. flocculare* and *M. hyorhinis* reduce the specificity of conventional serological detection methods. However, certain antigenic determinants of the p36 and p46 proteins have been shown to be specific for *M. hyopneumoniae*. In the present study, pairs of oligonucleotide primers were designed to permit PCR amplification of the entire, and internal fragments, of the p36 and p46 genes. Specific amplicons could be obtained with as low as 0,5 to 50 pg of extracted chromosomal DNA. No amplification product was obtained when testing the p36 and p46 primer pairs with genomic DNA or RNA from other mycoplasma species, bacteria and viruses commonly associated with respiratory diseases in pigs. Using the single p36-PCR method, a positive reaction was demonstrated in 100 % (30/30) of lungs from pigs with typical lesions associated with a *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, and no false-positive were detected when testing 62 apparently normal lungs. On the other hand, using the single p46-PCR method, a sensitivity of 86,6 % (26/30) and a specificity of 96,7% (60/62) were obtained in comparison with necropsy findings. A mixed infection with *Mycoplasma hyorhinis* was diagnosed in 13,3 % (4/30) of the cases by using species-specific primers for the heterologous p37 gene. When tested on tracheobronchial swabs, the sensitivity of the single p36-PCR method for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* was 100 % (20 positive samples) with a specificity of 93,3 % (14/15 negative samples) in comparison with necropsy findings. Both expected amplicons were obtained with 86,6 % (26/30) positive lungs when p36 and p46 primers were used simultaneously to further increase the specificity of the PCR assay.

INTRODUCTION

Mycoplasma hyopneumoniae is the primary agent of enzootic pig pneumonia (Goodwin *et al*, 1965; Maré and Switzer, 1965), a chronic respiratory disease found in pig farms worldwide that is characterized by high morbidity and low mortality rates. It causes considerable economic losses through retarded growth, poor food conversion, and increased susceptibility of pigs to infection by other organisms (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996).

The diagnosis of *M. hyopneumoniae* is usually done by cultivation of the organism or by immunofluorescence tests performed on frozen thin lung sections with polyclonal antibodies (Amanfu *et al*, 1984; Ross, 1992; Feenstra *et al*, 1994; Kobisch and Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). However, due to the fastidious nature of *M. hyopneumoniae*, its culture and serological identification may take up to one month. Also, other mycoplasmas, especially *M. hyorhinis*, easily overgrow and contaminate *M. hyopneumoniae* cultures (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996). Current serological detection methods are further hampered by cross-reactions which have been reported between *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* (Freeman *et al*, 1984; Armstrong *et al*, 1987).

With the advances made in molecular biology during the last few years, more is known about *M. hyopneumoniae* genes. Hence, other methods can be used as diagnostic tools for this organism. One such alternative is the PCR, which has been proven to be a highly specific, sensitive and rapid technique (Bej *et al*, 1991). Several investigators have demonstrated the efficacy of the PCR to detect 16S rRNA, as well as conserved regions of genomic DNA, of *M. hyopneumoniae* in different clinical specimens (Harasawa *et al*, 1991; Artiushin *et al*, 1993; Stemke *et al*, 1994; Mattson *et al*, 1995; Artiushin and Minion, 1996; Blanchard *et al*, 1996; Stemke, 1997; Stärk *et al*, 1998; Calsimiglia *et al*, 1999), but none of the previous described methods targeted genes encoding immunodominant proteins. Studies on the antigenic properties of reference and field isolates of *M. hyopneumoniae* revealed the presence of several immunodominant proteins, amongst which a cytosolic protein with lactate dehydrogenase activity (p36)

(Strasser *et al*, 1991; Haldimann *et al*, 1993; Frey *et al*, 1994), three membranous proteins (p46, p65 and p74) (Mori *et al*, 1988; Brooks and Faulds, 1989; Kim *et al*, 1990) and an adhesin (p97) (Zhang *et al*, 1995). Comparative studies with other mycoplasmas commonly found in pigs demonstrated that the p36 and p46 proteins carry species-specific antigenic determinants for *M. hyopneumoniae* (Mori *et al*, 1987; Stipkovits *et al*, 1991).

In the present study, different sets of primers were designed to permit specific amplification of variable length fragments of both p36 and p46 genes of *M. hyopneumoniae*. Furthermore, to further increase the specificity for the detection of *M. hyopneumoniae*, a multiplex PCR approach was designed to simultaneously amplify different portions of the p36 and p46 genes. Both single PCR methods and the multiplex PCR assay were tested on reference mycoplasma strains and clinical specimens. Differential diagnosis with *M. hyorhinis* infection was achieved by using specific primers to the homologous p37 gene.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and growth conditions

The ATCC 25934 strain of *M. hyopneumoniae*, obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, MD, was used as the reference strain in this study. Other mycoplasma strains, walled bacteria and viruses used in this work are listed in Table 5. The different mycoplasmas and *Acholeplasma laidlawii* were grown in modified Friis medium (Friis, 1973), containing 20% porcine serum (GIBCO BRL) and fresh yeast extract (GIBCO BRL). The cells were harvested by centrifugation at 12000g for 30 minutes at 4°C, washed three times and suspended in sterile 1x PBS (0,1 M phosphate buffered saline, pH 7,4). Gram-positive and gram-negative bacteria commonly colonizing the porcine respiratory tract were kindly provided to us by S. Messier, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, Qc, Canada. The viruses used were the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), the Purdue strain of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV, ATCC VR-763), the IAF-Q890 strain of porcine encephalomyocarditis virus (EMCV), and the A/Sw/Quebec/5393/91 (swQC-91) strain of swine influenza virus. The origins, cultivation and purification procedures for these reference viruses have been described elsewhere (Dea *et al*, 1991; Dea and Garzon, 1991; Dea *et al*, 1992; Mardassi *et al*, 1994).

DNA extraction

Genomic DNA from the mycoplasmas was obtained after an incubation of 1 hour at 37°C with 50 µg/ml final RNase (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec) and 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), followed by another incubation of 1 hour at 37°C in the presence of 50 µg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim) and 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario). The extraction solutions were prepared in water. DNA purification was completed by a phenol and chloroform extraction and precipitation with 100% ethanol, according to Sambrook *et al* (1989).

The bacterial DNAs were obtained by both the method described above and by disrupting colonies in 50 µl 1x sterile PBS and boiling for 10 minutes (crude DNA

preparations). Following an incubation period of 10 minutes at -20°C, the samples were centrifuged at 12000g for 5 minutes.

The viruses used in this work were already purified and concentrated by isopycnic ultracentrifugation on sucrose or cesium chloride density gradients (Dea *et al*, 1991; Dea and Garzon, 1991; Dea *et al*, 1992; Mardassi *et al*, 1994). Genomic DNA or RNA was extracted using the Trizol™ kit according to the manufacturer's instructions (GIBCO BRL). Briefly, nucleic acids were extracted from 10 to 100 µl aliquots of the purified viral stocks by the guanidinium isothiocyanate-acid phenol reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987), precipitated with isopropanol and suspended in 20 µl of DEPC-treated water containing 2 µl of Rnase inhibitor (RNA guard; Pharmacia LKB, Baie d'Urfé, Pointe-Claire, Québec, Canada).

Clinical specimens

Lungs, bronchoalveolar lavages and nasal swabs of 12 to 20-week-old pigs suffering from respiratory problems, accompanied by progressive weight losses, were obtained from farrow-to-finish operations in Southern Quebec and from Animal Pathology Laboratories of the Ministry of Agriculture in Quebec (MAPAQ), Qc, Canada. Tracheobronchial swabs were taken from 20-week-old pigs at slaughter houses and kindly provided to us by André Broes, Centre pour le développement du porc du Québec (CDPQ), Qc, Canada.

Genomic DNA from clinical samples was extracted using the TriPure™ Isolation Reagent according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim). Briefly, 0,1 g of fresh or frozen lung specimens were homogenized and incubated in the guanidine thiocyanate-phenol solution at room temperature for 5 minutes. Chloroform (Fisher Scientific) was added to separate the mixture in three distinct phases: the lower RNA phase, the organic interphase and the upper aqueous phase containing the DNA. The upper phase was removed and the DNA was precipitated with 100 % ethanol. Following three washes with 0,1 M sodium citrate in 10 % ethanol, the DNA pellet was suspended in a 600 µl volume of 8 mM NaOH (Fisher Scientific), and the pH of the

sample was adjusted to 8,4 using 0,1 M HEPES (GIBCO BRL) in order to optimize the DNA for the PCR amplification.

Primers

The oligonucleotide primers were selected from previously published sequences for the specific immunodominant genes of *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934, and the p37 gene of *M. hyorhinis* strain ATCC 17981. The GenBank accession numbers were X67286 (Haldimann et al, 1993), D16682 (Futo et al, 1995), U50209 (Chou and Shivan, 1996), U50901 (Hsu et al, 1997) for the p36, p46, p65 and p97 genes of *M. hyopneumoniae*, and X14140 (Dudler et al, 1988) for the p37 gene of *M. hyorhinis*. The sequence analysis for the primer selection was performed using the McVector 3.5 (International Biothechnologies) and Gene Works 2.2 (IntelliGeneticsInc., Mountain View, California.) programs. The oligonucleotide primers were synthesized in an automated Gene Assembler DNA synthesizer (Pharmacia LKB). Primer designation, nucleotide sequences and sizes of the amplified products are depicted in Table 4.

Single PCR assays

The PCR was performed on mycoplasmas, walled bacteria and viruses using 2,5 µl of genomic DNA or RNA. The amplification was performed in a 100 µl reaction mixture containing each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0,2 mM, 50 µmol of each forward and reverse primer, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ (GIBCO BRL), and 1,0 U Taq DNA polymerase (GIBCO BRL). The tubes were subjected to 35 amplification cycles of denaturation at 94°C for 60 sec, primer annealing at 50°C for 60 sec and elongation at 72°C for 90 sec. There was a final extension step at 72°C for 10 minutes. The PCR amplifications were performed in a DNA Engine thermocycler (MJ Research , model PTC-100 with hot bonnet). Aliquots of 10 µl of the amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels (Boehringer Mannheim) in TAE buffer (0,04M Tris-acetate [pH8,5], 0,002M EDTA) in the presence of ethidium bromide at 100 V for 1 hour and viewed under UV illumination.

PCR on clinical specimens

The reaction mixtures and conditions were performed as described above using 5 μ l DNA. Products were electrophoresed on agarose gels and viewed under UV illumination.

Multiplex PCR assay

The PCR conditions were the same as for the single p36- and p46-PCR amplification methods. The mixtures required 5 μ l DNA, 50 μ mol of each p46 primers and 85 μ mol of the p36 primers. Products were electrophoresed and viewed under UV illumination.

RESULTS

Electrophoretic profiles of PCR amplicons obtained for gene encoding immunodominant proteins of *M. hyopneumoniae*

Based on the reported sequences of the four immunodominant genes of *M. hyopneumoniae* (strain ATCC 25934), primers were designed to permit amplification of the entire open reading frames of p36 (948-bp), p46 (1260-bp) and p65 (1300-bp), and a 1700-bp fragment of the p97 gene from extracted genomic DNA (Fig. 1). Also, different primer pairs were designed to amplify selected fragments of the p36 and p46 genes. The primer pairs INT36F- IR(1) p36, INT36F- IR(2) p36 and FSp36-RSp36 yielded DNA fragments of 300, 600 and 948-bp of the p36 gene, respectively (Fig. 2a). The primer pairs p46IntFS-p46IntRS and FISp46-RISp46 were used to amplify fragments of 580 and 1260-bp of the p46 gene (Fig. 2b).

Specificity of the single PCR assays

Following the establishment of the PCR parameters, the FSp36-RSp36 and p46IntFS-p46IntRS oligonucleotide primer pairs were selected to amplify DNA fragments from the p36 and p46 genes from two reference strains of *M. hyopneumoniae*, ATCC 25934 and ATCC 25095. Specific PCR amplification products of 948 and 580-bp, from the p36 and p46 genes respectively, were obtained. No reactivity was obtained when the PCR was performed with the DNA of other mycoplasma and acholeplasma species that infect pigs (Fig. 3). Similarly, no amplified product was observed from genomic DNA of viruses and crude or purified genomic DNA preparations of walled bacteria known to

colonize the porcine respiratory tract, except for weak reactions with *B. bronchiseptica* and *P. multocida* (Table 5). The weak signals observed with these two gram negative bacteria were eliminated by increasing the annealing temperature to 55°C.

Sensitivity of the single PCR assays

To assess the sensitivity of the single p36- and single p46-PCR assays, serial dilutions of a preparation of extracted genomic DNA (initial concentration of 200 ng/μl) from *M. hyopneumoniae* (strain ATCC 25934) were made and tested for enzymatic amplification with selected p36 and p46 primer pairs. A total of 50 pg of DNA was detected when the entire ORF (948-bp) of the p36 gene was amplified (Fig. 4), whereas 0,5 pg of p36 DNA was detected when the 300-bp fragment was amplified. A lower sensitivity was observed for the single p46-PCR since expected DNA amplicons (580 bp, 1260 bp) could not be obtained with dilutions corresponding to less than 0,5 ng of genomic DNA (Fig. 5). Based on the fact that the genome of *M. hyopneumoniae* is approximately 1140 kbp, which is equivalent to 1,2 fg of DNA (Calsamiglia *et al*, 1999), our single p36-PCR detected $4,17 \times 10^2$ to $4,17 \times 10^4$ organisms for the primers amplifying the 300 and 948-bp fragment, respectively, whereas the single p46-PCR could detect $4,17 \times 10^5$ organisms.

Detection of *M. hyopneumoniae* in tracheobronchiolar swabs of pigs with clinical signs of chronic pneumonia.

The efficacy of the single p36-PCR method was first evaluated on 20 tracheobronchiolar swabs collected from pigs at the slaughter house with presence (15) or absence (5) of lung lesions compatible with a diagnosis of enzootic pneumonia (Table 6). The DNA of these specimens was extracted with the TriPure™ isolation reagent. When the PCR was performed with the primer pair INT36F- IR(1) p36 that amplify the 300-bp fragment of the p36 gene, a positive reaction was obtained with only 33,3 % (6/15) of the cases with lung lesions. However, when the primer pair FSp36-RSp3636 was used, 14 out of 15 (93,3 %) of the specimens with typical gross lesions yielded the expected 948 bp amplicon. No positive reaction was obtained using both primer pairs with DNA extracted from the tracheobronchiolar swabs (0/5) corresponding to the clinically normal lungs.

Detection of *M. hyopneumoniae* from lung homogenates

To study the efficacy of the PCR method, a total of 92 lung specimens, obtained from different pig farms in Southern Quebec, were processed and tested. The data obtained showed that within a period of two days, all of the specimens showing typical lesions of enzootic pneumonia (30/30) were confirmed positive for a *M. hyopneumoniae* infection by PCR when using the FSp36-RSp36 primers (yielding a 948-bp fragment) (Table 7). Respectively, 66,6 % and 86,6 % of these cases were also confirmed positive for this agent when using primer pairs that permit enzymatic amplification of the 300-bp fragment of the p36 (20/30) and the 580-bp fragment of the p46 (26/30) genes. Absence of reactivity was noticed when the *M. hyopneumoniae* FSp36-RSp36 primers were used to amplify DNA from apparently healthy lungs (0/62); therefore, a lack of false-positive results was demonstrated. However, a weak positive reaction (presence of amplified bands with an approximate size of 580 bp) was obtained with 2 of the 62 healthy lungs (specificity of 96,7 %), when using the p46 specific primer pairs, and in only one case (1/62), a positive signal was obtained using the p37 primer pair specific for *M. hyorhinis*.

Differentiation of *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* by PCR

To differentiate lesions caused by *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis*, and to detect a mixed infection by the two agents, a primer set was designed and synthesized to amplify a 346-bp fragment of the p37 gene (ORF 5238-bp) of *M. hyorhinis*. The Sp37-Asp37 pair was shown to be specific to *M. hyorhinis*; no amplicon was obtained from *M. hyopneumoniae* genomic DNA (Fig. 6). Table 4 shows that only 4 out of 30 (13,3 %) lungs with lesions of enzootic pneumonia were positive for *M. hyorhinis* by PCR. On the other hand, only 1 case (1,6 %) of *M. hyorhinis* was detected from the apparently normal lungs tested.

Detection of *M. hyopneumoniae* by multiplex PCR

In order to increase the specificity of our PCR assay, a multiplex PCR approach was developed; it combines the simultaneous amplification of selected p36 and p46 fragments using primer pairs FSp36-RSp36 and P46IntFS-P46IntRS. From extracted genomic DNA of the ATCC 25934 strain of *M. hyopneumoniae*, the multiplex PCR amplified two fragments of 948 and 580-bp from the p36 and p46 genes, respectively (Fig. 7, lanes 1 to

3). The multiplex assay also clearly amplified these two genomic fragments from all lung homogenates (26/26) from sick pigs previously found to be positive for the p46 580-bp product in the single p46-PCR (Fig. 7, lanes 7 to 9). The multiplex PCR didn't amplify DNA from 20 normal lungs tested (Fig 7, lanes 10 to 12) or *M. hyorhinis* genomic DNA (Fig. 7, lanes 4 to 6).

Cultivation of *M. hyopneumoniae* from lung homogenates

To compare the sensitivity of the simple and multiplex PCR assays with cultivation, fifteen lungs, positive for *M. hyopneumoniae* by the single p36-PCR, were processed for cultivation in modified Friis medium. Sub-passages were done every three to four days. After 4 to 5 consecutive passages, thirteen out of the fifteen cultures showed evidence of positive growth as suggested by changes of turbidity and acidification of the medium. Mycoplasma cells were pelleted and genomic DNA was extracted and processed for confirmation by the single-PCR method for the presence of *M. hyopneumoniae* and/or *M. hyorhinis*. Ten cultures (66,6 %) were found to contain *M. hyopneumoniae* only, and in two cultures (13,3 %) a mixed infection with *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* was diagnosed. The remaining culture (6,6 %) was contaminated by *M. hyorhinis* only, no *M. hyopneumoniae* genomic DNA was amplified by PCR.

DISCUSSION

With the recent advances made in molecular biology, new techniques are becoming readily available for the detection of fastidious microorganisms, such as *Mycoplasma hyopneumoniae*. In this research, we used the PCR to detect *M. hyopneumoniae* in lung homogenates and tracheobronchiolar lavages of clinically-infected pigs.

Efforts to control the infection caused by *M. hyopneumoniae* have been hampered, due to the inefficacy of the vaccines currently on the market and to the lack of adequate treatment. Moreover, the major source of infection among pig herds is the healthy carriers. The costs to have separate rooms for pigs of various ages, to have the farms sterilized or to have the piglets by Caesarian-section are considerable (Ross, 1992; Kobisch and Ross, 1996). Furthermore, the usual detection method of cultivating and identifying the mycoplasma is extremely time consuming, taking up to one and a half month in some cases. The other serological methods are not always appropriate, due to the cross-reactions between *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* and *M. flocculare* (Freeman *et al*, 1984; Armstrong *et al*, 1987; Feenstra *et al*, 1994). Hence, PCR has become a very interesting tool for the diagnosis of *M. hyopneumoniae*.

In this study, we used the p36 and p46 genes of *M. hyopneumoniae* as our PCR templates. From what is reported in the literature, the p36 protein is immunodominant and highly conserved amongst different strains of *M. hyopneumoniae*; also, it is very specific (Stipkovits *et al*, 1991; Strasser *et al*, 1991; Haldimann *et al*, 1993; Frey *et al*, 1994). The p46 protein is also elicits an early immune response in swine and is specific to *M. hyopneumoniae* (Mori *et al*, 1987; Mori *et al*, 1988). When the PCR was tested against the various mycoplasmas, walled bacteria and viruses found in the porcine respiratory tract, expected amplified products could be obtained only with DNA extracted from the *M. hyopneumoniae* strains tested; thus, the FSp36-RSp36 and p46 IntFS-p46 IntRS primer pairs for the p36 and p46 genes, respectively, did not allow detection of genomic relationships or cross-reactions between the various mycoplasma species tested. The single p36-PCR method was also found to be very sensitive, detecting as low as 0,5 to 50 pg of mycoplasma genomic DNA. The discrepancy between the sensitivity of the

p36 primers when amplifying extracted genomic DNA versus DNA from clinical specimens was probably due to the high GC content at the 5' end of the anti-sense RSp36 primer (948 bp) as opposed to the lower GC content of anti-sense primer IR(1)p36 (300 bp). The RSp36 primer has a higher melting temperature and adheres more strongly to the template DNA; hence, it is more sensitive when the number of organisms present in the samples is lower, as in lung homogenates and tracheobronchial swabs. The p46 primer pairs were slightly less sensitive, no amplification reaction being detected with less than 0,5 ng of genomic DNA, a threshold which is comparable to that previously described by others (Harasawa *et al*, 1991; Artiushin *et al*, 1993; Mattson *et al*, 1995; Blanchard *et al*, 1996; Baumeister *et al*, 1998).

When used on clinical specimens, the extraction method yielded a large amount of pure DNA in less than a day; thus, along with the PCR reaction, the results could be obtained within a period of two days only. The data obtained by PCR, from the lung homogenates and tracheobronchiolar swabs, agreed with serological tests performed in parallel (data not shown). With lung homogenates, positive results always correlated with the presence of pneumonic lesions affecting mainly the apical and cardiac lobes; the positive slaughtered pigs originated from farms where several pigs manifested clinical signs of typical *M. hyopneumoniae* infection (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996). As well, fifteen out of the thirty cases, which were found to be *M. hyopneumoniae* positive by PCR, were tested in culture. As expected, the cultivation process took almost two months for some of the field isolates, but in general a three-week period was required before obtaining confirmation of the isolation in culture. Only eight out of twelve positive cultures grew well, and the presence of *M. hyopneumoniae* was either confirmed by PCR or serologically by western blotting using polyclonal rabbit hyperimmune serum (data not shown). Two of these eight cultures were contaminated by *M. hyorhinis*, and one culture was found to contain only *M. hyorhinis*. None of the three contaminated samples were positive for *M. hyorhinis* by PCR when testing the original lung samples. *M. hyorhinis* is less fastidious than *M. hyopneumoniae*, and can be easily cultivated *in vitro*; consequently the single p37-PCR method for *M. hyorhinis* was apparently less sensitive than the cultivation method, which appeared not to be the case for *M. hyopneumoniae*.

In the literature, simultaneous amplification of mycoplasmal (Wang *et al*, 1997; Choppa *et al*, 1998), bacterial (Lo *et al*, 1998) and viral (Ouardani *et al*, 1999) genes have been described using multiplex PCR assays. These multiplex PCR have been used to detect microorganisms in clinical specimens and to increase the specificity of the tests, either by eliminating cross-reactions between strains of the same pathogen or to differentiate between different species. In this study, a multiplex PCR approach was designed as to permit the simultaneous amplification of desired fragments of the p36 and p46 genes of *M. hyopneumoniae*. From the 86,6 % of the cases which were originally tested positive for *M. hyopneumoniae* by the single p46-PCR, 100 % were found to be positive for both genes by the multiplex PCR assay, often with more intense signals. No false-positive results were ever obtained. This assay, albeit being less sensitive than the single p36-PCR method, will be very useful when testing clinical specimens that are highly contaminated with other mycoplasmas, especially *M. hyorhinis*. The multiplex PCR method should eliminate risks of obtaining false-positive amplified reactions due to cross-reactions with other mycoplasma or bacterial species; since both the p36 and p46 genes have been shown to be highly specific to *M. hyopneumoniae*, the simultaneous amplification of both expected amplicons will undoubtedly confirm a specific result for this microorganism.

PCR has been used since the early 1990s to detect *M. hyopneumoniae* (Harasawa *et al*, 1991), but the assay wasn't evaluated under field conditions. Verdin *et al* (1996) designed a nested PCR approach detecting *M. hyopneumoniae* from tracheobronchiolar lavages, which was found to be more sensitive than serological and immunofluorescent assays upon the early stages of infection (42 %). The sensitivity of their PCR in fattening animals compared to the results obtained in this study (93,9 to 94,6 %). Baumeister *et al* (1998) developed a PCR detecting *M. hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs). From pigs with pneumonic lung lesions, they obtained only 30 % and 55 % positive results with the DNA extracted from bronchial washings and BALFs, respectively. The single p36-PCR assay described in the present study appears to be more sensitive, since it permitted the detection of 93,3 % of the positive cases with tracheobronchial swabs and 100 % of the positive lung specimens. On the other hand, the single p46 and multiplex p36-p46 PCR approaches yielded 86,6 % sensitivity.

The detection of *M. hyopneumoniae* from live pigs would provide a useful tool for the screening of healthy carriers and preventing the spread of the disease. Two studies have reported the detection of this microorganism from nasal swabs (Mattson *et al*, 1995; Calsimiglia *et al*, 1999). In both cases, primers were selected as to permit the amplification of species-specific 16s rRNA gene fragments. Mattsson *et al* (1995) used only a limited number of pigs in their experiment and detected the microorganism in only one out of five pigs three weeks post-infection. The second study (Calsimiglia *et al*, 1999) demonstrated the use of a nested PCR assay to detect the presence of *M. hyopneumoniae* in the nasal cavity. A detection rate of 61,1 % was obtained, but no time period post-infection was mentioned as to when the animals were shedding the mycoplasma in their nasal mucosa. In a preliminary study to evaluate the efficacy of the single p36-PCR method to detect the agent in live pigs, approximately 100 nasal swabs were received from various pig farms in Quebec, either from healthy or infected herds, and all the samples were negative by PCR (data not shown). From an experimental infection, the presence of *M. hyopneumoniae* could be detected in nasal swabs two weeks post-infection only (data not shown). These results suggest that *M. hyopneumoniae* is present in small quantities in the nasal cavity and only for a limited amount of time. More research is needed in this area to confirm these findings. Since the technique was found very sensitive for detecting the p36 gene in tracheobronchial swabs taken at slaughter houses, it should be possible to use such specimens for following the infection in live animals.

In conclusion, both simple PCR and multiplex PCR assays described in this paper were found to be highly effective tools for detecting the presence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in different clinical specimens, including samples from live animals (tracheobronchiolar swabs). With these techniques, the infection can be detected at an early stage and suitable measures can be taken to limit the damages done to pig farms.

TABLE 4. Oligonucleotide primers used for the single and multiplex PCR assays

Primer	Sense	Sequence	Product size(bp)
INT 36F	+	5'CCGATTAGTGTCTCCCGTTATG3'	300
IR (1) p36	-	5'AGATGAATCACCATGTTCACCCAT3'	
INT 36F	+	5'CCGATTAGTGTCTCCCGTTATG3'	600
IR (2) p36	-	5'GGGCCGATGAAACCTATTAATAAGCT3'	
FSp36	+	5'GGGCCGATGAAACCTATTAATAAGCT3'	948
RSp36	-	5'GCCGCGAAATTAATAATTTTAAATTGCATCCTG3'	
P46 IntFS	+	5'GCAGCAGGTTGTGGACAGAC3'	580
P46 IntRS	-	5'CAGCATTTTCGCCTTCAGGAG3'	
FISp46	+	5'GGGCCGATGAAAAAATGCTTAGAAAA3'	1260
RISp46	-	5'GGGCCGTTAGGCATCAGGATTATCAACATT3'	
FSLp65	+	5'GGCCGATGGCAAAGAAATCATTTTA3'	1300
RSLp65	-	5'GGCCGAATTGAAAACTAACTTCAAT3'	
FSA p97	+	5'GGGCCGATAAAAAAATTTCCAACTTTTTTGTGCA3'	1700
RSA p97	-	5'GGGCCGCTTTAAAAAGAGCTTCAACTTCAA3'	
Sp37	+	5'GTAGTCAAGCAAGAGGATGT3'	346
Asp37	-	5'GCTGGAGTTATTATACCAGGA3'	

TABLE 5. Microorganisms used for testing the specificity of *M. hyopneumoniae* primers

Species	Strain	PCR amplification ^a
<i>M. hyopneumoniae</i>	ATCC 25934	+
<i>M. hyopneumoniae</i>	ATCC 25095	+
<i>M. hyosynoviae</i>	Field	-
<i>M. flocculare</i>	ATCC 27399	-
<i>M. arginini</i>	ATCC 23838	-
<i>M. hyorhinis</i>	ATCC 17981	-
<i>A. laidlawii</i>	ATCC 23206	-
<i>E. coli</i>	Field	-
<i>H. parasuis</i>	Field	-
<i>S. suis</i>	Field	-
<i>A. pleuro sero 1 & 5</i>	Field	-
<i>B. bronchiseptica</i>	Field	W ^b
<i>P. multocida</i>	Field	W ^b
PRRSV	IAF-KLOP	-
TGEV	Purdue	-
EMCV	IAF-Q890	-
Influenza H1N1	A/SW/Qc91	-

^a +, amplification; -, no amplification using the five sets of primers directed against either the p36 or p46 genes (see Materials and Methods section)

^b Weak reaction eliminated at higher annealing temperature (55°C)

TABLE 6. Detection of the p36 gene of *M. hyopneumoniae* from porcine tracheobronchial swabs

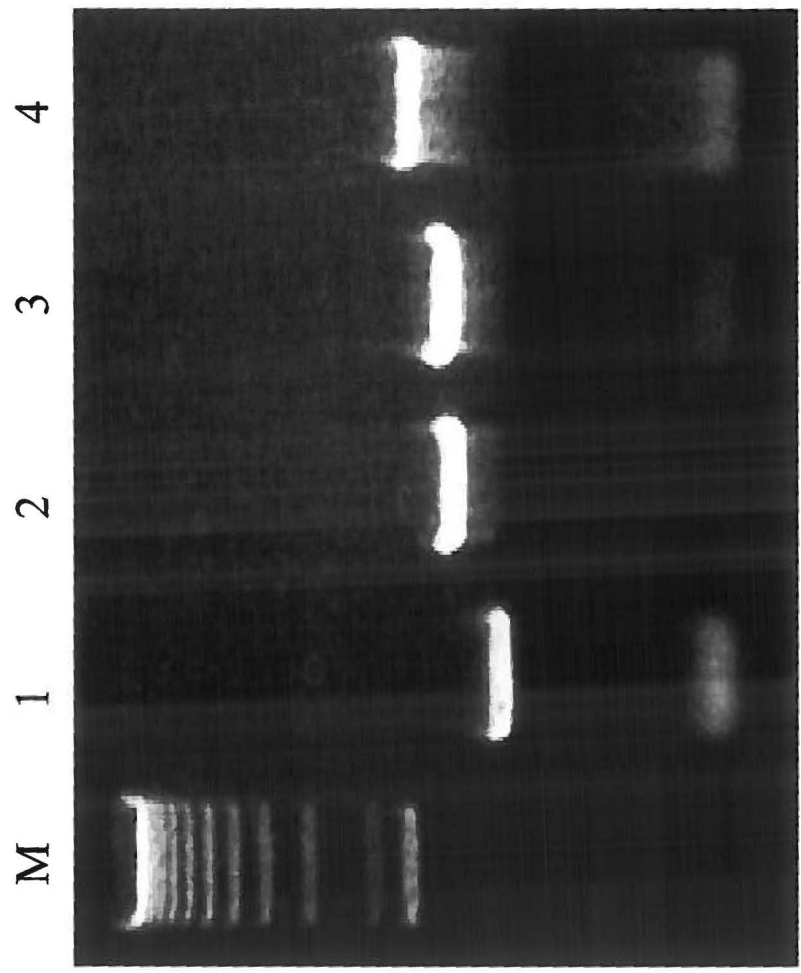
Number of swabs	Specimens with lesions	948 bp fragment of p36 protein	300 bp fragment of p36 protein
15	15	14	6
5	0	0	0

TABLE 7. Detection of *M. hyopneumoniae* variable length fragments of the p36 and p46 genes and *M. hyorhinis* p37 gene from lungs specimens of healthy and clinically-infected pigs

Clinical specimen	Lesion	Direct PCR			PCR after culture	
		948 bp (p36)	580 bp (p46)	346 bp (p37)	948 bp (p36)	346 bp (p37)
62	-	0	2	1	ND ^a	ND ^a
30	+	30	26	4	12	2

^a Not determined

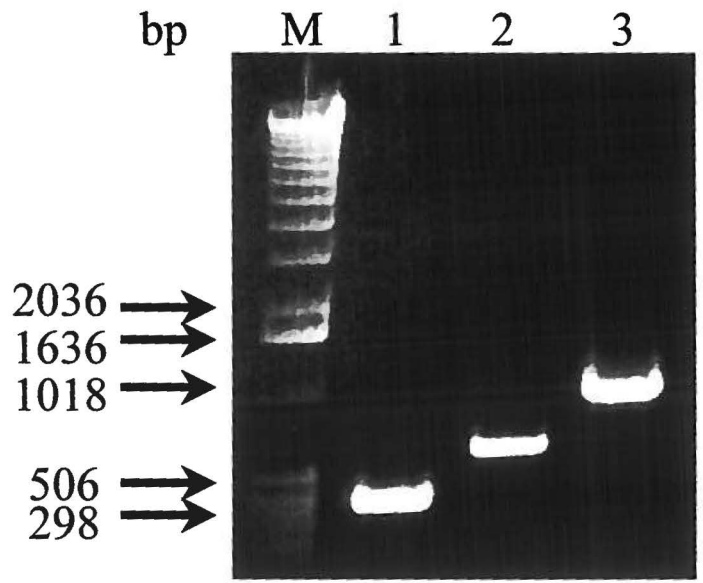
FIGURE 1: PCR amplification of the ORFs encoding the four immunodominant genes of *M. hyopneumoniae*. Lane 1, p36 gene (948 bp); lane 2, p46 gene (1260 bp); lane 3, p65 gene (1300 bp); lane 4, p97 gene (1700 bp). The molecular sizes of three fragments of the 1-kb ladder (lane M) are indicated in the left margin.



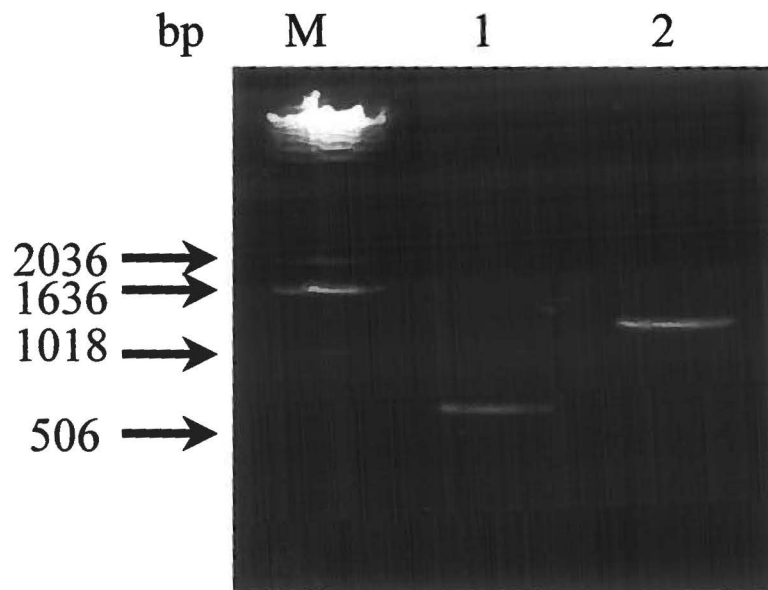
bp

2036
1636
1018

FIGURE 2: Electrophoretic profiles of DNA fragments amplified from the p36 and p46 genes. (A) Different amplified fragments of the p36 gene. Lane 1, 300-bp; lane 2, 600-bp; lane 3, 948-bp. (B) Different amplified fragments of the p46 gene. Lane 1, 580-bp; lane 2, 1260-bp. Lane M, 1-kb DNA ladder.



A



B

FIGURE 3: Specificity of selected p36 and p46 primer pairs for single PCR amplification of *M. hyopneumoniae*. The primer pair FSp36-RSp36 (lanes 1 to 6) was used to amplify the entire p36 gene (948 bp), and the primer pair p46 IntFS-p46 IntRS was used to amplify an internal 580 bp fragment of the p46 protein. Lack of reactivity was found against *M. arginini* (lanes 1 and 7), *M. flocculare* (lanes 2 and 8), *M. hyorhinae* (lanes 3 and 9), *A. laidlawii* (lanes 4 and 10), *M. hyosynoviae* (lanes 5 and 11), *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934 (lanes 6 and 12). Lanes M, 1-kb plus DNA ladder.

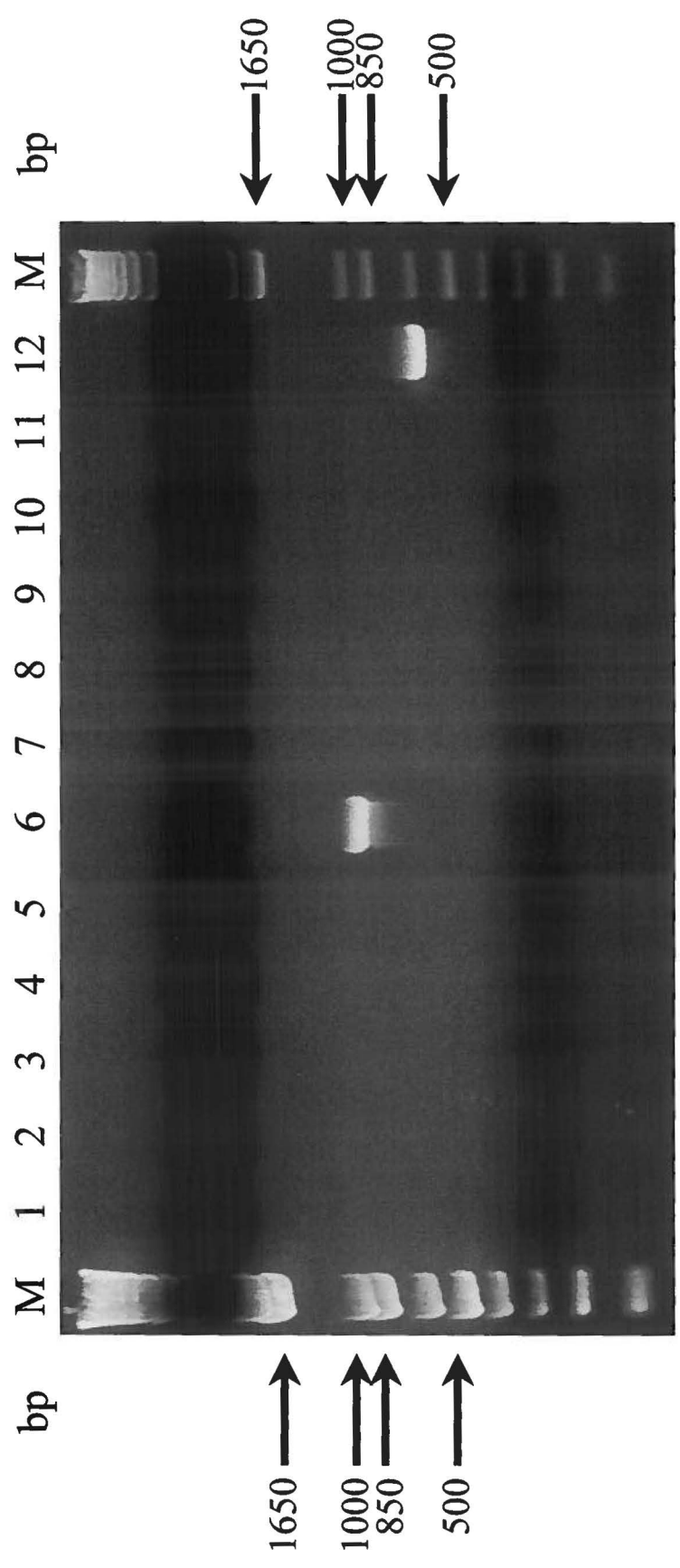


FIGURE 4: Sensitivity of the single p36 PCR procedure in detecting 10-fold dilutions of extracted genomic *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934 DNA at an initial concentration of 200 ng/ μ l using two sets of primer pairs. Lanes 1 to 9, primer pair FSp36-RSp36; lanes 10 to 18, primer pair INT 36F-IR (1)p36. Lanes 1 and 10, 10^{-1} ; lanes 2 and 11, 10^{-2} ; lanes 3 and 12, 10^{-3} ; lanes 4 and 13, 10^{-4} ; lanes 5 and 14, 10^{-5} ; lanes 6 and 15, 10^{-6} ; lanes 7 and 16, 10^{-7} ; lanes 8 and 17, non diluted DNA; lanes 9 and 18, negative control. Lane M, 1-kb plus DNA ladder.

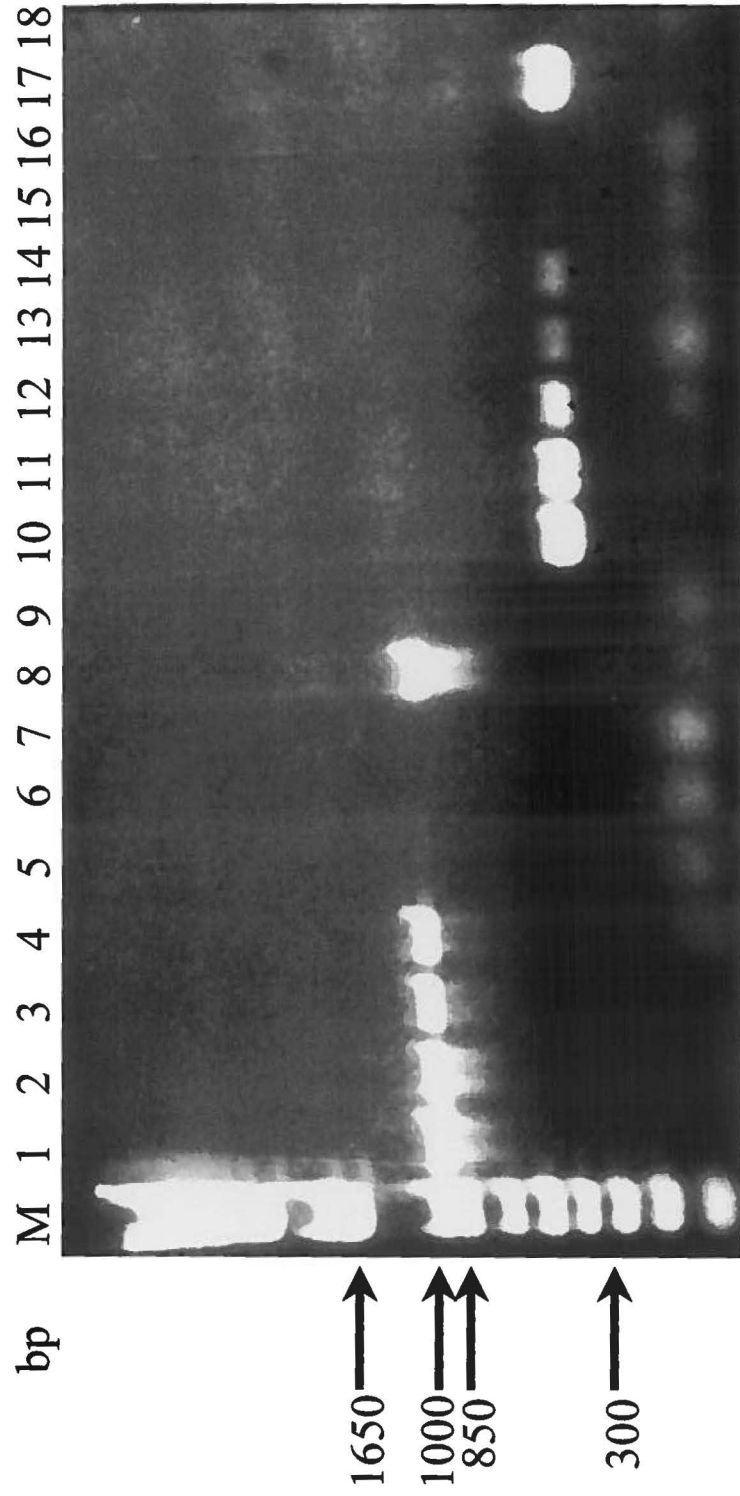
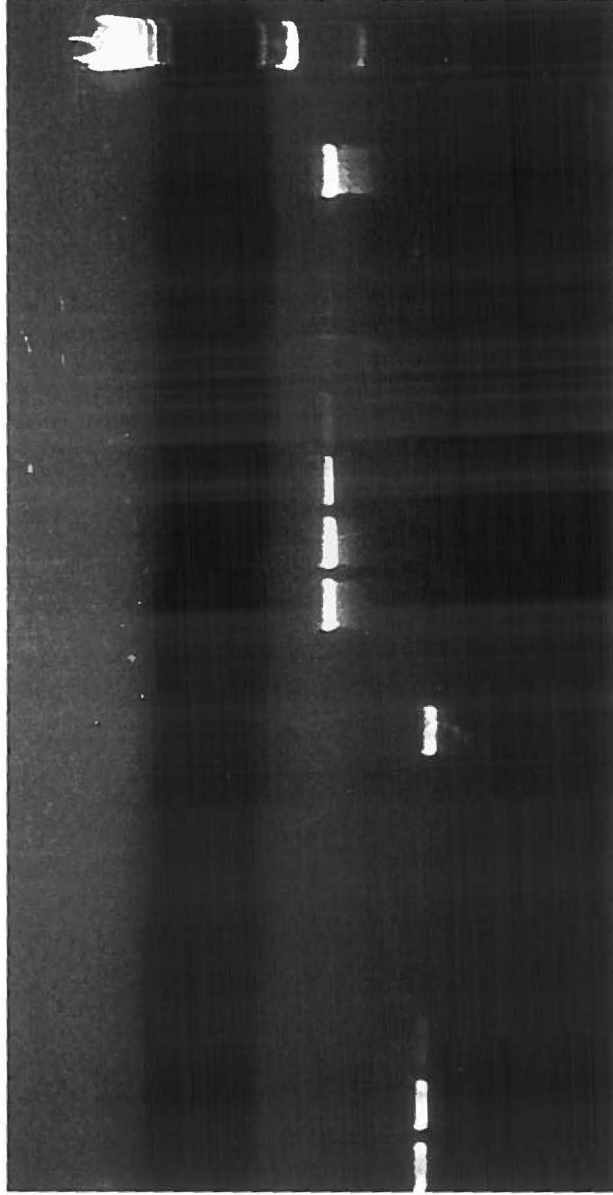


FIGURE 5: Sensitivity of the single PCR procedure in detecting 10-fold dilutions of extracted genomic DNA at an initial concentration of 200 ng/ μ l using two different primer pairs for the p46 gene. Lanes 1 to 9, primer pair p46 IntFS-p46 IntRS; lanes 10 to 18, primer pair FISp46-RISp46. Lanes 1 and 10, 10^1 ; lanes 2 and 11, 10^{-2} ; lanes 3 and 12, 10^{-3} ; lanes 4 and 13, 10^{-4} ; lanes 5 and 14, 10^{-5} ; lanes 6 and 15, 10^{-6} ; lanes 7 and 16, 10^{-7} ; lanes 8 and 17, non diluted DNA; lanes 9 and 18, negative control. Lane M, 1-kb plus DNA ladder.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M bp



2036
1636
1018
506

FIGURE 6: Differentiation between *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* following PCR amplification of extracted genomic DNA with specific p36 and p37 primer pairs, respectively. Lanes 1 and 2, *M. hyopneumoniae* primers amplifying *M. hyopneumoniae* and *M. hyorhinis* DNA, respectively; lanes 3 and 4, *M. hyorhinis* primers amplifying *M. hyorhinis* and *M. hyopneumoniae*. Lanes M, 1-kb plus DNA ladder.

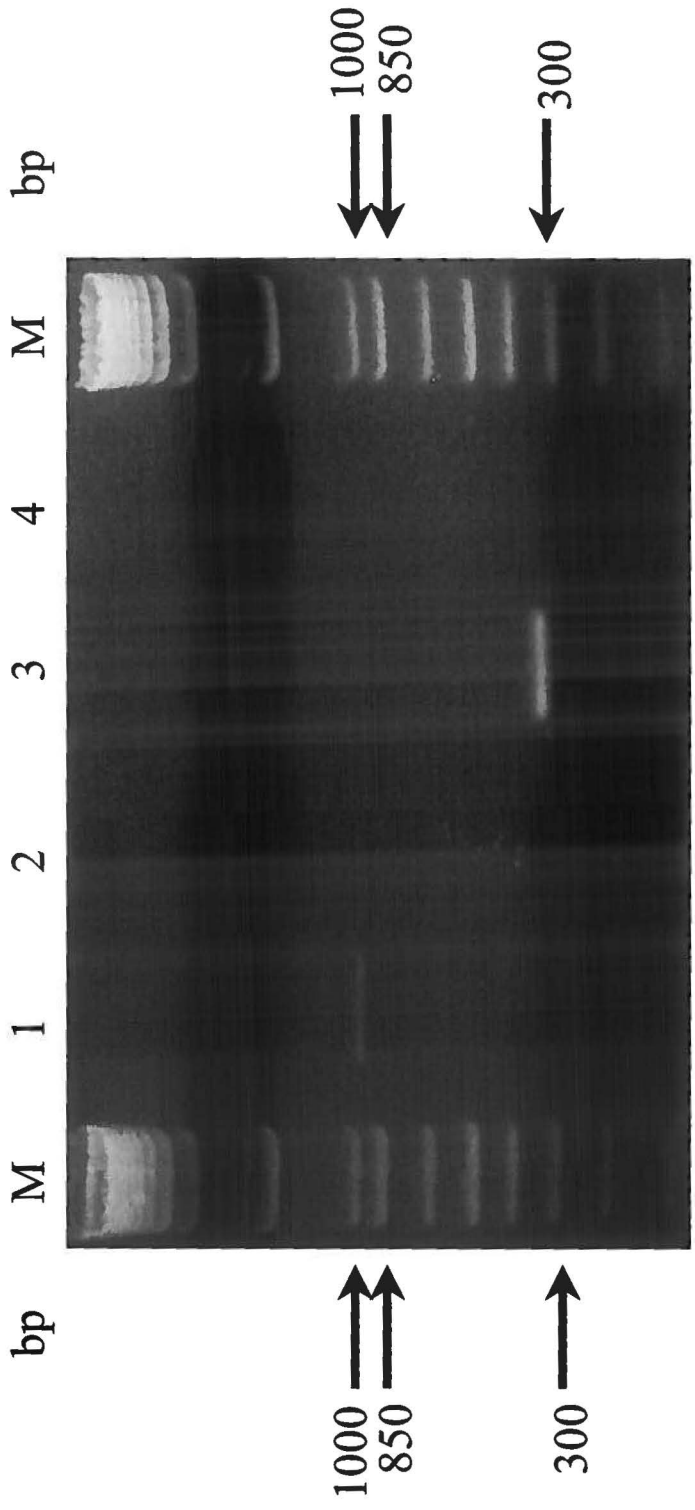
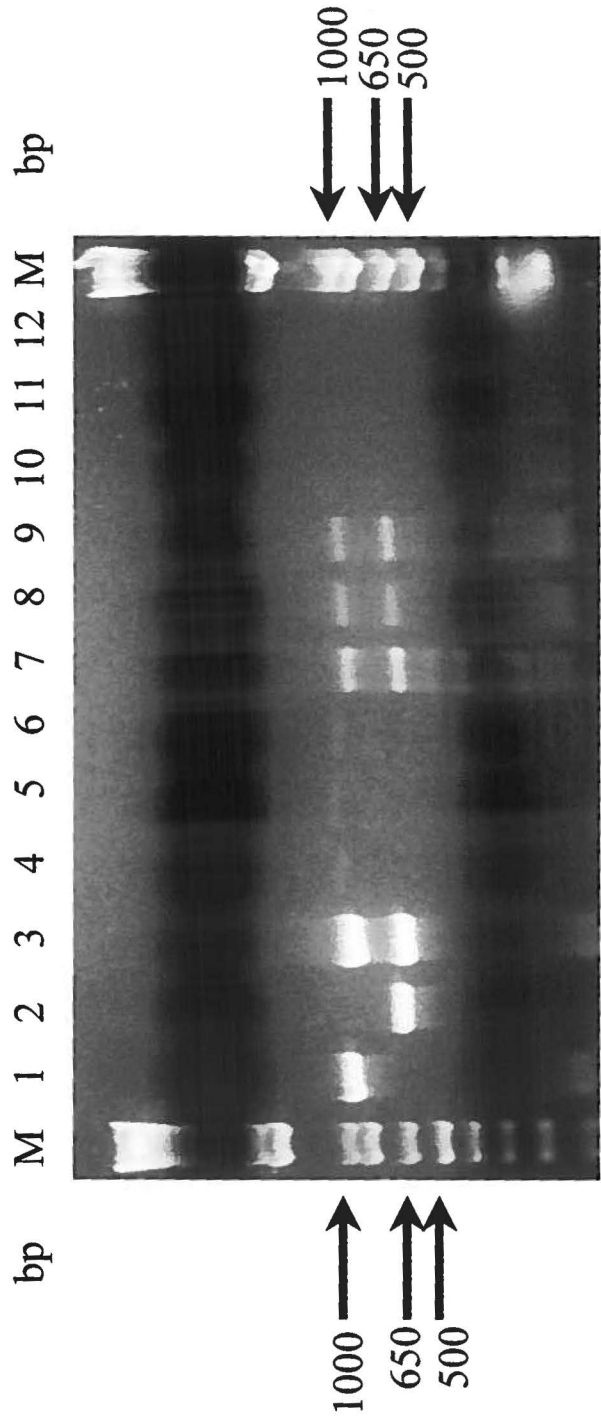


FIGURE 7: Electrophoretic pattern of p36 and p46 amplicons obtained by the multiplex PCR assay. Two fragments of 948 and 580 bp were amplified for the p36 and p46 genes of *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934, respectively (lanes 1 and 2). Simultaneous amplification of the p36 and p46 gene fragments from *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934 genomic DNA (lane 3). Both p36 and p46 primer pairs were used to amplify *M. hyorhinae* genomic DNA, by single PCR (lanes 4 and 5) and by multiplex PCR (lane 6). Simultaneous amplification of the p36 and p46 fragments from *M. hyopneumoniae* field isolates (lanes 7 to 9). Lack of amplification when using both primer pairs in the multiplex PCR assay on healthy lung homogenates (lanes 10 to 12). Lanes M, 1-kb plus DNA ladder.



CONTRIBUTION DES COLLABORATEURS DE L'ARTICLE "SPECIES-SPECIFIC MABS TO *E. COLI* EXPRESSED P36 PROTEIN OF *M. HYOPNEUMONIAE*"

Plusieurs personnes ont travaillé sur cette recherche. Boutheina Ben Abdel Moumem a trouvé la séquence du gène codant pour la protéine p36 de *M. hyopneumoniae* dans GenBank et a fait synthétiser les amorces amplifiant le gène en entier. Elle a ensuite cloné le gène p36 amplifié dans le vecteur pGEX-4T-1, transformé des bactéries compétentes avec le plasmide modifié, produit un petit lot de GST-p36 recombinante pour vérifier les conditions d'expression de la protéine de fusion et fait les premiers essais de scindage de la GST-p36. La figure 2, c'est-à-dire le profil électrophorétique de l'expression de la GST-p36 dans *E. coli*, a été pris dans ses cahiers de laboratoire. Kane Cheikh Saad Bouh a immunisé les souris avec la p36, a aidé à reviser le protocole de fusion et a participé aux manipulations des porcs lors de l'infection expérimentale. Nicole Sawyer a fait l'expérience de fusion, la surveillance et le passage des cellules et la propagation des clones jusqu'à l'injection des souris pour la production des liquides d'ascite.

À partir des stocks congelés des bactéries transformées par le plasmide pGEX-4T-1/p36, j'ai produit quelques lots de plus d'un litre de bactéries compétentes exprimant la protéine de fusion, induit l'expression à l'IPTG, purifié la GST-p36 et scindé la protéine recombinante avec la thrombine. J'ai testé le sérum des souris immunisées par ELISA pour vérifier la réponse immune et déterminer le moment pour amorcer l'expérience de fusion. J'ai mis au point une épreuve d'ELISA pour le criblage des hybridomes sécréteurs et déterminé les titres des liquides d'ascites. Pour confirmer la spécificité polypeptidiques des AcMo, j'ai fait des immunobuvardages de type Western sur les surnageants de culture des hybridomes pour lesquels des hauts titres en anticorps avaient été déterminés par ELISA. J'ai aussi vérifié en parallèle la réactivité des AcMo envers la p36 recombinante linéaire clivée et l'antigène complet de *M. hyopneumoniae*. J'ai aussi réalisé l'isotypage de ces AcMo. J'ai cultivé des souches de *M. hyopneumoniae* provenant de poumons positifs de diverses fermes du Québec, préparé les lysats de ces

souches et vérifié la réactivité des AcMo envers ces dernières par les tests ELISA et immunobuvardage. J'ai standardisé la quantité de protéines utilisées dans ces tests. J'ai cultivé les différentes espèces de mycoplasmes retrouvés chez les porcs, fait de l'antigène et vérifié la spécificité des AcMo envers ces microorganismes par immunobuvardage et ELISA. J'ai mis au point l'ELISA de compétition afin d'estimer le nombre d'épitopes de la p36 reconnues par ces différents AcMo. J'ai cultivé la souche IAF-DM9827 de *M. hyopneumoniae*, qui a servi lors de l'infection expérimentale des porcs, et j'ai participé aux manipulations lors de l'infection. De plus, j'ai préparé les coupes congelées des poumons provenant des porcs infectés dans le laboratoire et réalisé les tests d'immunofluorescence indirecte utilisant les AcMo anti-p36.

Par la suite, j'ai fait l'analyse des résultats et toutes les figures de cette article sauf celle de Boutheina (figure 9). Finalement, j'ai fait la revue de littérature nécessaire et j'ai rédigé l'article.

Species-specific Monoclonal Antibodies to *E. coli* expressed p36 cytosolic protein of *M. hyopneumoniae*

J. CARON, N. SAWYER, B. BEN ABDEL MOUMEN, K. CHEIKH SAAD BOUH AND S. DEA*
Centre de Microbiologie et Biotechnologie, INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3

***Corresponding author:** Serge Dea

Mailing address: Institut Armand-Frappier, Centre de microbiologie et biotechnologie, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3

Fax: (514)686-5627

E-mail: Serge_Dea@INRS.IAF.UQUEBEC.CA

Key Words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, p36 protein, recombinant protein, monoclonal antibodies, indirect immunofluorescence

ABSTRACT

The p36 protein of *M. hyopneumoniae* is a cytosolic protein carrying species-specific antigenic determinants. Based on the genomic sequence of the reference strain ATCC 25934, primers were designed for PCR amplification of the p36 encoding gene (948 bp). These primers were shown to be specific to *M. hyopneumoniae* since no DNA amplicons could be obtained with other mycoplasma species and pathogenic bacteria that commonly colonize the porcine respiratory tract. The amplified p36 gene was subcloned into the pGEX-4T-1 vector to be expressed in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase (GST). The GST-p36 recombinant fusion protein was purified by affinity chromatography, cut by thrombin, and the enriched p36 protein was used to immunize female BALB/c mice. Nine hybridoma cell lines, producing monoclonal antibodies (MAbs) to the p36 protein of *M. hyopneumoniae*, have been established by the fusion of P3x63 Ag8.653 myeloma cells with spleen cells from the immunized mice. Growing hybridoma cell lines were screened by indirect ELISA with the cleaved p36 as coating antigen. The specificity of the MAbs to the homologous strain was confirmed by Western immunoblotting. Cross-reactivity study of the anti-p36 MAbs towards two other *M. hyopneumoniae* reference strains (ATCC 25095 and J strains) and Quebec field strains that had been isolated in culture, as well as data obtained from additivity ELISAs suggested that the nine anti-p36 MAbs were directed against an highly conserved epitope, or closely located epitopes, of the p36 protein. The anti-p36 MAbs permitted effective detection by indirect immuno-fluorescence of *M. hyopneumoniae* in frozen lung sections from experimentally-infected pigs.

INTRODUCTION

M. hyopneumoniae is the causative agent of enzootic pig pneumonia (Goodwin *et al*, 1965; Maré and Switzer, 1965), a disease which is endemic in most of the pig producing countries and is characterized by high morbidity and low mortality rates (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996). Coughing is the principal clinical sign, and retarded growth and poor food conversion may result in considerable economic losses. Furthermore, this agent predisposes the pigs to secondary pulmonary infections; hence, increasing the mortality among the herds and the financial problems (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996).

M. hyopneumoniae genome encodes for several characterized immunodominant proteins, amongst which a cytosolic protein (p36) (Stipkovits *et al*, 1991; Strasser *et al*, 1991), three membranous proteins (p46, p65 and p74) (Klinkert *et al*, 1985; Mori *et al*, 1987; Brooks and Faulds, 1989; Kim *et al*, 1990) and an adhesin (p97) (Zhang *et al*, 1995). All of these proteins have been shown to trigger an early antibody response during the course of the infection and to be highly specific to *M. hyopneumoniae* (Mori *et al*, 1988; Brooks and Faulds, 1989; Strasser *et al*, 1991; Futo *et al*, 1995). The functions of these proteins have not been yet elucidated, but specific reactants may eventually be useful tools for the diagnosis of *M. hyopneumoniae*.

The cytosolic p36 protein has been cloned, expressed and characterized as a lactate dehydrogenase (Strasser *et al*, 1991; Haldimann *et al*, 1993). It has been shown to induce an early immune response in pigs that were experimentally- and naturally-infected by *M. hyopneumoniae* (Frey *et al*, 1994). Furthermore, p36 is apparently highly conserved amongst different *M. hyopneumoniae* strains from various parts of the world (Stipkovits *et al*, 1991; Strasser *et al*, 1991). Hyperimmune serums that have been produced against the recombinant p36 protein showed no reactivity against other porcine mycoplasmas, including *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *A. laidlawii* (Strasser *et al*, 1991). Furthermore, no cross-reactivity was demonstrated against Mycoplasma or Acholeplasma species isolated from humans, other farm animals, cats and dogs (Strasser *et al*, 1991).

The diagnosis of *M. hyopneumoniae* is usually done by cultivation of the organism or by immunofluorescence tests performed on frozen thin lung sections using polyclonal antibodies (Amanfu *et al*, 1984; Ross, 1992; Feenstra *et al*, 1994; Kobisch and Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). However, because of the fastidious nature of this microorganism, its culture and identification may take up to one month. The cultures are also often contaminated with *M. hyorhinis*, which is an opportunistic agent that invades the lower respiratory tract of pigs and overgrows *M. hyopneumoniae* in primary isolation attempts (Freeman *et al*, 1984). Moreover, the overall efficacy of serological detection methods, such as ELISAs, is often hampered because of the antigenic relationships that exist between *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare* and *M. hyorhinis* (Freeman *et al*, 1984; Armstrong *et al*, 1987).

The indirect immunofluorescence assay is still widely used for the diagnosis of *M. hyopneumoniae* because it is a rapid and sensible technique and allows histopathological observations. However, the use of polyclonal antisera may result in the non specific detection of other pathogens, namely *M. flocculare* and *M. hyorhinis* (Armstrong *et al*, 1987; Stipkovits *et al*, 1991; Feenstra *et al*, 1994; Maes *et al*, 1996). The use of monoclonal antibodies (MAbs) increases the specificity of serological and immunohistochemical tests (Mori *et al*, 1987; Feld *et al*, 1992). This paper describes the cloning and *Escherichia coli*-expression of the p36 protein of *M. hyopneumoniae*, the production and characterization of anti-p36 MAbs and their potential application in indirect immunofluorescence for the detection of the agent in frozen sections of lung tissues.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and growth conditions

The ATCC 25934 strain of *M. hyopneumoniae* was used as the reference strain in this study. Other strains of *M. hyopneumoniae* (ATCC 25095 and J), as well as *M. flocculare* (ATCC 27399), *M. arginini* (ATCC 23838), *M. hyorhinae* (ATCC 17981) and *Acholeplasma laidlawii* (ATCC 23206) were obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, MD, and used for comparative antigenic studies. *M. hyosynoviae* was cultivated from a field case of polyarthritis and was kindly provided to us by Claude Montpetit, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec. The mycoplasmas were grown in modified Friis medium (Friis, 1973), containing 20 % porcine serum (Gibco-BRL), 5 % fresh yeast extract (Gibco-BRL), 0,15 mg/ml methycillin (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario) and bacitracin (Sigma-Aldrich), and 0,08 mg/ml thallium acetate (Sigma-Aldrich). The cells were harvested by centrifugation at 12000 g for 30 minutes at 4°C, washed three times and suspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,4.

Field isolates of *M. hyopneumoniae* were cultivated from lung homogenates of pigs suffering from acute or chronic respiratory problems that had been forwarded to our laboratory for confirmation by PCR of outbreaks of enzootic pneumonia in pig herds in Southern Quebec (Caron *et al*, 1999).

DNA extraction and PCR conditions

The genomic DNA from *M. hyopneumoniae* was obtained after an incubation of 1 hour at 37°C with 50 µg/ml RNase (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec) and 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), followed by another incubation of 1 hour at 37°C in the presence of 50 µg/ml proteinase K (Boehringer Mannheim) and 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich). A phenol and chloroform extraction and 100 % ethanol precipitation completed the DNA purification process (Sambrook *et al*, 1989).

The oligonucleotide primers used for enzymatic amplification of the entire ORF of the p36 gene (948 bp) of *M. hyopneumoniae* were selected from the previously published DNA sequence (Haldimann *et al*, 1993) of the ATCC 25934 strain (GenBank accession number X67286). The sequence of the Forward primer, FSp36, was 5' GGG CCG ATG AAA CCT ATT AAA ATA GCT 3', and that of the reverse primer, RSp36, was 5' GCC GCG AAA TTA AAT ATT TTT AAT TGC ATC CTG 3'. The sequence analysis for the primer selection was performed using the McVector 3.5 (International Biothechnologies) and Gene Works 2.2 (IntelliGeneticsInc., Mountain View, California.) programs. The oligonucleotide primers were synthesized in an automated Gene Assembler DNA synthesizer (Pharmacia LKB).

The PCR amplification was performed in a 100 µl reaction mixture containing 2,5 µl genomic DNA, each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0,2 mM, 50 pmol of each primer, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ (Gibco-BRL) and 1,0 U *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL). The tubes were subjected to 35 amplification cycles of denaturation at 94°C for 60 sec, primer annealing at 50°C for 60 sec, and elongation at 72°C for 90 sec, followed by a final extension step at 72°C for 10 minutes. The PCR amplifications were performed in a DNA Engine thermocycler (MJ Research , model PTC-100 with hot bonnet). Aliquots of 10 µl of the amplified products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels (Boehringer Mannheim) in TAE buffer (0,04M Tris-acetate [pH8,5], 0,002M EDTA) in the presence of ethidium bromide at 100 V for 1 hour and viewed under UV illumination.

Cloning, procaryotic expression and purification of the GST-p36 recombinant fusion protein

The complete ORF of the p36 gene (948 bp) was amplified by PCR as described above. The primers contained two restriction sites for *Eco*RI (sense primer) and *Bam*HI (antisense primer) at their 5'ends for directional cloning. The amplified products were purified by extraction with phenol and chloroform and precipitation with 100 % ethanol, digested with *Eco*RI and *Bam*HI and ligated into the similarly digested pGEX-4T-1 procaryotic vector, according to manufacturer's instructions (Pharmacia). The

recombinant plasmid was used to transform competent *E. coli*, strain BL21, cells (Gibco BRL) to produce the GST-p36 fusion protein. Briefly, overnight cultures of the transformed bacteria were diluted 1:100 in a total volume of 1,2 liters of 2YT medium containing 100mg/ml ampicillin and 2 % glucose, and grown at 37°C with shaking (250 rpm) to an A_{600} of 0,8 to 1,0. Protein expression was induced by addition of 0,1 mM isopropylthiogalactoside (IPTG), and after a 5 hour-incubation at 37°C with vigorous agitation (250 rpm), the cells were pelleted by centrifugation at 8000 X g and resuspended in 75 ml of ice-cold 0,1 M PBS, pH 7,4, containing 1 mg/ml lysozyme and 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF; Boehringer Mannheim). Cells were disrupted by sonication and Triton X-100 (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 1 %, followed by an incubation of 30 minutes at room temperature to aid the solubilization process. The soluble fusion protein was purified by affinity chromatography on glutathione-sepharose 4B beads (Pharmacia) and either eluted with reduced glutathione (20mM glutathione, 50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 120 mM NaCl) (31) or directly cleaved through an overnight incubation with 18 units of thrombine to obtain the enriched p36 moiety. The expressed recombinant protein was analyzed by electrophoresis on 12 % SDS-polyacrylamide gels after solubilization in 4X Laemmli disruption buffer and boiling for 5 minutes.

Production of a monospecific anti-p36 rabbit hyperimmune serum

Two New-Zealand Albino rabbits were inoculated by the intradermal route with 250 µg of the affinity-purified GST-p36 recombinant fusion protein emulsified in complete Freund adjuvant (Gibco BRL). The rabbits were boosted twice at 2-week-intervals by the intramuscular route with the same amount of protein emulsified in incomplete Freund adjuvant. Reactivity of the antiserums to the native p36 protein of *M. hyopneumoniae* was assessed by Western blotting toward complete antigen of the homologous strain.

Production and characterization of MAbs to the p36 gene of *M. hyopneumoniae*

Female BALB/c mice were immunized intraperitoneally with 20 µg of affinity-purified p36 recombinant protein mixed with Freund's complete, or incomplete, adjuvant for the first and the three following injections, respectively. Injections were given at two-

week intervals, then an intravenous dose of the antigen without adjuvant was given three days prior fusion experiment. The fusion protocol for sensitized splenocytes with P3x63 Ag8.653 myeloma cells was essentially similar to that described previously (Dea and Tijssen, 1989; Dea *et al*, 1996). Hybrid cells were cultured in hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium containing 10% fetal calf serum. The supernatants from growing mouse-mouse hybridoma cells were screened for anti-p36 antibody production by an indirect ELISA using purified p36 recombinant protein as antigen. The secreting hybridoma cells were subcloned twice by serial dilutions. Immunoglobulin isotyping was done using a commercial enzyme immunoassay (Boehringer Mannheim). Ascitic fluids containing anti-p36 MAbs were obtained by intraperitoneally injecting $1-2 \times 10^6$ cloned hybrid cells into 16-week-old female BALB/c mice that had been primed 14 days before with 0,5 ml of pristane (2, 6, 10, 14-tetramethyl pentadecane; Sigma-Aldrich).

Screening ELISA procedure

Hybridoma supernatants and mice ascitic fluids were screened for the presence of anti-p36 antibodies by an indirect ELISA (Gonin *et al*, 1999). The optimal p36 antigen concentration was determined by checkerboard titration, using pre-fusion mouse hyperimmune serum, and corresponded to 0,15 μg of protein/well. The plates were coated with p36 protein diluted in 0,1 M sodium carbonate buffer pH 9,6 overnight at 4°C, washed twice with 0,1 M PBS, pH 7,4, containing 0,05 % Tween 80 (PBS-T) and blocked with PBS-T supplemented with 5 % goat serum and 4 % skim milk (Blotto) for 2 hours at 37°C. All subsequent steps were performed at 37°C. Aliquots of 100 μl of hybridoma supernatants or diluted ascitic fluids were added to each well and incubated for 45 minutes. Then, the plates were washed 5 times, and horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim) was added at a dilution of 1:2000 in the blocking solution for 45 minutes. Following another washing step, the enzyme substrate solution containing 0,08 % of 3',3',5',5' tetramethylbenzidine (Sigma) in 120 mM citrate buffer and 0,005 % hydrogen peroxide (pH 5,0) was added, followed by an incubation of 20 minutes at room temperature. The reaction was stopped by the addition of 50 μl of 2 N H_2SO_4 to each well and the A_{450} s were read on a multichannel spectrophotometer (Titertek Multiskan-MCC/340, Flow).

Western immunoblotting

Mycoplasma proteins separated by 12% SDS-PAGE were electrotransferred to nitrocellulose membranes (0,45 μ m pore size; Xymotech) for 2 hours at 60 V, as previously described (Dea and Tjissen, 1989). Membranes were blocked overnight in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 8,6, containing 0,5 % Tween 20 (TBS-T), 5 % goat serum and 5 % skim milk. They were then incubated for 2 h at room temperature in the presence of either 1:1000 dilution of rabbit hyperimmune serum, 1:200 to 1:1000 dilution of porcine hyperimmune serum, or 1:1000 dilution of mouse ascitic fluid in the blocking buffer. Following five washes in TBS-T, the membranes were incubated with 1:2000 dilution of peroxidase-labeled goat anti-rabbit (Boehringer Mannheim), anti-porcine (Sigma-Aldrich) or anti-mouse (Boehringer Mannheim) IgG conjugate in the blocking buffer for 30 minutes at room temperature. Blots were washed intensively and immune reactions were visible after 15-30 minutes incubation in the enzyme substrate solution containing 0,3 % chloro-1-naphtol (Sigma-Aldrich) in TBS with 0,001 % hydrogen peroxide (Fisher Scientific).

Additivity ELISA assay

The additivity ELISA was performed as described previously (Yang *et al*, 1999). In brief, all MAbs were adjusted to concentrations that would react with all available epitopes in the antigen (purified p36 recombinant protein) used to coat the wells of 96-well microtiter plates. Aliquots of 50 μ l of optimally diluted MAbs were added to each well, followed by an incubation period of 30 minutes at 37°C. Then, 50 μ l of the homologous or heterologous MAbs were added to the same wells and incubated for one extra hour at 37°C. Each reaction was conducted in duplicate. The subsequent steps were performed as for the screening ELISA. The corrected absorbances were determined at 450 nm for 3 replicates. Mean additivity values were calculated using the following formula:

$$AV (\%) = \frac{\text{Corrected OD MAb}_{1+2}}{(\text{Corrected OD MAb}_1) + (\text{Corrected OD MAb}_2)} \times 100$$

where MAbs 1 and 2 are any 2 MAbs tested for additivity. The additivity values (AV) were expressed in percentage of binding. Two homologous MAbs should give AV values near to 50 %, whereas MAbs against different epitopes should rather give AV approaching 100 %.

Experimental infection of SPF pigs

Six crossbred F1 (Landrace X Yorkshire) SPF piglets 9-to-10 week of age were obtained from a breeding farm in the province of Quebec. The breeding stock and piglets were tested and proven to be seronegative for PRRSV, encephalomyocarditis virus (EMCV), porcine parvovirus (PPV), haemagglutinating encephalomyelitis virus (HEV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and *Mycoplasma hyopneumoniae*. The piglets were randomly divided into two groups, each group being allocated to a separate isolation rooms in facilities equipped with microorganism free filtered in-flowing and out-flowing air system. They were fed commercial food and water *ad libitum*.

Two piglets kept as controls received 8 ml of fresh Friis medium given intratracheally. The remainder four piglets received by the same route 8 ml of a culture of the IAF-DM9827 strain of *M. hyopneumoniae* corresponding to an infectious dose of 10^7 color-changing units/ml (dilution of the culture that causes acidification of the medium within a 7-day incubation period). The animals were followed clinically for a 3-week period, then were euthanized. Their lungs were aseptically collected and processed for histopathology, PCR and cultivation attempts in modified Friis medium.

Histopathological examination

Thin sections (5 μ m thick) of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from the lungs of control and experimentally-infected pigs were routinely processed for hematoxylin-eosine staining, as previously described (Dea *et al*, 1991).

Indirect immunofluorescence staining

Thin frozen lung sections showing typical enzootic pneumonia lesions were mounted on glass slides and fixed with 100 % ice cold acetone. Once the slides were dried, they

were incubated with p36 MAbs at a dilution of 1 :100, washed in PBS and reacted with fluorescein-conjugated goat anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim) diluted 1:40 in PBS. The fluorescent reaction was observed under an UV microscope.

RESULTS

PCR amplification, cloning, expression and purification of the GST-p36 fusion protein

The primers RSp36-FSp36, containing *Eco*R1 (sense primer) and *Bam*HI (antisense primer) restriction sites at their 5' ends for directional cloning, were used to amplify the complete ORF (948 bp) of the p36 gene of *M. hyopneumoniae* (Fig. 8). The amplified fragment and the procaryotic pGEX-4T-1 vector were both digested with *Eco*RI and *Bam*HI and successfully ligated. The recombinant plasmid was used to transform competent *E. coli* cells, strain BL21, which were then induced by the addition of IPTG in the culture medium to express the fusion protein GST-p36. SDS-PAGE analysis of sonicates of IPTG-induced transformed *E. coli* cells revealed the presence of an additional 60 kDa protein species, in comparison to non-induced bacteria, corresponding to GST (molecular weight of 24 kDa) fused to the N terminus of the cloned the p36 protein (Fig. 9, lane 1). After bulk purification of the induced sonicates on glutathione-sepharose beads, amounts of 3,0 to 3,5 mg of GST-p36 recombinant fusion protein were recovered from a culture of 1,2 L of IPTG-induced and transformed bacteria (Fig. 9, lanes 4 and 5). To obtain purified recombinant p36 protein for immunization of mice and rabbits, GST-p36 recombinant fusion protein was digested overnight with thrombine. The electrophoretic profile of the cleaved p36 portion of the fusion recombinant protein, yielded a band migrating at the expected size (Fig. 10, lanes 2 and 3). Cleavage of the GST-p36 recombinant fusion protein was complete, no residual uncut GST-p36 protein being detected by Western blotting analysis (Fig. 10, lanes 1 to 3).

Reactivity and specificity of the anti-p36 rabbit hyperimmune serum

As illustrated in Fig. 10, specific revelation of the GST-p36 recombinant fusion protein (60 kDa) and its cut p36 moiety was obtained by Western blotting with the monospecific anti-p36 rabbit hyperimmune serum. This antiserum showed only a weak reactivity toward proteins of the non-transformed *E. coli* cells and failed to react against complete antigenic preparations of *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, *M. arginini*, *M.*

hyosynoviae and *A. laidlawii*, thus confirming the species-specificity of the p36 cytosolic protein of *M. hyopneumoniae*.

Production and characterization of anti-p36 MAbs

BALB/c mice that were injected with the purified p36 recombinant protein developed a high specific antibody response, antibody titers in serum from mice providing the immune splenocytes ranged from 12,800 to 51,200 as determined by indirect ELISA. Following one fusion experiment, 11 hybridoma cell lines could be established from which 9 were found to secrete anti-p36 antibodies. These 9 hybridomas were subcloned by a limiting dilution method, subsequently expanded and retested before being injected to pristane-primed mice to produce ascitic fluids. Using a commercial isotyping kit (Boehringer Mannheim), all the MAbs were of the IgG1 subclass and possessed kappa light chains. In all cases, antibody titers to p36 recombinant protein above 51,200 were recovered from ascitic fluids, as determined by ELISA. When tested by Western blotting against the native and the cleaved recombinant p36 protein, antibodies in ascitic fluids reacted very strongly and specifically to both antigens (Fig. 11).

Species-specificity of the anti-p36 MAbs

The MAbs were tested for their species-specificity by Western blotting against complete antigenic preparations of three reference strains of *M. hyopneumoniae* (ATCC 25934, ATCC 25095, J), and that of other porcine mycoplasma species, including *Acholeplasma laidlawii* (Fig. 12). The antibodies reacted very specifically against the three *M. hyopneumoniae* strains and showed no reactivity with other mycoplasma species tested. Lacked of reactivity to other mycoplasma species was also confirmed by indirect ELISA (data not shown).

Three Quebec field strains of *M. hyopneumoniae*, IAF-DM9827, IAF- R202A, and IAF-20167, were cultivated in our laboratory, and the reactivity of the anti-p36 MAbs to these strains was also verified (Fig. 13B). The presence of the p36 protein in all of these three field strains was confirmed by Western blotting with hyperimmune mouse and rabbit sera (Fig. 13A). In all cases, a positive reaction was obtained with the 9 anti-p36

MAbs, suggesting the presence of at least one highly conserved antigenic determinant (Fig. 13B, lanes 2, 3, 4).

Epitope analysis of the MAbs

It has been previously reported that homologous MAbs yielded additivity values closed to 50 %, whereas heterologous antibodies yielded additivity values approaching 100 % because of lack of competition (Yang *et al*, 1999). Data of the additivity ELISAs confirm that all nine MAbs are directed against one epitope, or closely localized epitopes, of the p36 protein. All the additivity values obtained with different combinations of two of the 9 MAbs were within the range of 50 % (Table 8).

Clinical and pathological findings in experimentally-infected pigs

The four SPF-pigs that were infected by the intracheal route with a culture of the IAF-DM9827 field strain of *M. hyopneumoniae* did not manifest obvious clinical signs over the 3-week observation period. After the first week, the infected pigs were apparently more apathic, reacted less to their environment and preferred to lay on the ground rather than stand. Compared to the control group, the infected pigs showed a little drop in feed consumption, with a transitory mild fever (39,5 to 40,5°C) that persisted until the end of the observation period. Coughing could be elicited by exercising infected pigs around the pen and it occurred with greater frequency in the period immediately following the exercise.

Despite the low severity of the clinical signs, two infected pigs that were euthanized at day 21 p.i. had gross lesions that were confined to the respiratory tract and thoracic cavity. The lung lesions were confined almost entirely to the apical and cardiac lobes and were clearly demarcated from the normal lung tissue. Plum-colored or greyish areas of consolidation resembling lymphoid tissue were scattered along the ventral borders of the lobes. The mediastinal lymph nodes were enlarged and congested. There was also slight accumulation of a non-suppurative exudate within the thoracic cavity (hydrothorax) and pericardium (hydropericardium). The other organs were apparently normal. To confirm *M. hyopneumoniae* infection, PCR was conducted on lung homogenates and attempts

were made to isolate the microorganism in culture. Expected DNA amplicons were obtained using specific p36 PCR primers for *M. hyopneumoniae*, but no reaction was observed using primer pairs which have been designed to specifically-amplified the p37 gene of *M. hyorhinis* (Caron *et al*, 1999). Following two serial passages in culture medium, growth of the microorganism was obtained as noted by changes of the acidity and turbidity of the medium. Confirmation that *M. hyopneumoniae* was the only microorganism growing in culture was obtained by PCR.

Microscopic lesions compatible with enzootic pneumonia were observed within the lungs of infected pigs (Fig. 14). Characteristic perivascular and peribronchiolar lymphomononuclear nodules of infiltration, often compressing the lumen of the bronchioles, could be observed in both euthanised pigs. There were also pyknotic cell debris and few mononuclear cells present in the lumen of the bronchioles, with hyperplasia of the epithelial cells. The alveoli had a normal appearance with only a mild lymphomononuclear infiltration of the interalveolar septae.

Detection of *M. hyopneumoniae* in lungs by indirect immunofluorescence using anti-p36 MAbs

Frozen sections of lungs from pigs that were experimentally infected by *M. hyopneumoniae* (strain IAF-DM9827) were processed for indirect immunofluorescent (IIF) staining using a pool of anti-p36 MAbs. Positive fluorescence was generally associated with the presence of microscopic lesions. Fluorescent cells were usually observed lining the bronchiolar epithelium and lining the wall of small alveolar ducts (Fig. 15A and B), but not within the lamina propria or interstitial tissue surrounding those structures. No such fluorescence was observed when lung sections were incubated with normal mouse serum (data not shown).

DISCUSSION

Different MABs have been produced against *M. hyopneumoniae* proteins, namely against the p46 (Mori *et al*, 1987; Mori *et al*, 1988) and p74 (Feld, 1992) membranous proteins and the respective MABs have been used in double sandwich and competitive ELISA tests for serological diagnosis of the infection. In this study, it was demonstrated that MABs, which recognize at least a common epitope on the cytosolic p36 protein of *M. hyopneumoniae*, may be used to serologically confirm the identification of field strains isolated in culture, using Western blotting, and for the detection of this microorganism by IIF in frozen lung sections of experimentally- or naturally- infected pigs.

The use of mycoplasma recombinant proteins or gene probes expressed in *E. coli* have been already reported either for the study of the genes or as diagnostic tools (Klinkert *et al*, 1985; Trevino *et al*, 1986; Frydenberg *et al*, 1987; Kim *et al*, 1990; Strasser *et al*, 1991; Futo *et al*, 1995). Moreover, the pGEX-4T-1 expression system has been preconised by previous investigators to produce fusion recombinant proteins for other bacteria or viruses that have been used as antigens in the establishment of serological tests for the detection of antibodies targeted against proteins carrying major antigenic determinants (Harvey *et al*, 1993; Chirnside *et al*, 1995; Gallo *et al*, 1996; Gonin *et al*, 1999). By using such recombinant proteins expressed in procaryotic cells, a good correlation was obtained with data obtained using the complete viral or bacterial antigens or native homologous proteins. In the present study, the pGEX-4T-1 expression vector was chosen for various reasons. First, this procaryotic expression system has been shown to easily and rapidly produce large quantities of pure proteins (Smith and Johnson, 1988; Nakano *et al*, 1993), and because of the presence of a thrombin protease recognition site downstream the GST coding sequences, this allows cleavage of the desired protein from the fusion partner. Different incubation temperatures and concentrations of IPTG used for the induction can be tested to increase the level of production of the recombinant protein and to avoid its accumulation in form of inclusion bodies (Nakano *et al*, 1993; Gonin *et al*, 1999). Secondly, the GST protein is not present in *E. coli*; hence, pig sera should not

possess any antibodies that would react against this protein and interfere with data of serological tests.

The p36 protein was chosen since it has been previously reported to be highly specific and well conserved amongst the different strains of *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et al*, 1991; Caron *et al*, 1999), it is antigenic (Strasser *et al*, 1991; Frey *et al*, 1994), and there is no internal OPAL codon in the sequence of the encoding gene that interferes with efficient translation of the entire protein (Haldimann *et al*, 1993). Recently, a single PCR assay, using primer pair FSp36-RSp36 to amplify the entire encoding region of the p36 gene, was shown to be highly specific to *M. hyopneumoniae*, no reactivity being observed with other mycoplasma species of swine (Caron *et al*, 1999). In the present study, the entire p36 encoding region (948bp) could be amplified from genomic DNA preparation of the reference ATCC strain 25934 of *M. hyopneumoniae*, cloned and expressed in *E. coli*, yielding relatively large amounts of GST-p36 recombinant fusion protein that could be easily purified by affinity chromatography on glutathione-sepharose 4B. Efficient cleavage of the p36 moiety from the GST fusion partner was achieved following digestion with thrombin. Both the fusion protein and the cleaved p36 portion were stable at -80°C, barely any degradation could be observed by SDS-PAGE.

The GST-p36 recombinant fusion protein was used to produce monospecific polyclonal antiserum in rabbits. The later was found to be specific to *M. hyopneumoniae* by Western blotting reacting strongly against the reference strains and all field strains cultivated in our laboratory (data not shown). This monospecific hyperimmune serum failed to recognize other mycoplasmas of the porcine species, as well as *A. laidlawii*, thus confirming the species-specificity of the p36 cytosolic protein (Stipkovits *et al*, 1991; Caron *et al*, 1999). However, a mild reactivity could be noticed against *E. coli* proteins, a microorganism of the normal intestinal flora to which animals have already significant antibody titers in their serum (Stipkovits *et al*, 1991; Caron *et al*, 1999), The production of anti-p36 MAbs was thus precognized to avoid such reactivity toward antigenic proteins of heterologous bacteria which may interfere or masqued specific signals in

immunohistochemical methods used for the detection of *Mycoplasma* antigens in tissues of infected animals.

Once the p36 protein was cut by digestion with thrombin, BALB/c were immunized. The p36 recombinant protein appeared highly antigenic since it triggered efficient immune response in mice, high antibody titers being detected in those mice providing the immune cells for the fusion experiments. Nine secreting hybridoma cell lines producing MAbs to the p36 recombinant fusion protein could be established and subcloned. From data obtained in additivity ELISAs, the anti-p36 MAbs obtained were apparently directed towards the same epitope or closely located epitopes of the p36 cytosolic proteins, which were found to be highly preserved amongst all of *M. hyopneumoniae* isolates tested, in agreement with previous findings by others (Stipkovits *et al*, 1991). Since all anti-p36 MAbs reacted by Western blotting against the native viral protein, as well as to the linear *E. coli*-expressed recombinant p36 protein, data suggest that the anti-p36 MAbs obtained in the present study are probably directed against conformation-independent epitope (s).

Indirect immunofluorescence on frozen tissue sections is probably the most common diagnostic tool used for the detection of *M. hyopneumoniae* in tissues of infected pigs (Feenstra *et al*, 1994; Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996). The IIF test has many advantages compared to cultivation methods; it is rapid, sensitive and allows one to quantify damages or lesions caused by *M. hyopneumoniae* in the lungs or other tissues. However, polyclonal antibodies are currently used in the IIF test (Amanfu *et al*, 1984; Feenstra *et al*, 1994; Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996; Maes *et al*, 1996). Consequently, false-positive results may arise because of the cross-reactions existing between pathogenic (*M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*) and non or less virulent (*M. flocculare*, *M. hyorhinitis*) mycoplasma species (Freeman *et al*, 1984). The use of MAbs which react to a specific immunodominant protein of *M. hyopneumoniae* was preconized to eliminate such undesirable cross-reactivities.

SPF pigs that were experimentally-infected with a Quebec field isolate (IAF-DM9827) of *M. hyopneumoniae* developed pulmonary lesions compatible with a diagnosis of enzootic pneumonia, despite the absence of severe respiratory signs (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996). Confirmation of *M. hyopneumoniae* infection was obtained by PCR on lung homogenates and isolation of the pathogen in culture. Furthermore, thin frozen sections of lung tissues were incubated in the presence of a pool of anti-p36 MAbs and a specific fluorescent reaction that was limited to the epithelium lining bronchioles and small airways was observed. As expected, no fluorescence was observed within the interstitial tissues and lamina propria of the larger airways. *M. hyopneumoniae* has not been reported as a tissue invader, but is rather considered as an extracellular pathogen which associates very intimately with the ciliated epithelial cells of the porcine lower respiratory tract (Ross, 1992; Kobisch and Friis, 1996), in agreement with the immunofluorescent patterns obtained in the present study.

The indirect immunofluorescence technique described in the present study is time efficient, taking two hours to obtain the results once the sections are fixed. It only required small volume of diluted antiserum for any given reaction, and it is very specific. The p36 MAbs did not react with any other mycoplasma species commonly found in the pigs respiratory tract by Western blotting and ELISA. It is also a sensitive technique, although the intensity of the fluorescence was directly proportional to the quantity of lesions. Preliminary studies on tissues from naturally-infected pigs also yielded very interesting results, but the use of the anti-p36 MAbs must be evaluated on a more representative number of clinical cases before preconizing their routine used for diagnosis purposes.

TABLE 8. Epitope analysis of the cytosolic p36 protein of *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934 by the additivity test using seven of the anti-p36 MAbs

Added Mab	Test Mab						
	11C4	13B7	13C9	13G3	15A3	15C2	15E10
None	1,05 ^a	0,77	1,06	0,92	0,79	1,000	1,00
11C4	50% (1,02/2,02) ^b						
13B7	50% (0,91/1,82)	45% (0,69/1,54)					
13C9	47% (0,99/2,11)	46% (0,84/1,83)	38% (0,81/2,12)				
13G3	47% (0,93/1,97)	47% (0,80/1,69)	35% (0,69/1,98)	47% (0,86/1,84)			
15A3	49% (0,91/1,84)	51% (0,80/1,56)	42% (0,78/1,85)	49% (0,83/1,71)	51% (0,81/1,58)		
15C2	51% (1,04/2,05)	54% (0,97/1,77)	49% (1,00/2,06)	53% (1,02/1,92)	57% (1,02/1,79)	46% (0,91/2,00)	
15E10	45% (0,93/2,05)	51% (0,91/1,77)	44% (0,91/2,06)	57% (1,10/1,92)	51% (0,92/1,79)	48% (0,96/2,00)	48% (0,96/2,00)

^aOptical density was measured at 450 nm

^bAdditivity values (binding percents) calculated using the formula:

$$AV = \frac{\text{Corrected OD MAb}_{1+2}}{\text{Corrected OD MAb}_1 + \text{Corrected OD MAb}_2} \times 100\%$$

where "1" and "2" are any two MAbs tested for additivity.

FIGURE 8: PCR amplification of the ORF encoding the cytosolic p36 protein of *M. hyopneumoniae* (strain ATCC 25934). Lane 1, a 948 bp DNA amplicon corresponding to the entire p36 gene was obtained by PCR using the oligonucleotide primer pair FSp36 and RSp36. Lane M, the molecular sizes of three fragments of the 1-kb ladder.

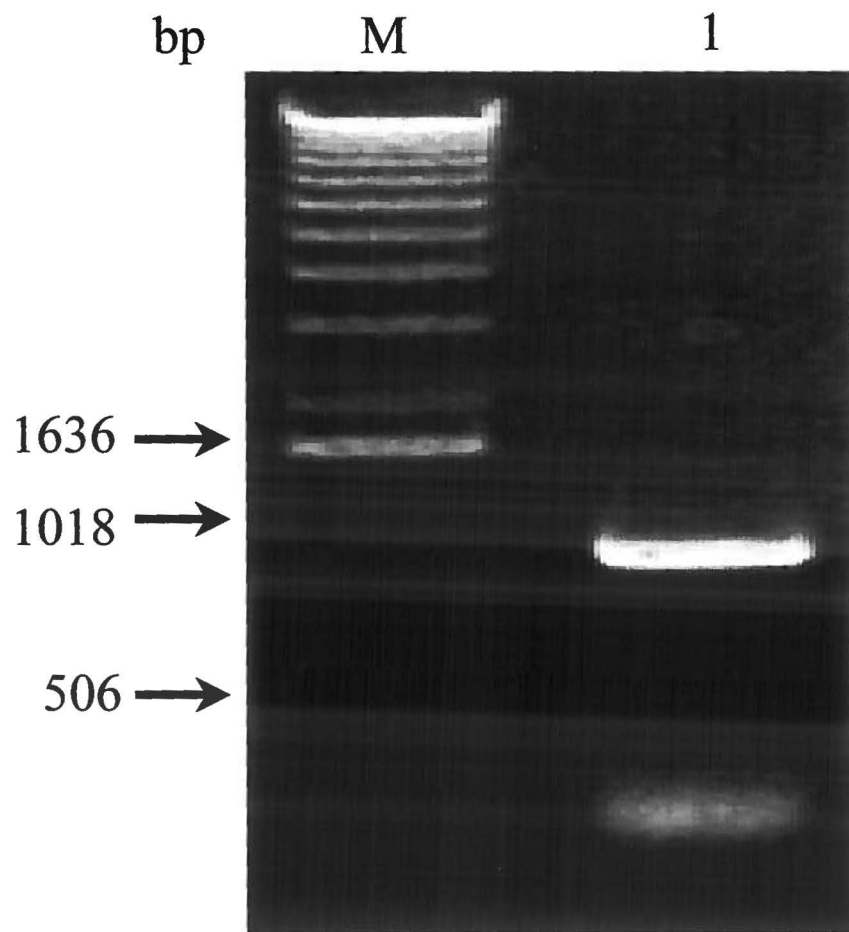


FIGURE 9: Expression of the recombinant GST-p36 protein in *E. coli*. Lane 1, IPTG-induced recombinant bacteria; Lane 2, non induced recombinant bacteria; Lane 3, GST protein (24 kDa); Lanes 4 and 5, purified GST-p36 recombinant fusion protein (60 kDa); Lane M, low range molecular weight markers.

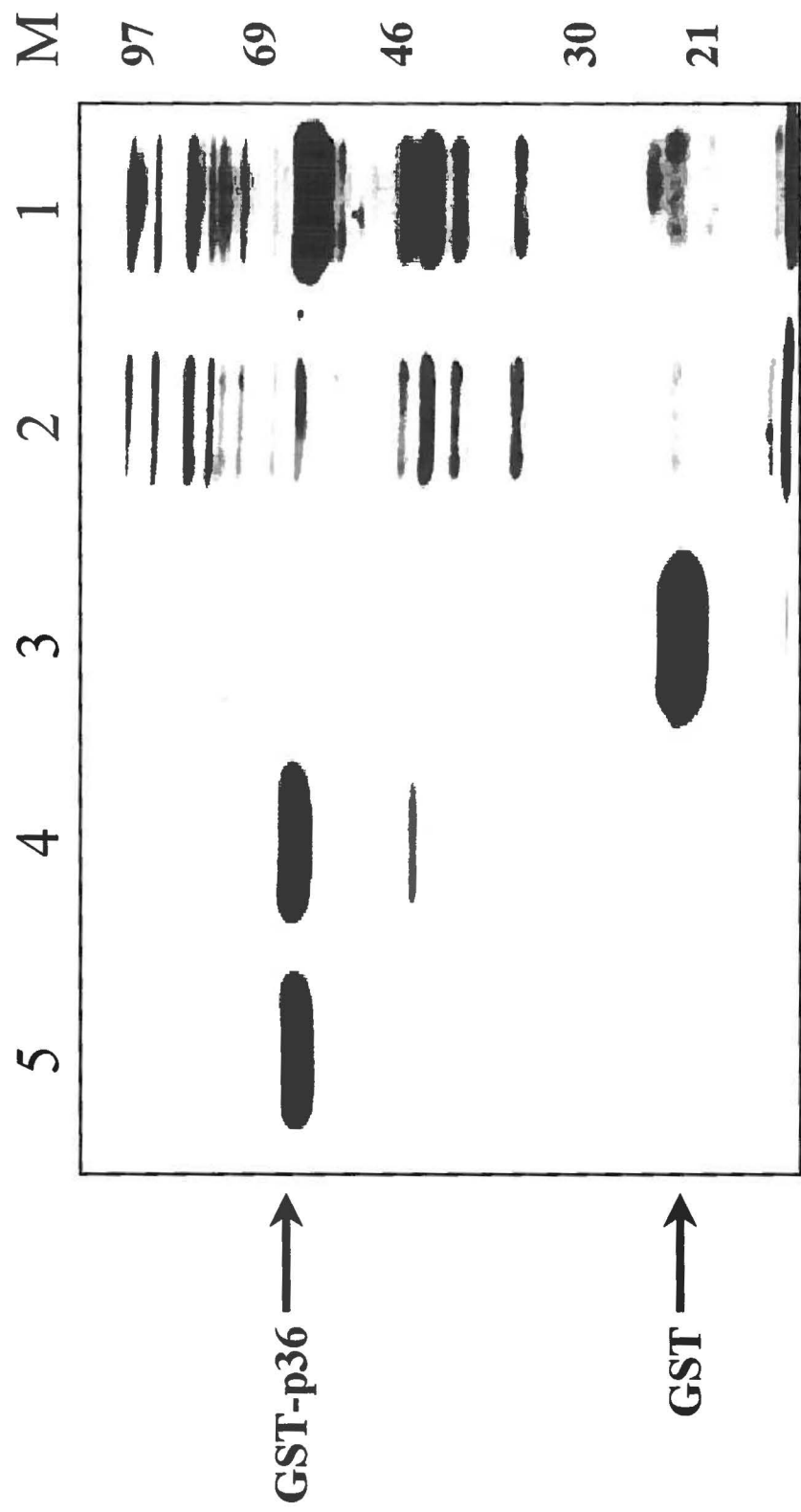


FIGURE 10: Reactivity by western immunoblotting of monospecific rabbit hyperimmune serum to the recombinant GST-p36 fusion protein prior (Lane 1) and after (Lanes 2 and 3) cleavage by thrombin. Lane M, low range molecular weight markers.

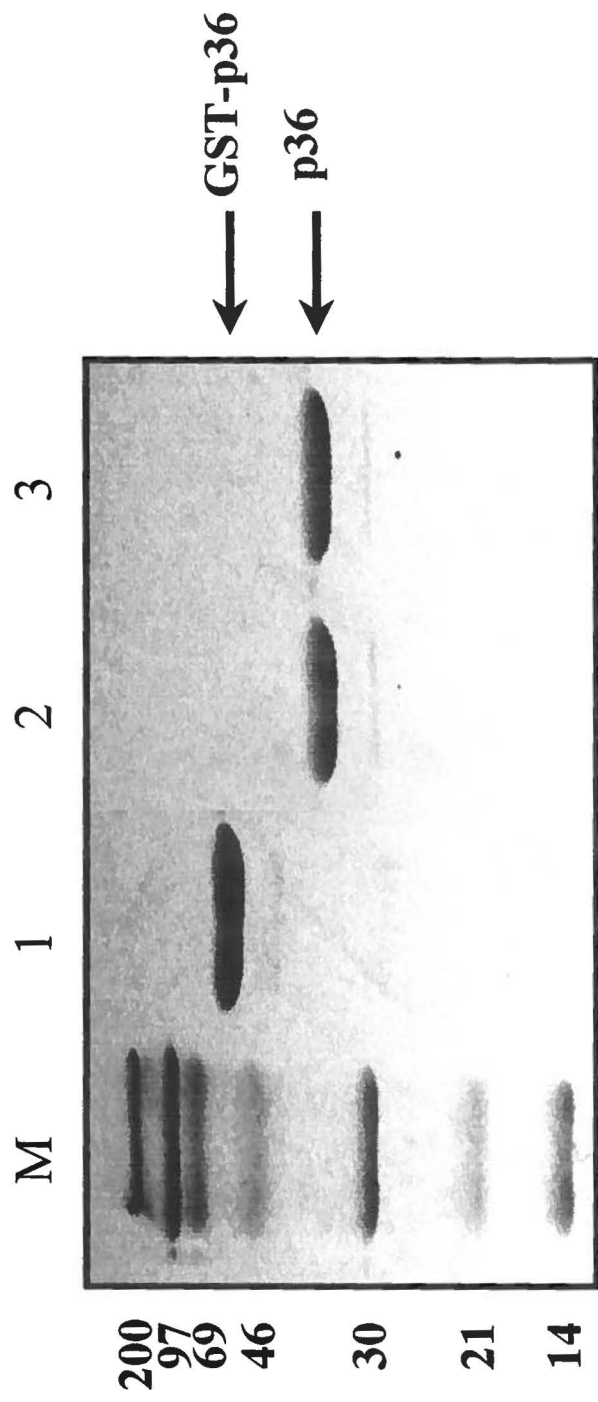
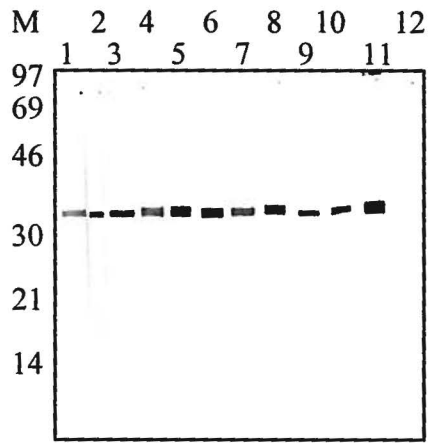
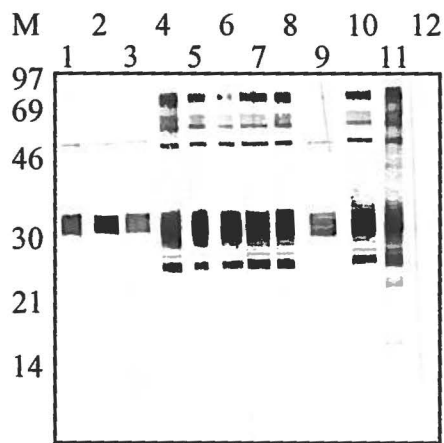


FIGURE 11: Reactivity of the anti-p36 MAbs against whole *M. hyopneumoniae* antigen (A) and against the cleaved recombinant p36 protein (B). Lanes 1, MAb 11C4; Lanes 2, MAb 13B2; Lanes 3, MAb 13B7; Lanes 4, MAb 13C9; Lanes 5, MAb 13G3; Lanes 6, MAb 15A3; Lanes 7, MAb 15C2; Lanes 8, MAb 15E10; Lanes 9, 15H3; Lanes 10, 15H3; Lanes 11, perfusion mouse serum; Lanes 12, normal mouse serum; Lanes 13, low range molecular weight markers.



A



B

FIGURE 12: Specificity of the anti-p36 MAbs as determined by Western immunoblotting. The anti-p36 MAbs were tested for their reactivity towards three reference *M. hyopneumoniae* strains and other mycoplasma species most commonly found in pigs. Lane 1, *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25934; Lane 2, *M. hyopneumoniae* strain J; Lane 3, *M. hyopneumoniae* strain ATCC 25095; Lane 4, *M. arginini*; Lane 5, *M. flocculare*; Lane 6, *M. hyorhinis*; Lane 7, *A. laidlawii*; Lane 8, *M. hyosynoviae*; Lane M, low range molecular weight markers.

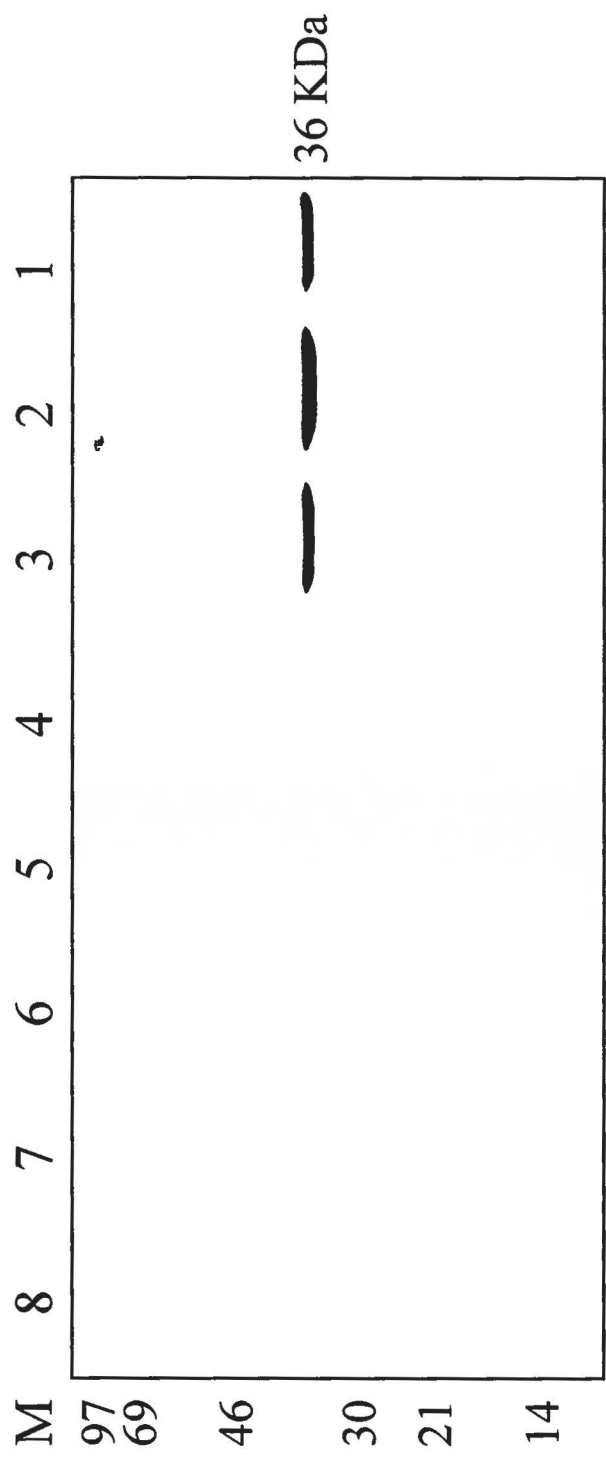
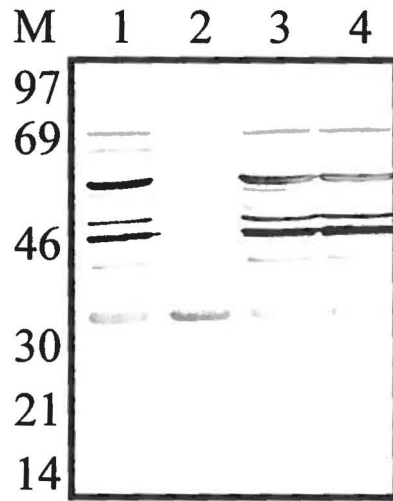
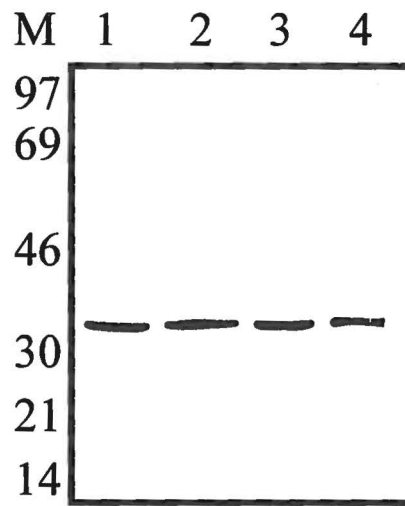


FIGURE 13: Reactivity patterns of hyperimmune porcine serum (A) and anti-p36 MAbs (B) towards the homologous and Quebec field strains of *M. hyopneumoniae*. Lanes 1, homologous strain ATCC 25934; Lanes 2 to 4, Quebec field isolates IAF-DM9827, IAF-20167-20, IAF-R202A. The sizes of the low range molecular weight markers indicated on the left.



A



B

FIGURE 14: Histological findings in the lungs of control (A) and experimentally-infected pigs (C) SPF-pigs. HPS staining.

A) Spongiform aspect of the lung as a normal pig showing clear airway passages (bronchioli and alveolar duct indicated by arrows) and well delineated interalveolar septae.

C) General aspect of the lung of a pig that has been infected with the IAF-DM9827 strain of *M. hyopneumoniae* with characteristic perivascular and peribronchiolar mononuclear cells infiltration. No damages were observed to the alveoli with only a mild mononuclear infiltration of the alveolar septae.

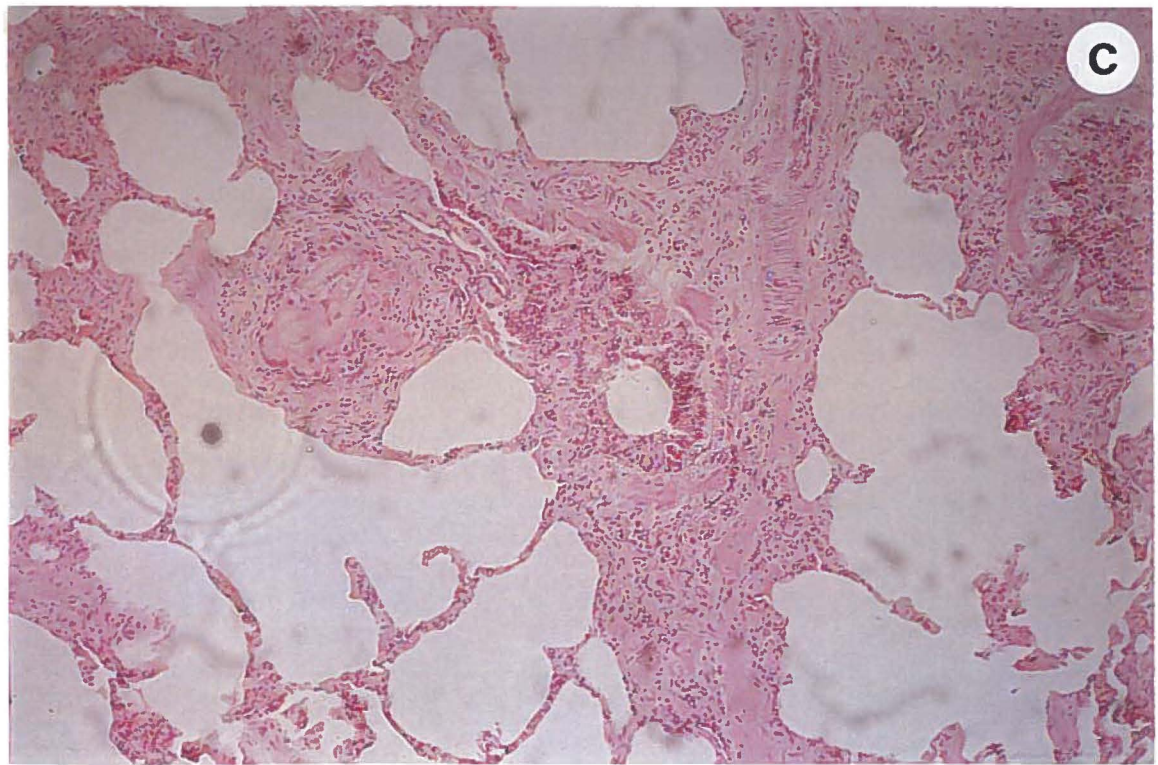
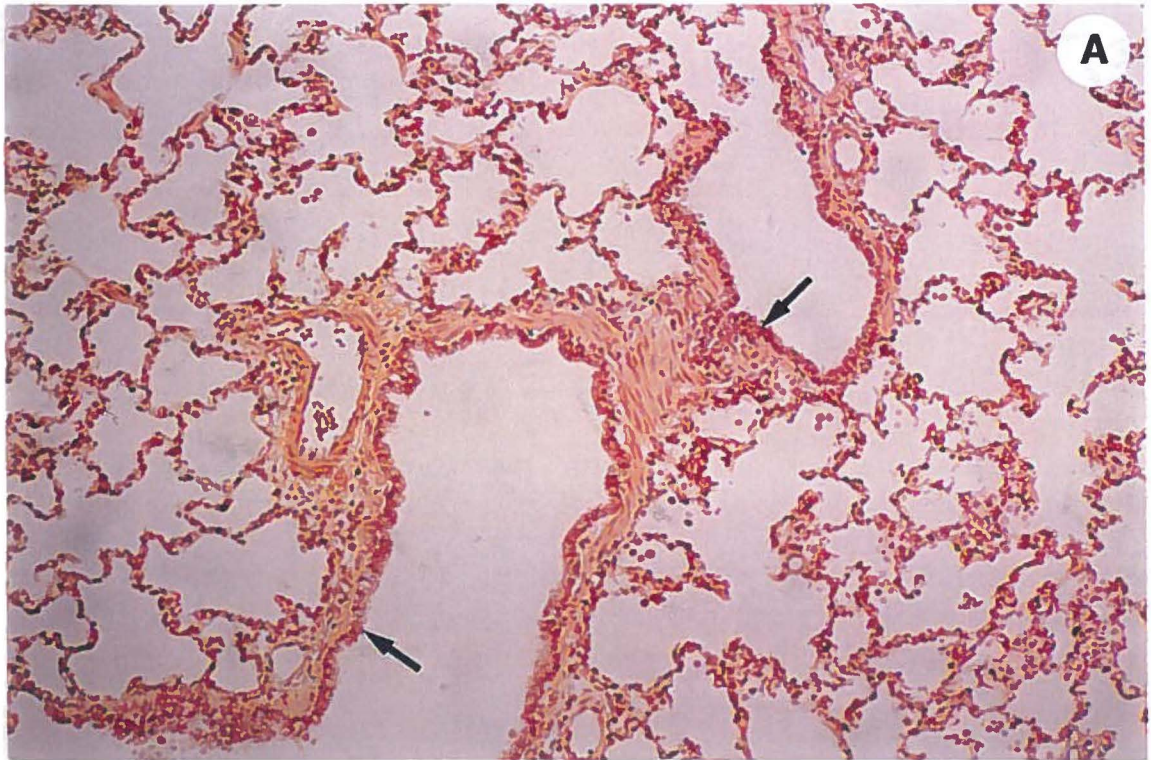


FIGURE 14: Histological findings in the lungs of control (B) and experimentally-infected pigs (D) SPF-pigs. HPS staining.

B) Normal appearance of a bronchioli

D) Peribronchiolar and perivascular accumulation of mononuclear cells with a mild hyperplasia of the bronchiolar epithelium.

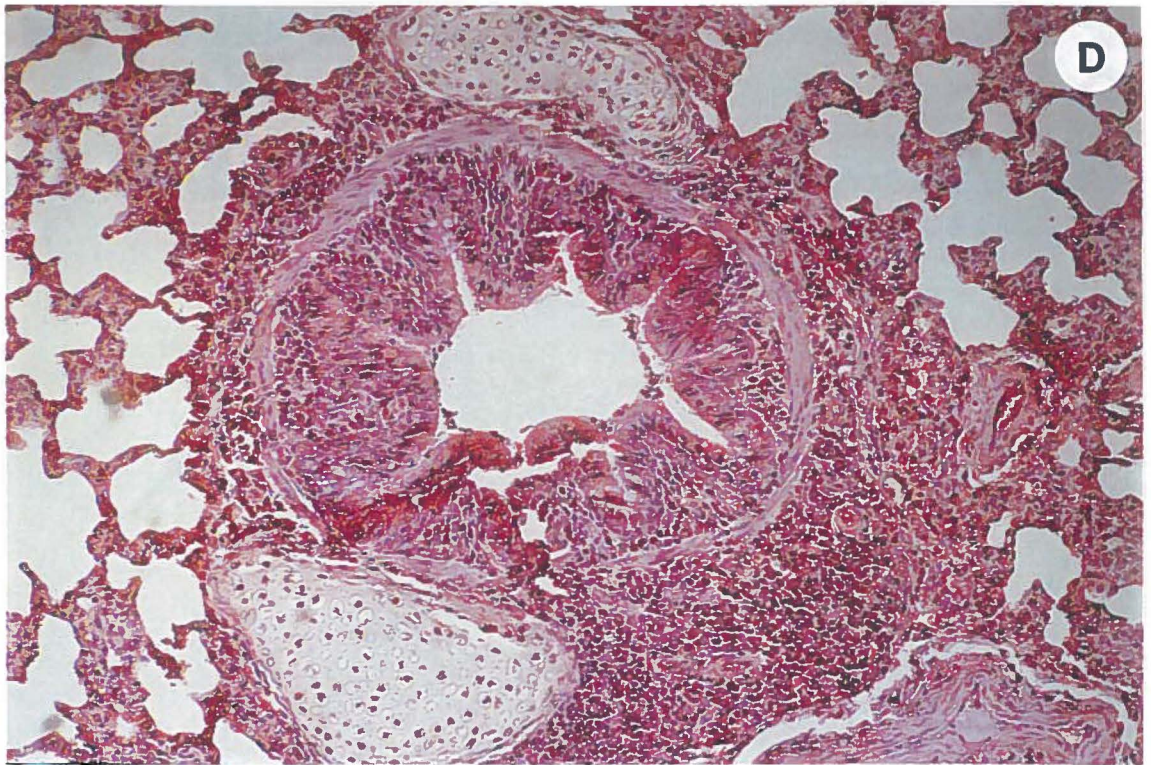
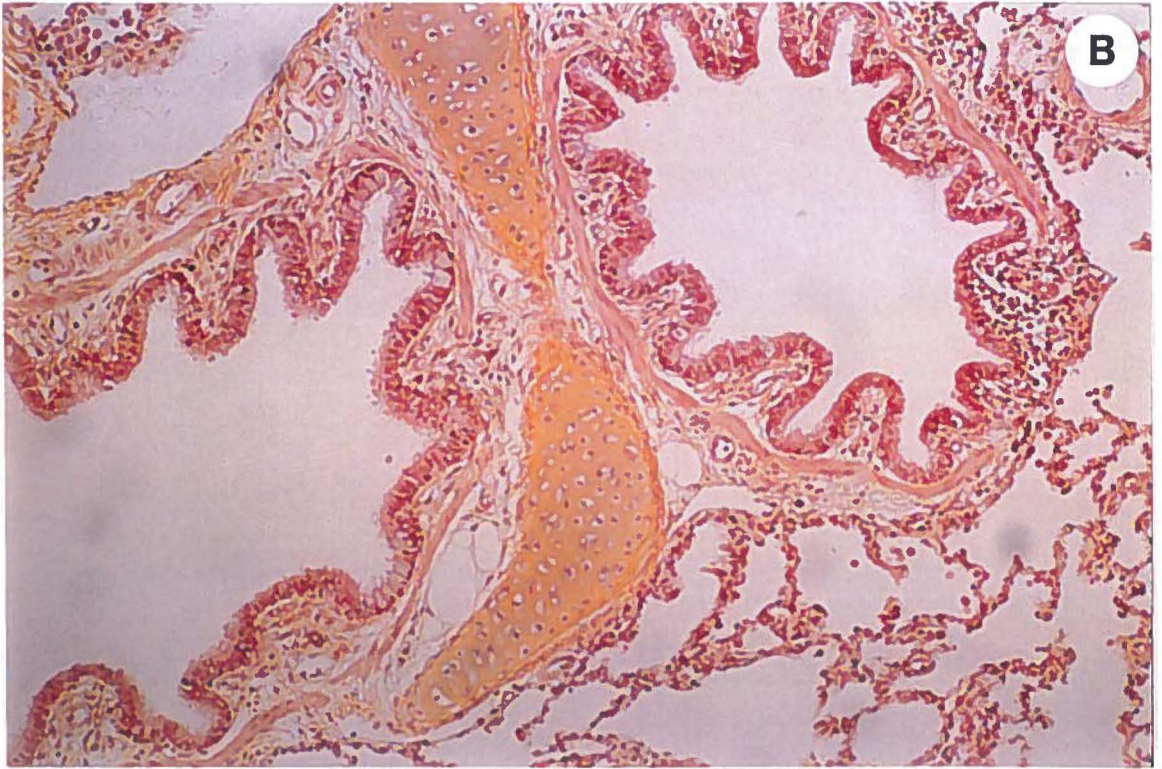
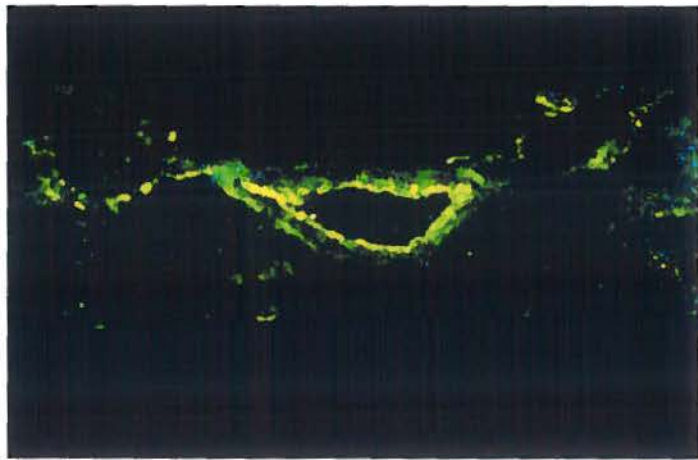


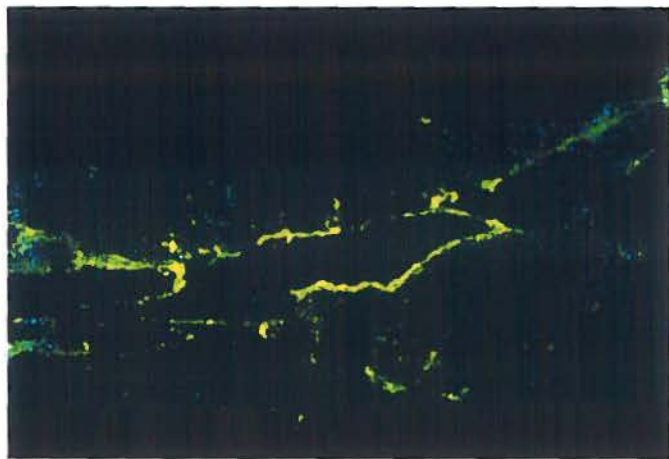
FIGURE 15: Immunofluorescent staining by anti-p36 MAbs of frozen sections of lungs from experimentally-infected pigs.

A) Fluorescence lining the bronchiolar epithelium.

B) Fluorescence lining the wall of alveolar ducts or small airways.



A



B

DISCUSSION GÉNÉRALE

La pneumonie enzootique est l'une des maladies les plus répandues dans les élevages de porcs à travers le monde. Cette maladie du système respiratoire occasionne des pertes économiques considérables chiffrées à plus de \$200 millions par année aux États-Unis seulement (Kobisch et Friis, 1996). Ce montant inclut les coûts des dommages occasionnés aux troupeaux (morbidité élevée, retards de croissance, un plus grand nombre d'infections opportunistes), des condamnations d'organes aux abattoirs, des traitements et des mesures de prophylaxie. L'agent étiologique de cette pneumonie est *Mycoplasma hyopneumoniae*, un microorganisme extrêmement fastidieux (Goodwin *et al*, 1965; Maré et Switzer, 1965). L'infection causée par *M. hyopneumoniae* peut-être difficile à dépister, étant donné l'inefficacité des méthodes de diagnostic présentement utilisées. Cette infection répond difficilement aux traitements puisque *M. hyopneumoniae* est résistant à plusieurs des agents antimicrobiens disponibles sur le marché (Yamamoto *et al*, 1986; Hannan *et al*, 1989; Ter Laak *et al*, 1991; Hannan *et al*, 1996). Les mesures de prévention sont généralement efficaces, mais dispendieuses, et ne préviennent pas les réinfections. De plus, aucun des vaccins présentement disponibles n'est très efficace pour prévenir la maladie ou la colonisation par *M. hyopneumoniae* des voies respiratoires supérieures (Thacker *et al*, 1998).

Étant donné l'importance de cet agent pathogène pour l'industrie de l'élevage des porcs et les problèmes engendrés par son omniprésence, le but de ce projet était de mettre au point des outils de diagnostic plus fiables à la disposition des vétérinaires praticiens et les éleveurs.

M. hyopneumoniae possède plusieurs protéines immunodominantes, incluant une protéine cytosolique (p36) (Strasser *et al*, 1991), deux protéines membranaires (p46 et p74) (Geary et Walczak, 1983; Mori *et al*, 1987), un facteur cytopathique (p54) (Geary et Walczak, 1985), quatre lipoprotéines de surface (p44, p50, p65 et p70) (Klinkert *et al*, 1985; Wise et Kim, 1987; Kim *et al*, 1990) et une adhésine (p97) (Zhang *et al*, 1995). Selon les informations disponibles dans la littérature, seules les deux protéines membranaires, soit la p46 et la p74, ont été utilisées comme antigènes dans des épreuves ELISA (Mori *et al*, 1987; Feld *et al*, 1992; Futo *et al*, 1995).

Lors de cette recherche, la valeur diagnostique de la protéine cytosolique p36 a été étudiée. Cette protéine a été ciblée pour plusieurs raisons: cette protéine est porteuse de déterminants antigéniques spécifiques à *M. hyopneumoniae*, elle est antigéniquement stable parmi les différents isolats de cette espèce et induit une réponse en anticorps précoce et spécifique chez les porcs naturellement et expérimentalement infectés (Stipkovits *et al*, 1991; Frey *et al*, 1994). En plus, la région génomique codant pour la p36 avait déjà été séquencée; étant donné l'absence de codons OPAL (TGA), représentant des signaux de terminaison chez *E. coli* et les cellules de mammifères, le produit de gène pouvait donc être exprimé en entier sans avoir recours à la mutagenèse (Strasser *et al*, 1991). Quelques études ont démontré que les mycoplasmes s'adaptent facilement à leur environnement et ont développé des mécanismes leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte ou l'action toxique des antibiotiques. Ces mécanismes résultent le plus souvent à des mutations de leurs protéines majeures (Rosengarten et Wise, 1990; Bové, 1993; Baseman et Tully, 1997; Citti *et al*, 1997). *M. hyopneumoniae* ne fait pas exception; deux publications ont démontré la présence de séquences répétées dans le génome du microorganisme, lui permettant de varier sa séquence génomique, probablement pour maximiser sa capacité de codage (Ferrell *et al*, 1989; Harasawa *et al*, 1995). En plus, des publications plus récentes ont démontré la présence de séquences répétées de 1 à 9 nucléotides au niveau du gène codant pour l'adhésine, soit la protéine p97 (Wing *et al*, 1997; Wilton *et al*, 1998). Le nombre de ces régions exprimées affecte la virulence de *M. hyopneumoniae*. Par contre, les études sur la p36, associée à une activité lactate déshydrogénase (Haldimann *et al*, 1993) jouant un rôle important dans la glycolyse qui est une rare voie métabolique fonctionnelle chez ce mycoplasme, ont démontré que la région génomique codante était relativement stable chez les différents isolats de *M. hyopneumoniae*.

Depuis le début des années 1990, la PCR est devenue une méthode de choix pour diagnostiquer les infections à mycoplasmes (Bernet *et al*, 1989; Tola *et al*, 1996; Wang *et al*, 1997; Dorigo-Zetsma *et al*, 1999). La première partie de ce projet consistait à développer une technique utilisant la réaction de la polymérase en chaîne (PCR) pour

amplifier des fragments ou le gène entier codant pour la p36, soit un gène d'une longueur de 948 pb, à partir de différents types de spécimens cliniques.

Les amorces FSp36 et RSp36 ont été synthétisées en tenant compte de la séquence du gène de la p36 disponible dans la banque de données GenBank (Haldimann *et al*, 1993). La souche de référence ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae* a été mise en culture et l'ADN génomique en a été extrait par la méthode décrite par Dallo et collaborateurs (1989). Par la suite, les conditions de PCR ont été établies, et le gène amplifié de la p36 a été séquencé. La sensibilité des amorces a été déterminée et des réactions positives ont pu être obtenues à partir de préparations contenant aussi peu que 0,5 ng d'ADN chromosomique. Certaines protéines possèdent des déterminants antigéniques partagés par les différents mycoplasmes porcins, notamment *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* et *M. flocculare*, d'où des problèmes de réactions croisées pouvant entraver la valeur des résultats des tests diagnostiques (Amanfu *et al*, 1984; Freeman *et al*, 1984). Donc, dans une deuxième étape, la spécificité des amorces contre la p36 de *M. hyopneumoniae* a été vérifiée. Les différentes espèces de mycoplasmes retrouvées chez les porcs ont été cultivées et leur ADN génomique extrait. L'ARN et l'ADN de virus et d'autres bactéries associés aux problèmes respiratoires porcins ont aussi été extraits en utilisant la trousse Trizol™(Gibco) et les techniques d'extraction par bouillotte et celle décrite par Dallo, respectivement. Aucun produit d'amplification n'a été obtenu lorsque les amorces FSp36 et RSp36 ont été testées avec les acides nucléiques de tous ces autres agents pathogènes du porc. Les amorces amplifiant le gène de la p36 se sont donc avérées spécifiques à *M. hyopneumoniae*, tel que prévu selon la comparaison des séquences de ce dernier; conséquemment, aucune réaction génomique croisée ne devrait interférer avec la valeur des résultats de diagnostic effectué sur des cas cliniques.

Étant donné la grande quantité de collagène dans les poumons, les méthodes d'extraction d'ADN employées aux premières étapes de cette recherche n'étaient pas satisfaisantes pour obtenir une quantité suffisante d'ADN purifié. La trousse TriPure™ (Boehringer Mannheim), comprenant une solution de thiocyanate de guanidine et de phénol pour l'extraction d'ADN, d'ARN et de protéines dans une même incubation

initiale, a été utilisée avec succès sur des homogénats de poumons. Toutes les manipulations ont pu être réalisées facilement dans un délai d'une journée, et l'ADN obtenu s'est avéré très pur, ne comprenant aucun contaminant pouvant interférer avec la réaction d'amplification enzymatique. Par la méthode de PCR, il a été possible d'amplifier le gène de la p36 dans tous les poumons possédant des lésions caractéristiques de la pneumonie enzootique porcine. Aucune amplification n'a été observée lorsque l'ADN avait été extrait d'homogénats de poumons apparemment sains; donc, aucun résultat faux-positif n'a été obtenu. Une bonne corrélation a donc été obtenue avec la présence de signes cliniques chez les porcs testés.

L'efficacité de la PCR-p36 a aussi été évaluée sur d'autres spécimens cliniques, soient des écouvillons trachéobronchiolaires et nasaux. L'ADN de ces spécimens a aussi été extrait en utilisant la trousse TriPure™ et en parallèle par la méthode de Dallo (1989). La méthode "bouillotte" a aussi été utilisée dans le cas des écouvillons nasaux. Pour ce qui est des écouvillons trachéobronchiolaires qui avaient été prélevés à l'abattoir, tous les cas où des lésions pulmonaires avaient été observées se sont avérés positifs par la technique PCR-p36. Aucune réaction d'amplification n'a été obtenue dans le cas des cinq spécimens provenant de porcs sains, ce qui démontre l'absence de faux-positifs. Ce type d'échantillons cliniques pourraient aussi être prélevés chez des animaux vivants, ce qui serait beaucoup plus approprié si on veut utiliser la PCR comme méthode de diagnostic pour les fins de surveillance des troupeaux. D'autres études ont démontré la détection par PCR de *M. hyopneumoniae* dans des spécimens cliniques venant d'animaux vivants. Baumeister et collaborateurs (1998) ont utilisé leur technique PCR sur des lavages bronchoalvéolaires. Leur test était très spécifique et sensible et leurs résultats correspondaient à ceux obtenus par un test d'immunofluorescence. Par contre, ils avaient dû anesthésier les porcs, et le risque de mortalité en cours d'anesthésie n'est pas négligeable (Charley *et al*, 1980; Van Leengaed et Kamp, 1989; Ganter *et al*, 1990). Abiven et Pommier (1993) ont mis au point une technique de lavage trachéobronchique chez les porcs vivants non anesthésiés. Blanchard et collaborateurs (1996) ont essayé leur technique PCR avec succès sur ce type de lavages. Selon leur méthode, une bonne corrélation a été obtenue avec les résultats d'un test d'immunofluorescence sur coupes

congelées de poumons, mais la PCR s'est avérée généralement plus sensible. Ces lavages ont été faits sur un nombre limité d'animaux infectés expérimentalement et, malgré les résultats prometteurs, peu de vétérinaires ou de producteurs ont de l'expérience dans ce genre de manipulation, qui n'est probablement pas pratique dans un élevage contenant plus d'une centaine de porcs.

Pour ce type d'infection, les écouvillons nasaux seraient certainement les spécimens les plus faciles à obtenir de porcs vivants non anesthésiés. Plus de cent échantillons ont été testés par notre technique PCR amplifiant le gène de la p36, mais les résultats ont toujours été négatifs ou, quelques fois, faiblement positifs, même lorsque les écouvillons provenaient d'animaux avec des problèmes respiratoires. Pour s'assurer que la méthode d'extraction n'était pas fautive, l'ADN génomique des écouvillons nasaux a été extrait de trois façons différentes, soit par la méthode "bouillotte", la méthode décrite par Dallo (1989) et par la trousse TriPure™. Une cinétique de détection de *M. hyopneumoniae* dans des écouvillons nasaux a été entreprise lors d'une infection expérimentale. L'ADN du mycoplasme a pu être amplifié jusqu'à deux semaines post-infection seulement. Mattsson et collaborateurs (1995) ont obtenu des résultats similaires avec leur méthode PCR, un seul porc sur cinq était positif pour *M. hyopneumoniae* après trois semaines post-infection. Dans une étude plus récente (Calsamiglia et al, 1999), les auteurs ont démontré la présence de l'agent pathogène dans 50 % des porcs en utilisant plutôt l'approche "nested" PCR. Aucune période de temps post-infection n'a été mentionnée dans l'article. Tous ces résultats suggèrent que *M. hyopneumoniae* est présent en faible quantité au niveau des cavités nasales et pour une période de temps limitée.

L'efficacité de la PCR multiplex a été démontrée pour la détection d'autres pathogènes animaux à partir de spécimens cliniques (Henegariun *et al*, 1997; Wang *et al*, 1997; Choppa *et al*, 1998; Lo *et al*, 1998; Ouardani *et al*, 1999). Cette approche augmente la spécificité mais aussi la sensibilité du diagnostic, éliminant les possibilités d'obtenir des résultats faux-positifs. Contrairement au "nested" PCR, la méthode PCR multiplex est réalisée en une seule étape tout comme une réaction d'amplification simple, ce qui contribue à ne pas augmenter les probabilités de contamination. Dans notre étude,

une approche multiplex a été employée pour l'amplification simultanée de l'ADN du gène de la p36 total (948 pb) et d'un fragment interne du gène de la p46, soit un fragment de 580 pb. La p46 est une protéine membranaire spécifique à *M. hyopneumoniae*, suscitant une réponse immunitaire très hâtive chez les porcs. Des anticorps spécifiques à la p46 ont été observés deux semaines post-infection (Mori *et al*, 1987). Les amorces de la p46 ont aussi été testées pour leur absence de réactivité envers les autres mycoplasmes et microorganismes associés aux maladies respiratoires porcines. Ces amorces étaient moins sensibles que celles de la p36, n'amplifiant que 50 pg d'ADN génomique, mais utilisées en PCR simple, plus de 90 % des cas avec des lésions pulmonaires ont été amplifiés. Comme prévu, aucun résultat faux-positif n'a été obtenu. Dans le cas de la PCR multiplex, à partir des cas originalement testés positifs avec la PCR-p46 simple (86,6 %), une double amplification a été obtenue pour 100 % de ces derniers, et les signaux d'amplification étaient plus intenses sur gel d'agarose. Aucun des 2 amplicons n'a été obtenu lorsque l'ADN provenait de poumons apparemment sains. La PCR multiplex s'est avérée un peu moins sensible que la PCR-p36 simple. Toutefois, étant donné que l'amplification simultanée de 2 régions génomiques augmentent la spécificité de la PCR, l'approche multiplex devrait être considérée dans le cas d'échantillons cliniques fortement contaminés par d'autres mycoplasmes ou bactéries. Les résultats obtenus par cette technique confirmeront définitivement une infection causée par *M. hyopneumoniae* en éliminant toute possibilité de réactions croisées, d'autant plus que les régions génomiques sélectionnées, soit les gènes p36 et p46, ont déjà été reconnues comme étant spécifiques d'espèces (Mori *et al*, 1988; Stipkovits *et al*, 1991), ce qui a aussi été démontré dans la présente étude.

M. hyorhinis est un agent opportuniste envahissant le tractus respiratoire inférieur des porcs et qui contamine fréquemment les cultures de *M. hyopneumoniae* (Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Il est aussi associé au complexe étiologique de la pneumonie chez les porcelets (Friis, 1971). Pour pouvoir confirmer la présence d'une infection mixte par ces deux mycoplasmes au niveau des poumons, ou pour vérifier la contamination des cultures de *M. hyopneumoniae* par *M. hyorhinis*, des amorces amplifiant un fragment interne du gène p37 de *M. hyorhinis* ont été synthétisées. Le gène p37 partage des

séquences communes avec *M. hyopneumoniae* et *M. flocculare*; conséquemment, des amorces ont dû être choisies de façon à ne permettre l'amplification d'un fragment de 346 pb spécifique à *M. hyorhinis*. Comme prévu, les amorces sélectionnées n'ont amplifié aucun fragment à partir des préparations purifiées d'ADN de *M. hyopneumoniae* et autres mycoplasmes et bactéries testés. Les mêmes conditions préconisées pour la PCR-p36 ont été utilisées. L'utilisation en parallèle des réactions PCR-p36 et PCR-p37 ont permis de conclure à la présence d'une infection mixte dans plus de 16.6 % des échantillons cliniques analysés et, lors des essais de culture, *M. hyorhinis* s'est avéré un contaminant fréquent entravant la plupart du temps la culture de *M. hyopneumoniae*.

La deuxième partie de cette recherche consistait au développement d'un test immunohistochimique pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae*. Une technique d'immunofluorescence indirecte basée sur des anticorps monoclonaux, anti-p36, a été utilisée. La souche ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae* a été mise en culture et son ADN génomique a été extrait par la méthode de Dallo. À partir de cet ADN, le gène de la p36 a été amplifié (948 pb), séquencé, cloné dans le vecteur pGEX-4T-1 et exprimé sous forme de protéine de fusion avec la glutathione S-transférase (GST). La protéine de fusion GST-p36 purifiée par chromatographie d'affinité a été digérée par la thrombine ce qui a permis d'éliminer la portion GST. Ce système d'expression a souvent été utilisé pour la production de protéines bactériennes et mycoplasmales recombinantes pures et en grande quantité. Parmi les avantages de ce système d'expression, ceux qui ont influencé notre choix sont les conditions de purification de la protéine de fusion n'affectant généralement pas la virulence et la fonction des protéines exprimées, le promoteur inductible à l'IPTG, la présence d'un site de restriction reconnu par la thrombine et le fait que les porcs n'ont pas d'anticorps anti-GST puisqu'ils ne sont pas sujets à l'infection par le trématode *Schistosoma japonicum*. (Smith *et al*, 1988; Nakano *et al*, 1993).

Les profils électrophorétiques ont démontré que la GST-p36 a été obtenue en grande quantité et qu'elle était très pure. Il n'y avait aucune trace apparente de protéines bactériennes après la dernière étape de purification. La p36 seule a été obtenue après une incubation d'une nuit avec la thrombine et aucun produit non coupé n'a été observé. La

protéine recombinante s'est avérée d'une grande stabilité car après plus de 6 mois, seulement une très faible bande de dégradation a pu être observée par électrophorèse sur gels de SDS-polyacrylamide. Ce faible niveau de dégradation n'a pas affecté les expériences subséquentes.

La p36 clivée a servi pour l'immunisation de souris BALB/c et, après quatre injections, la réponse immune spécifique était assez intense pour poursuivre avec l'expérience de fusion. Neuf hybridomes, sécrétant des anticorps anti-p36 donnant des valeurs A_{450} supérieures à 1.20 par ELISA, ont été obtenus. Après clonage par la méthode de "dilution limite", ces hybridomes ont été injectés à des souris pristanées en vue de la production de liquides d'ascite. Les clones étaient toxiques puisque plusieurs souris sont mortes avant la première récolte du liquide, dix jours plus tard. Malgré ces mortalités, des quantités suffisantes de liquides d'ascite ont été récoltées. Ces AcMo ont été isotypés et les résultats ont démontré qu'ils appartenaient tous à la sous-classe IgG1 possédant la chaîne légère κ .

Par immunobuvardage de type Western, les surnageants de culture et les liquides d'ascite ont tous réagi avec une forte intensité contre la p36 linéaire coupée et la protéine native présente dans les homogénats de *M. hyopneumoniae*. Par ELISA et immunobuvardage, aucun de ces AcMo n'a démontré de réactivité envers les autres espèces de mycoplasme retrouvées chez le porc, une réponse positive n'ayant été obtenue qu'avec les trois souches de référence de *M. hyopneumoniae*. Ces AcMo se sont donc avérés spécifiques à *M. hyopneumoniae*, ce à quoi nous nous attendions étant donné la spécificité des amorces FSp36 et RSp36 ayant été utilisées pour l'amplification du gène et les résultats obtenus antérieurement par d'autres auteurs (Stipkovits *et al*, 1991).

Quelques isolats de champs de *M. hyopneumoniae* ont été cultivés dans le laboratoire. Par PCR, aucune contamination par *M. hyorhinis* n'a été détectée et la présence de p36 a été démontrée pour chacun des isolats. Les sérums hyperimmuns de souris et de porc ont été utilisés pour confirmer la présence de p36 chez ces isolats par immunobuvardage de type Western. La réactivité des AcMo anti-p36 envers ces isolats a

été vérifiée par ELISA et immunobuvardage. Les AcMo ont réagi contre ces trois isolats, suggérant que les anticorps sont dirigés contre le même épitope ou des épitopes localisés dans des régions avoisinantes apparemment très bien conservées chez les isolats de *M. hyopneumoniae*. Les résultats de l'épreuve ELISA de compétition, adaptée de Yang et collaborateurs (1999), étaient aussi en accord avec cette hypothèse.

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte sur coupes de poumons congelés est souvent utilisée pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae* et pour les fins de comparaison avec d'autres tests (Amanfu *et al*, 1984; Freeman *et al*, 1984; Ross, 1992; Kobisch et Friis, 1996). Cette épreuve est rapide, sensible et permet l'observation histopathologique des poumons en plus de la mise en évidence de la présence d'antigènes de *M. hyopneumoniae*. Par contre, l'utilisation de sérums polyclonaux réduit de beaucoup la spécificité de cette épreuve en augmentant les résultats faux-positifs. En effet, ces sérums polyclonaux peuvent réagir non spécifiquement avec les antigènes d'autres microorganismes avec lesquels les porcs auraient été en contact, surtout avec *M. hyorhinis* et *M. flocculare* qui sont des agents envahisseurs des voies respiratoires inférieures porcines et qui partagent certains de leurs déterminants antigéniques avec *M. hyopneumoniae* (Amanfu *et al*, 1984; Freeman *et al*, 1984).

Les AcMo dirigés contre la p36 ont été utilisés pour détecter la présence de *M. hyopneumoniae* dans des poumons provenant de porcs expérimentalement infectés à l'aide d'une souche Québécoise de *M. hyopneumoniae*, IAF-DM9827, cultivée dans le laboratoire. Lors de la nécropsie, les lésions typiques ont été observées au niveau des lobes apical et cardiaque des poumons. L'examen histopathologique a révélé la présence d'une infiltration péribronchiolaire et périvasculaire par des cellules lymphomonocytaires, accompagnée d'une légère hyperplasie des cellules épithéliales des bronches et des bronchioles. Lorsqu'il y avait des lésions, la présence d'antigènes de *M. hyopneumoniae* pouvait être détectée, la réaction de fluorescence étant limitée aux cellules épithéliales délimitant les bronches, les bronchioles et les conduits alvéolaires. Aucune fluorescence n'a été observée dans les débris cellulaires présents dans la lumière de ces voies aériennes, ni dans les muqueuses et lamina propria avoisinantes, incluant les

alvéoles et septae interalvéolaires. Ces résultats étaient attendus car *M. hyopneumoniae* est un agent pathogène extracellulaire (Tully, 1995). L'immunofluorescence sur coupes congelées n'a pas permis de différencier les détails des coupes histologiques, mais a permis de bien démontrer l'association entre *M. hyopneumoniae* et les cellules épithéliales. Aucune fluorescence n'a été observée lorsque ces mêmes coupes de poumons infectés ont été incubées en présence de sérum normal de souris ou lorsque des coupes de poumons normaux ont été incubées avec les AcMo anti-p36. Ces résultats indiquent que la fluorescence était due à la présence de *M. hyopneumoniae* et n'était pas un artefact de manipulation ou une fluorescence non spécifique. Le fait que les AcMo anti-p36 ne réagissent que contre *M. hyopneumoniae* élimine les risques de détection de faux réacteurs, tels qu'observés avec les anticorps polyclonaux.

La technique d'immunofluorescence indirecte basée sur les AcMo dirigés contre la p36 est une méthode rapide et spécifique. Par contre, comme il a été observé avec les antisérums polyclonaux, l'intensité de la fluorescence, et en conséquence la sensibilité de la technique, augmente avec la sévérité des lésions. L'efficacité de la technique devra être évaluée sur des coupes de poumons provenant de porcs infectés de façon naturelle avant d'être utilisée pour les fins de diagnostic de routine. Dans le cas de spécimens cliniques, la présence d'infections secondaires et la mauvaise conservation des tissus pourraient interférer avec l'efficacité de l'épreuve d'immunofluorescence indirecte.

Pour fin de comparaison de l'efficacité des deux techniques de diagnostic développées au cours de cette étude, quinze des trentes poumons positifs pour *M. hyopneumoniae* par PCR ont été mis en culture. Le milieu de culture utilisé était celui décrit par Friis (1975), contenant 20 % de sérum porcin. Des passages ont été faits à chaque trois ou quatre jours, en diluant entre chaque passage la culture d'un facteur de 1:3. *Mycoplasma hyopneumoniae* étant un organisme fastidieux, seulement douze isolats cliniques sur quinze ont pu être cultivés "in vitro" en bouillons de culture. La croissance de mycoplasmes se traduisait par une légère acidification du bouillon et une augmentation de sa turbidité. Dans certains cas, presque deux mois d'incubation à 37°C sans agitation ont été nécessaires avant que l'on puisse confirmer l'isolement de *M.*

hyopneumoniae. Huit de ces douze isolats ont poussé en dedans d'une période de 3 semaines, mais l'une de ces souches était contaminée par *M. hyorhinis*. Dans quelques cas, il n'a été possible d'isoler que *M. hyorhinis*, bien que les poumons étaient initialement négatifs pour la présence de *M. hyorhinis* par PCR. Ces résultats indiquent que malgré le nombre négligeable de cellules de *M. hyorhinis* initialement présent dans les poumons, non détectables par PCR, ce microorganisme requiert des conditions de croissance beaucoup moins exigeantes que *M. hyopneumoniae*. Sa présence peut éventuellement interférer avec la culture de *M. hyopneumoniae*, d'où la technique d'isolement en bouillon de culture s'avère un outil de diagnostic beaucoup moins spécifique et sensible que la PCR ou l'immunofluorescence. De plus, les colonies sur géloses sont difficiles à obtenir et celles-ci sont souvent contaminées par les colonies d'autres bactéries. Le repiquage, pour obtenir des colonies de *M. hyopneumoniae* isolées, est difficile car ceci nécessite l'observation sous un microscope; les colonies de *M. hyopneumoniae* sont le plus souvent pléomorphes et de taille relativement petite comparativement à celles de *M. hyorhinis*.

En conclusion, les deux techniques développées dans cette recherche pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae* sont des méthodes rapides et spécifiques. Aucune réaction croisée n'a été observée avec la PCR ou l'immunofluorescence indirecte. Ce sont des méthodes fiables, donnant des résultats reproductibles et correspondant à ceux obtenus par l'épreuve ELISA de DAKO qui est basée sur la détection d'anticorps contre la protéine membranaire p74 (Feld *et al*, 1992). Par contre, la détection de *M. hyopneumoniae* par PCR demeure une méthode plus sensible que celle d'immunofluorescence, des réponses positives ayant été obtenues même lorsqu'il y avait peu de lésions pulmonaires.

De plus, les AcMo anti-p36 obtenus au cours de cette étude pourraient s'avérer très utiles pour confirmer l'identification sérologique des souches isolées en milieu de culture. En effet, par la technique d'immunobuvardage, il a été démontré qu'aucun de ces AcMo ne réagissaient contre les mycoplasmes autres que *M. hyopneumoniae*. Ces AcMo

anti-p36 pourront ainsi confirmer l'identification sérologique des isolats sauvages, ce qui n'est pas le cas des antisérums polyclonaux présentement utilisés.

Pour ce qui est des perspectives d'avenir, l'une des principales avenues serait de comparer la réactivité des sérums d'animaux convalescents ou malades vis-à-vis la p36 recombinante exprimée chez *E. coli*, exprimant la protéine sous forme linéaire, versus celle obtenue contre la protéine p36 exprimée dans un système eucaryote, comme l'adénovirus ou le baculovirus, où la conformation de la molécule serait mieux conservée. La conformation de la p36 est probablement importante pour son rôle lors de l'établissement de l'infection par *M. hyopneumoniae* et pour sa reconnaissance par les anticorps sériques. D'autres tests sérologiques, comme une épreuve ELISA, pourraient être développés en utilisant une protéine recombinante exprimant les épitopes dépendant de la conformation contre lesquels sont plutôt dirigés les anticorps produits chez les porcs infectés. Une alternative ou une autre possibilité serait de développer une sonde moléculaire à partir de la séquence de p36 pour détecter la présence du gène dans les tissus par hybridation *in situ*.

Présentement, l'amplification par PCR du gène de la p36 pour le diagnostic de *M. hyopneumoniae* est offert à l'Institut Armand-Frappier sur des homogénats de poumons. Le diagnostic pourrait aussi être fait sur des lavages trachéaux ou des écouvillons trachéobronchiolaires et nasaux, en modifiant certains paramètres pour augmenter la sensibilité de la technique. Par contre, la détection de l'ADN de *M. hyopneumoniae* dans les écouvillons nasaux pourraient provenir de microorganismes morts ou dégradés; donc, le test ne détecterait pas nécessairement une infection active. Éventuellement, la PCR amplifiant le gène de la protéine p36 pourrait être utilisé comme méthode de surveillance pour la présence de *M. hyopneumoniae* dans les troupeaux de porcs. Une double fonction de la PCR serait de prévenir une infection endémique dans un élevage, soit en éliminant ou en séquestrant les animaux malades ou porteurs de l'infection avant qu'ils ne puissent transmettre la bactérie aux autres porcs. La PCR est une technique qui pourrait être utilisée comme outil de diagnostic dans des programmes d'épidémiosurveillances.

BIBLIOGRAPHIE

- Abiven, P., Blanchard, B., Saillard, C., Kobisch, M., Bové, J. M. 1992. A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally-infected piglets. *Mol Cell Probes* **6**: 423-429.
- Abiven, P., Pommier, P. 1993. Technique de lavage trachéobronchique par voie transnasale pour la détection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié. *Vet Res* **24**: 515-522.
- Ahrens, P., Friis, N. F. 1991. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* with a DNA probe. *Letters in Applied Microbiology* **12**:249-253.
- Alexander, T. J. L., Thornton, K., Boon, G., Lysons, R. J., Gush, A. F. 1980. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet Rec* **106**:114-119.
- Amanfu, W., Weng, C. N., Ross, R. F., Barnes, H. J. 1984. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *Am J Vet Res* **45**:1349-1352.
- Armstrong, C. H. 1976. A diagnostically practical approach to isolating and identifying mycoplasmas of porcine origin. *Proceedings, Annual Meeting of the Am. Assoc. of Vet. Lab. Diagnosticians*.
- Armstrong, C. H., Freeman, M. J., Sands-Freeman, L. 1987. Cross-reactions between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* practical implications for the serodiagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. *Isr. J. Med. Sci.* **23**: 654-656.
- Artiushin, S., Stipkovits, L., Minion, F. C. 1993. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Cell Probes* **7**: 381-385.
- Artiushin, S., Minion, F. C. 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**(1): 324-328.
- Baseman, J. B. 1993. The cytoadhesins of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. In: Rottem S, Kahane I. Ed. *Subcellular biochemistry*. New York: Plenum Press, 243-259.
- Baseman, J. B., Reddy, S. P., Dallo, S. F. 1996. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:S137-144.
- Baseman, J. B., Tully, J. G. 1997. Mycoplasmas; sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging infectious Diseases* **3**(1):21-32.

- Baumeister, A. K., Runge, M., Ganter, M., Feenstra, A. A., Delbeck, F., Kirchhoff. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**(7): 1984-1988.
- Bej, A. K., Mahbubani, M. H., Atlas, R. M. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their application. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26**:301-334.
- Bereiter, M., Young, T. F., Joo, H. S., Ross, R. F. 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet. Microbiol.* **25**: 177-192.
- Bernet, C., Garret, M., de Barbeyrac, B., Bebear, C., Bonnet, J. 1989. Detection of *mycoplasma pneumoniae* using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**(11):2492-2496.
- Blanchard, B., Kobisch, M., Bové, J. M., Saillard, C. 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Probes* **10**: 15-22.
- Blanchard, B., Saillard, C., Kobisch, M., Bové, J. M. 1996. Analysis of putative ABC transporter genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* **142**: 1855-1862.
- Bölske, G., Johansson, K. E., Strandberg, M. L., Bergrström, K. 1987. Species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* and cross reactions with other porcine mycoplasmas. *Curr. Microbiol.* **15**:233-239.
- Bové, J. M., Carle, P., Garnier, M., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C. 1989. Molecular and cellular biology of spiroplasmas. In: *The mycoplasmas*, vol. V, R. F. Whitcomb and J. G. Tully eds, Academic Press, Inc., New York, 243-364.
- Bové, J. M. 1993. Molecular features of *Mollicutes*. *Clinical Infectious Diseases* **S1**: S10-31.
- Brooks, E., Faulds, D. 1989. The *Mycoplasma hyopneumoniae* 74,5kD antigen elicits neutralizing antibodies and shares sequence similarity with heat-shock proteins. *Vaccines* **89**:265-269.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., Trigo, A. 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J Vet Diagn Invest* **11**:246-251.

- Caron, J., Ouardani, M., Dea, S. 1999. Detection and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinitis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes (submitted).
- Caron, J., Sawyer, N., Ben Abdel Moumen, B., Cheikh Saad Bouh, K., Dea, S. 1999. Species-specific monoclonal antibodies to *E. coli* expressed p36 cytosolic protein of *M. hyopneumoniae* (submitted)
- Charley, B., Frenove, B., Villiers, P. 1980. Description et efficacité d'une méthode modifiée de lavage pulmonaire chez le porc anesthésié. *Ann Rech Vét* 11:209-213.
- Chastel, C. 1995. Links and interactions between mycoplasmas and viruses: past confusions and present realities. *Arch Virol* 140: 811-826.
- Chen, J. R., Lin, J. H., Weng, C. N., Lai, S. S. 1998. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 62: 97-110.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162(1):156-159.
- Choppa, P. C., Vojdani, A., Tagle, C., Andrin, R., Magtoto, L. 1998. Multiplex PCR for the detection of *Mycoplasma fermentans*, *M. hominis* and *M. penetrans* in cell cultures and blood samples of patients with chronic fatigue syndrome. *Mol Cell Probes* 12(5): 301-308.
- Chou, S.-Y., Shivan, D. 1996. Direct submission. GenBank accession number U50209.
- Ciprian, A., Cruz, T. A., De La Garza, M. 1994. *Mycoplasma hyopneumoniae*: interactions with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. *Archives of Medical Research* 25(2): 235-239.
- Citti, C., Kim, M. F., Wise, K. S. 1997. Elongated versions of V1p surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinitis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. *Infect. Immun.* 65(5): 1773-1785.
- Clark, L. K., Scheidt, A. B., Mayrose, V. B., Armstrong, C. H., Cline, T. R., Knox, K. 1989. Methodology to reduce days to market in swine herds with enzootic pneumonia. *Proc Iowa Vet Med Assoc* 107:129-135.
- Dallo, S.F., Chavoya, A., Su, C. J., Baseman, J. B. 1989. DNA and sequence homologies between the adhesins of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* 57:1059-1065.

- Davidson, M. K., Davis, J. K., Lindsey, J. R., Cassell, G. H. 1988. Clearance of different strains of *Mycoplasma pulmonis* from the respiratory tract of C3H/HeN mice. *Infect Immun* **56**:2163-2168.
- Dea, S., Tijssen, P. 1989. Antigenic and polypeptide structure of turkey enteric coronaviruses as defined by monoclonal antibodies. *J. gen. Virol.* **70**:1725-1741.
- Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageau, R. A., Martineau, G. P. 1991. Outbreaks of respiratory and reproductive problems associated with encephalomyocarditis virus in Quebec pig farms. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**:275-282.
- Dea, S., Garzon, S. 1991. Identification of coronaviruses by the use of indirect protein A immunogold electron microscopy. *J. Vet. Diagn. Invest.* **3**:297-305.
- Dea, S., Bilodeau, R., Monpetit, C., Sauvageau, R. A., Martineau, G. P. 1992. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **4**:380-392.
- Dea, S., Gagnon, C. A., Mardassi, H., Milane, G. 1996. Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein. *J. Clin. Microbiol.* **34**(6):1488-1493.
- DeBey, M. C., Ross, R. F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* **62**(12):5312-5318.
- Diekman, M. A., Scheidt, A. B., Grant, A. L., Kelly, D. T., Sutton, A. L., Martin, T. G., Cline, T. R. 1999. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on health, growth, and pubertal status of gilts exposed to moderate ammonia concentrations in all-in-all-out versus continuous-flow systems. *Swine Health Prod.* **7**(2): 55-61.
- Djordjevic, S. P., Eamens, G. J., Romalis, L. F., Saunders, M. M. 1994. An improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of porcine serum antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **39**: 261-274.
- Dorigo-Zetsma, J. W., Zaat, S. A. J., Wertheim-van Dillen, P. M. E., Spanjaard, L., Rijntjes, J., van Waveren, G., Jensen, J. S., Angulo, A. F., Dankert, J. 1999. Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J. Clin. Microbiol.* **37**(1):14-17.
- Dudler, R., Schmidhauser, C., Parish, R. W., Wettenhall, R. E., Schmidt, T. 1988. A mycoplasma high-affinity transport system and the *in vitro* invasiveness of mouse sarcoma cell. *EMBO J.* **7**(12):3963-3970.

- Dybvig, K. 1990. Mycoplasmal genetics. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**:81-104.
- Dybvig, K., Voelker, L. L. 1996. Molecular biology of mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 25-57.
- Edwards, D. G. F., Freundt, E. A., Chanock, R. M., Fabricant, J., Hayflick, L., Lemcke, R. M., Razin, S., Somerson, N. L., Witter, R. G. 1967. Recommendation on nomenclature of the order *Mycoplasmatales*. *Science* **155**:1964-1966.
- Fagan, P. K., Djordjevic, S. P., Chin, J., Eamens, G. J., Walker, M. J. 1997. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF). *Infect. Immun.* **65**(6): 2502-2507.
- Feenstra, A. A., Sorensen, V., Friis, N. F., Jensen, N. E., Bille-Hansen, V. 1994. Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. In: Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress 26-30 June 1994 Bangkok, Thailand. 137.
- Feld, N. C., Qvist, P., Ahrens, P., Friis, N. F., Meyling, A. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* **30**:35-46.
- Ferrell, R. V., Heidari, M. B., Wise, K. S., McIntosh, M. A. 1989. A *Mycoplasma* genetic element resembling prokaryotic insertion sequences. *Molecular Microbiology* **3**(7): 957-967.
- Finch, L. R., Mitchell, A. 1992. Sources of nucleotides. In: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Maniloff, McElhaney, Finch, Baseman, eds. Washington, DC: ASM, 211-230.
- Fraser, C. F., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM. 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397-403.
- Freeman, M. J., Armstrong, C. H., Freeman-Sands, L. L., Lopez-Osuna, M. 1984. Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can J. Comp Med* **48**:202-207.
- Frey, J., Haldimann, A., Nicolet, J. 1992. Chromosomal heterogeneity of various *Mycoplasma hyopneumoniae* field strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**(2): 275-280.

- Frey, J., Haldimann, A., Kobisch, M., Nicolet, J. 1994. Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microbial Pathogenesis* **17**:313-322.
- Friis, N. F. 1971. *Mycoplasma hyorhinis* as a causative agent in pneumonia of pigs. *Acta Vet. Scand.* **12**:116-119.
- Friis, N. F. 1971. Sensitivity of *Mycoplasma suisipneumoniae* to penicillin-G. *Acta Vet. Scand.* **12**: 120-121.
- Friis, N. F. 1973. The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. *Acta Vet Scand* **14**:344-346.
- Friis, N. F. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *M. suisipneumoniae* and *M. flocculare*: a survey. *Nord. VetMed.* **27**:337-339.
- Friis, N. F. 1979. Selective isolation of slowly growing acidifying mycoplasmas from swine and cattle. *Acta Vet. Scand.* **17**:607-609.
- Friis, N. F., Ahrens, P., Larsen, H. 1991. *Mycoplasma hyosynoviae* isolation from the upper respiratory tract and tonsils of pigs. *Acta Vet. Scand.* **32**:423-429.
- Friis, N. F., Feenstra, A. A. 1994. *Mycoplasma hyorhinis* in the etiology of serositis among piglets. *Acta Vet. Scand.* **35**:93-98.
- Frydenberg, J., Lind, K., Hu, P. C. 1987. Cloning of *Mycoplasma pneumoniae* DNA and expression of P1-epitopes in *Escherichia coli*. *Isr J med Sci* **23**:759-762.
- Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T., Kawai, K. 1995. Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (p46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine. *J. Bacteriol.* **177**(7): 1915-1917.
- Futo, S., Seto, Y., Okada, M., Sato, S., Suzuki, T., Kawai, K., Imada, Y., Mori, Y. 1995. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **33**(3): 680-683.
- Gallo, M. A., Ward, J., Hutchinson, C. R. 1996. The *dnrM* gene in *Streptomyces peucetius* contains a naturally occurring frameshift mutation that is suppressed by another locus outside of the daunorubicin-production gene cluster. *Microbiology* **142**:269-275.
- Ganter, M., Kipper, S., Hensel, A. 1990. Bronchoscopy and alveolar lavage of live anaesthetized pigs. 11th IPVS Congress, Lausanne 109.

- Geary, S. J., Walczak, E. M. 1983. Cytophthic effect of whole cells and purified membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* **41**(1): 132-136.
- Geary, S. J., Walczak, E. M. 1985. Isolation of a cytopathic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* **48**(2): 576-578.
- Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, C. A., Dea, S. 1999. Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP₅ major envelope glycoprotein. *J Vet Diagn Invest* **11**:20-26.
- Goodwin, R. F. W., Pomeroy, A. P., Whittlestone, P. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with mycoplasma. *Vet Rec* **77**:1247-1249.
- Goodwin, R. F. W. 1973. Field trials with a formalinized vaccine against enzootic pneumonia of pigs. *Br Vet J* **129**:465-470.
- Haldimann, A., Nicolet, J., Frey, J. 1993. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein p36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 317-323.
- Nannan, P. C., O'Hanlon, P. J., Rogers, N. H. 1989. *In vitro* evaluation of various quinilone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res. Vet. Sci.* **46**:202-211.
- Hannan, P. C., Ripley, P. H. 1996. *In vitro* development of resistance in *Mycoplasma hyopneumoniae* to SDS PMD 296, tamulin and two other antimicrobial agents. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, 225.
- Harasawa, R., Koshimizu, K., Takeda, O., Uemori, T., Asada, K., Kato, I. 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* **5**: 103-109.
- Harasawa, R., Asada, K., Kato, I. 1995. A novel repetitive sequence for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Vet. Med. Sci.* **57**(3): 557-558.
- Harris, D. L., Edgerton, S. L., Wilson, E. R. 1990. Large thymus glands in Isowean pigs. Proc 11th Congr Pig Vet Soc, Lausanne, p291.
- Harvey, S. S., McKenzie, K. R., Roche, P. W., Britton, W. J. 1993. Sequence and expression of the *Mycobacterium leprae dnaJ* gene. *J. Gen. Microbiol.* **319**:2003-2008.
- Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* **23**: 504-511.

- Hsu, T., Artiushin, S., Minion, F. C. 1997. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Bacteriol.* **179**(4):1317-1323.
- Hsu, T., Minion, F. C. 1998. Molecular analysis of the P97 cilium operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Gene* **214**:13-23.
- Kahane, I. 1995. Adhesion of Mycoplasmas. *Methods Enzymol* **253**:367-373.
- Kavanagh, N. T. 1994. The effect of pulse medication with a combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia. *Is. Vet. J.* **47**:58-61.
- Kessler, H. H., Dodge, D. E., Pierer, K., Young, K. K. Y., Liao, Y., Santner, B. I., Eber, E., Roeger, M. G., Stuenzner, D., Sixl-Voigt, B., Marth, E. 1997. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridization in a nonradioactive microwell plate format. *J. Clin. Microbiol.* **35**(6):1592-1594.
- Kim, M. F., Heidari, M. B., Stull, S. J., McIntosh, M. A., Wise, K. S. 1990. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. *Infect. Immun.* **58**(8): 2637-2643.
- King, K. W., Faulds, D. H., Rosey, E. L., Yancey Jr, R. J. 1997. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine* **15**(1): 25-35.
- Kirchhoff, H., Rosengarten, R. 1984. Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J. Gen. Microbiol.* **130**:2439-2445.
- Kist, M., Jacobs, E., Bredt, W. Release of *Mycoplasma pneumoniae* substances after phagocytosis by guinea pig alveolar macrophages. *Infect. Immun.* **36**(1): 357-362.
- Klinkert, M. Q., Herrmann, R., Schaller, H. 1985. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expressed plasmid library. *Infect. Immun.* **49**(2): 329-335.
- Kobisch, M., Quillien, L., Tillon, J. P., Wroblewski, H. 1987. The *M. hyopneumoniae* membrane as a vaccine against porcine enzootic pneumonia. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* **138**:693-705.
- Kobisch, M., Milward, F., Desmettre, Ph., Morvan, P. 1990. Prevention of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection by vaccination: active and passive protection. Proc. 8th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Istanbul. IOM letters, **1**:125-126.

- Kobisch, M., Friis, N. F. 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev. sci. Off. Int. Epiz.* **15**(4):1569-1606.
- Kobisch, M., Ross, R. F. Mycoplasma infections of swine. In *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology* (S. Razin and J. G. Tully Eds.), Academic Press, Inc., New York, **2**:371-376.
- Kristensen, B., Paroz, Ph., Nicolet, J. 1981. Cell-mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* **42**: 784-788.
- Lai, W. C., Bennett, M., Johnston, S. A., Barry, M. A., Pakes, S. P. 1995. Protection against *Mycoplasma pulmonis* infection by genetic vaccination. *DNA Cell Biol.* **14**(7): 643-651.
- LeGrand, A., Kobisch, M. 1996. Comparaison de l'utilisation d'un vaccin et d'un traitement antibiotique séquentiel dans un élevage infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res.* **27**:241-253.
- Lo, T. M., Ward, C. K., Inzana, T. J. 1998. Detection and identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36**(6): 1704-1710.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A. 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet Quart* **18**:104-109.
- Maniloff, J., McElhaney, R. N., Finch, L. R., Baseman, J. B., eds. 1992. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
- Manolukas, J. T., Barile, M. F., Chandler, D. K. F., Pollack, J. D. 1988. Presence of anaplerotic reactions and transamination, and the absence of the tricarboxylic acid cycle in mollicutes. *J. Gen. Microbiol.* **134**:791-800.
- Mardassi, H., Athanassious, R., Mounir, S., Dea, S. 1994. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Morphological, biological and serological characteristics of Quebec isolates associated to acute and chronic outbreaks of PRSS. *Can. J. Vet. Res.* **58**:55-64.
- Maré, C. J., Switzer, W. P. 1965. *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med* **60**:841-845.
- Marshall, A. J., Miles, R. J., Richards, L. 1995. The phagocytosis of mycoplasmas. *J. Med. Microbiol.* **43**:239-250.

- Mattson, J. G., Bergstrom, K., Wallgren, P., Johansson, K. E. 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16s rRNA gene. *J. Clin. Microbiol.* **33**(4): 893-897.
- May, J. D., Branton, S. L. 1997. Identification of mycoplasma isolates by ELISA. *Avian Dis.* **41**:93-96.
- Messier, S., Ross, R. F., Paul, P. S. 1990. Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* **51**(1):52-58.
- Messier, S., Ross, R. F. 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am J Vet Res* **52**(9): 1497-1502.
- Molitor, T. W. 1994. Secondary infections associated with porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am Assoc Swine Pract, Ann Proc.* 236-238.
- Mori, Y., Hamaoka, T., Sato, S. 1987. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr. J. Med. Sci.* **23**:657-662.
- Mori, Y., Hamaoka, T., Sato, S., Takeuchi, S. 1988. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunol. Immunopathol.* **19**:239-250.
- Nakano, H., Yamazaki, T., Ikeda, M., Masai, H., Miyatake, S., Saito, T. 1993. Purification of glutathione S-transferase fusion proteins as a non-degraded form by using a protease-negative *E. coli* strain, AD202. *Nucleic Acids Research* **22**(3):543-544.
- Nicolet, J., Paroz, P. 1980. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Research Veterinary Science* **29**: 305-309.
- Nielsen, N. C., Nielsen, E. O., Hagerdorn-Olsen, T. 1996. Field outbreaks of *Mycoplasma hyosynoviae* polyarthritis. Proc. 14th International Pig Veterinary Society Congress, Bologna, 236.
- Nocard, E., Roux, E. R. 1898. Le microbe de la péripneumonie. *Ann. Inst. Pasteur* **12**:240-262.
- Pollack, J. D. 1992. Carbohydrate metabolism and energy conservation. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Maniloff, J., McElhaney, R. N., Finch, L. R., Baseman, J. B., eds. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol, 181-200.
- Razin, S. 1984. The *Mycoplasmatales*. *CRC handbook of microbiology* **1**:105-129. CRC PRESS, Inc., Cleveland.

- Razin, S., Freundt, E. A. 1984. The mycoplasmas. Bergey's manual of systematic bacteriology 1:740-762. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Razin, S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). Microbiological Reviews 49(4): 419-455.
- Razin, S., Jacobs, E. 1992. Mycoplasma adhesion. J. Gen. Microbiol. 138:407-422
- Razin, S. 1995. Molecular properties of mollicutes: a synopsis. In Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology (S. Razin and J. G. Tully Eds.), Academic Press, Inc., New York, 1:1-25.
- Robinson, I., Freundt, E. A. 1987. Proposal for an amended classification of anaerobic mollicutes. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:78-81.
- Rodriguez, F., Ball, H. J., Finlay, D., Campbell, D., Mackie, D. P. 1996. Detection of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* by monoclonal antibody-based sandwich ELISA. Vet. Microbiol. 51:69-76.
- Rose, D. L., Tully, J. G., Wittler, R. G. 1979. Taxonomy of some swine mycoplasmas: *Mycoplasma suis pneumoniae* Goodwin et al. 1965, a later, objective synonym of *Mycoplasma hyopneumoniae* Mare and Switzer 1965, and the status of *Mycoplasma flocculare* Meyling and Friis 1972. Int. J. Syst. Bacteriol. 29(2): 83-91.
- Rosenbusch, R. F., Minion, F. C. 1992. Cell envelope: morphology and biochemistry. In: Maniloff J. ed. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Washington, ASM, 73-77.
- Rosengarten, R., Yogev, D. 1996. Variant colony surface antigenic phenotypes within mycoplasma strain populations: implications for species identification and strain standardization. J. Clin. Microbiol. 34(1): 149-158.
- Ross, R. F., Duncan, J. R. 1970. *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine. JAVMA 157:1515-1518.
- Ross, R. F., Spear, M. L. 1973. Role of the sow as a reservoir in infection for *M. hyosynoviae*. Am J Vet Res 34:373-378.
- Ross, R. F., Zimmermann-Erickson, B. J., Young, T. F. 1984. Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. Am J Vet Res 45(10):1899-1905.

- Ross, R. F. 1992. Mycoplasmal diseases. In Diseases of swine (A.D. Leman, B. Straw, W. Mengeling, S. D'Allaire & D. Taylor, eds), 7th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 537-551.
- Ross, R. F., Stemke, G. W. 1996. Mycoplasma infections of swine. In Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology (S. Razin and J. G. Tully Eds.), Academic Press, Inc., New York, 2:275-281.
- Ruuth, E., Praz, F. 1989. Interactions between mycoplasmas and the immune system. Immunological Reviews **112**:133-160.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Scarman, A. L., Chin, J. C., Eamens, G. J., Delaney, S. F., Djordjevic, S. P. 1997. Identification of novel species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* by preparative SDS-PAGE ELISA profiling. Microbiology **143**: 663-673.
- Scheidt, A. B., Mayrose, V. B., Van Alstine, W. G., Clark, L. K., Cline, T. R., Eistein, M. E. 1994. The effects of vaccinating pigs for mycoplasmal pneumonia in a swine herd affected by enzootic pneumonia. Swine Health Prod. **2**(1): 7-11.
- Sibille, Y., Reynolds, H. Y. 1990. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. Am Rev Respir Dis **141**:471-510.
- Sidhu, M. K., Rashidbaigi, A., Testa, D., Liao, M. J. 1995. Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. FEMS Microbiol. Lett. **128**: 207-212.
- Sitjar, M., Noyes, E. P., Simon, X., Pijoan, C. 1996. Relationships among seroconversion to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, and production parameters in pigs. Swine Health Prod. **4**(6): 273-277.
- Smith, D. B., Johnson, K. S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene **67**:31-40.
- Sörensen. V., Barford, K., Feld, N. C., Vraa-Andersen, L. 1993. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. **12**(2):593-604.
- Sörensen, V., Ahrens, P., Barfod, K., Feenstra, A. A., Feld, N. C., Friis, N. F., Bille-Hansen, V., Jensen, N. E., Pedersen, M. W. 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Vet. Microbiol. **54**: 23-34.

- Stärk, K. D., Nicolet, J., Frey, J. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(2): 543-548.
- Stemke, G. W., Laigret, F., Grau, O., Bové, J. M. 1992. Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and complete 16S rRNA sequence of *M. flocculare*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**(2): 220-225.
- Stemke, G. W., Huang, Y., Laigret, F., Bové, J. M. 1994. Cloning the ribosomal RNA operons of *Mycoplasma flocculare* and comparison with those of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* **140**: 857-860.
- Stemke, G. W., Phan, R., Young, T. F., Ross, R. F. 1994. Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16s rRNA gene sequence. *Am J Vet Res* **55**(1): 81-84.
- Stemke, G. W. 1997. Gene amplification (PCR) to detect and differentiate mycoplasmas in porcine mycoplasmal pneumonia. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 327-330.
- Stipkovits, L., Nicolet, J., Haldimann, A., Frey, J. 1991. Use of antibodies against the p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *M. hyopneumoniae* strains. *Mol Cell Probes* **5**:451-457.
- Strasser, M., Frey, J., Bestetti, G., Kobisch, M., Nicolet, J. 1991. Cloning and expression of a novel species-specific early immunogenic 36-kilodalton of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**(4):1217-1222.
- Strasser, M., Abiven, P., Kobisch, M., Nicolet, J. 1992. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **31**:141-153.
- Suh, D., Rutten, S., Dee, S. A., Joo, H. S., Pijoan, C. 1998. Effect of nursery depopulation on the seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs. *Swine Health Prod.* **6**(4):151-155.
- Suter, M., Kobish, M., Nicolet, J. 1985. Stimulation of immunoglobulin-containing cells and isotype-specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. *Infect. Immun.* **49**(3):615-620.
- Tajima, M., Yagihashi, T., Miki, Y. 1982. Capsular material of *Mycoplasma gallisepticum* and its possible relevance to the pathogenic process. *Infect. Immun.* **36**(2): 830-833.

- Tajima, M., Yagihashi, T. 1982. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect. Immun.* **37**(3): 1162-1169.
- Taschke, C., Herrmann, R. 1986. Analysis of transcription and processing signals of the 16S-23S rRNA operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Mol Gen Genet* **205**:434-441.
- Thacker, E. L., Thacker, B. J., Boettcher, T. B., Jayappa, H. 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine Health Prod.* **6**(3):107-112.
- Thacker, E. L., Halbur, P. G., Ross, R. F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B. J. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* **37**(3):620-627.
- Tola, S., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Angioi, A., Rocchigiani, A. M., Leori, G. 1996. Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* **51**:77-84.
- Trevino, L. B., Haldenwang, W. G., Baseman, J. B. 1986. Expression of *Mycoplasma pneumoniae* antigens in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **53**(1):129-134.
- Tully, J. G., Rose, D. L., Clark, E., Carle, P., Bové, J. M., Henegar, R. B., Whitcomb, R. F., Colflesh, D. E., Williamson, D. L. 1987. Revised group classification of the genus *Spiroplasma* (class *Mollicutes*), with proposed new groups XII to XXIII. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:357-364.
- Tully, J. G., Bové, J. M., Laigret, F., Whitcomb, R. F. 1993. Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. Nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmateaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**(2):378-385.
- Tully, J. G. 1996. *Mycoplasma* infections of swine. In *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology* (S. Razin and J. G. Tully Eds.), Academic Press, Inc., New York, **2**:1-17.
- Twiehaus, M. J., Underdahl, N. R. 1975. Control and elimination of swine diseases through repopulation with specific-pathogen-free stock. In *Diseases of Swine*, 4th ed. Ed. H. W. Dunne and A. D. Leman. Ames: Iowa State Univ Press, 1163-1179.

- Van Alstine, W. G., Stevensen, G. W., Kanitz, C. L. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vet. Microbiol.* **49**:297-303.
- Van Leengoed, L. A. M. G., Kamp, E. M. 1989. A method for bronchoalveolar lavage in live pigs. *Vet Q* **11**:65-72.
- Wang, H., Fadl, A. A., Khan, M. I. 1997. Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Mol Cell Probes* **11**:211-216.
- Weisburg, W. G., Tully, J. G., Rose, D. L., Petzel, J. P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T. G., Van Etten, J., Maniloff, J., Woese, C. R. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* **171**(12):6455-6467.
- Wilton, J. L., Scarman, A. L., Walker, M. J., Djordjevic, S. P. 1998. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Microbiology* **144**:1931-1943.
- Wise, K. S., Kim, M. F. 1987. Major membrane surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* selectively modified by covalently bound lipid. *J. Bacteriol.* **169**(12): 5546-5555.
- Yamamoto, K., Koshimizu, K. Ogata, M. 1986. *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* to antibiotics. *Jpn. J. vet. Sci.* **48**:1-5.
- Yang, L., Yoon, K.-J., Li, Y., Lee, J.-H., Zimmerman, J. J., Fray, M. L., Harmon, K. M., Platt, K. B. 1999. Antigenic and genetic variations of the 15 kD nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Arch Virol* **144**:525-546.
- Young, T. F., Ross, R. F. 1987. Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *Am J Vet Res* **48**(4):651-656.
- Zhang, Q., Young, T. F., Ross, R. F. 1994. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**(5):1616-1622.
- Zhang, Q., Young, T. F., Ross, R. F. 1994. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. *Infect. Immun.* **62**(10):4367-4373.
- Zhang, Q., Young, T., Ross, R. F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immun.* **63**(3):1013-1019.
- Zielinski, G. C., Ross, R. F. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am J Vet Res* **54**(8):1262-1269.

REMERCIEMENTS

J'aimerais sincèrement remercier mon professeur, le Dr Serge Dea, pour m'avoir accepté dans son laboratoire, permis d'acquérir une excellente formation scientifique et procurer l'opportunité de travailler sur un sujet si intéressant. De par ses conseils judicieux et son soutien, le Dr Dea a toujours été présent dans tous les aspects de ce projet.

J'aimerais remercier Louise Wilson et Nicole Sawyer pour leur support technique et moral et pour leur grande disponibilité. De plus, j'aimerais remercier le service de diagnostic vétérinaire, plus particulièrement Hélène Drôlet, Diane Rouleau et Pierrette Lessard pour leur aide technique.

J'aimerais remercier tous les étudiants passés et présents du laboratoire du Dr Dea, pour leur aide technique, leur conseil, leur compréhension et leur amitié.

J'aimerais remercier Guylaine, Jean-Guy, Louis-Martin, Martine, Suzanne et Vincent, pour m'avoir écouté et encouragé.

J'aimerais remercier les pathologistes du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Serge Messier, du Département de Microbiologie et Pathologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, St-Hyacinthe, Québec, et André Broes, Centre du développement du porc du Québec Inc., pour nous avoir soumis les différentes espèces de bactéries et les spécimens cliniques analysés dans le cadre de nos travaux de recherche.

Pour terminer, j'aimerais remercier BioVet Recherches Inc., le Conseil de Recherches en Pêches et Agro-Alimentaire du Québec, la fédération des producteurs de porcs du Québec et l'Institut Armand-Frappier pour le support financier grâce auquel ce projet a été réalisé.

ANNEXE I:
MILIEU DE CULTURE SOLIDE ET LIQUIDE
POUR *M. HYOPNEUMONIAE*

MILIEU DE CULTURE LIQUIDE* POUR *M. HYOPNEUMONIAE* (1 LITRE)**MÉLANGE 1**

PPLO broth (Difco Labs, Detroit, MI)	5,1 g
Bacto brain heart infusion (Difco Labs)	4,8 g
HBSS 10X (GIBCO BRL)	29,4 ml
Eau	735 ml

Autoclaver 20 minutes, refroidir, ajouter mélange 2

MÉLANGE 2

Extrait de levure (GIBCO BRL)	50 ml
Sérum de porc inactivé (GIBCO BRL)	200 ml
Rouge de phénol 0,5 % (GIBCO BRL)	4 ml
Bacitracine 250 mg/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont.)	585 µl
Méthicilline 250 mg/ml (Sigma-Aldrich)	585 µl
Acétate de thallium 130 mg/ml (Sigma-Aldrich)	585 µl

*Modifié à partir de Friis (1975)

MILIEU DE CULTURE SOLIDE* POUR *M. HYOPNEUMONIAE* (100 ml)**MÉLANGE 1**

PPLO agar (Difco Labs)	2,47 g
Bacto brain heart infusion	0,48 g
HBSS 10X	2,94 ml
Eau	73,6 ml

Autoclaver 20 minutes, refroidir à 65°C, ajouter mélange 2

MÉLANGE 2

Extrait de levure	3,5 ml
Sérum de porc inactivé	20 ml
Bacitracine 250 mg/ml	58 µl
Méthicilline 250 mg/ml	58 µl
Acétate de thallium 130 mg/ml	58 µl

*Modifié à partir de Friis (1975)

ANNEXE II:
SÉQUENCES DES GÈNES P36 ET P46 DE *M.*
HYOPNEUMONIAE* ET P37 DE *M. HYORHINIS

LOCUS MHLDH 1394 bp DNA BCT 30-JUN-1993
 DEFINITION M.hypopneumoniae ldh gene for L-lactate dehydrogenase.
 ACCESSION X67286 S55480
 NID g49109
 VERSION X67286.1 GI:49109
 KEYWORDS L-lactate dehydrogenase; ldh gene.
 SOURCE Mycoplasma hypopneumoniae.
 ORGANISM Mycoplasma hypopneumoniae
 Bacteria; Firmicutes; Bacillus/Clostridium group; Mollicutes;
 Mycoplasmataceae; Mycoplasma.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1394)
 AUTHORS Haldimann,A., Nicolet,J. and Frey,J.
 TITLE DNA sequence determination and biochemical analysis of the
 immunogenic protein P36, the lactate dehydrogenase (LDH) of
 Mycoplasma hypopneumoniae
 JOURNAL J. Gen. Microbiol. 139 (Pt 2), 317-323 (1993)
 MEDLINE 93171874

REFERENCE 2 (bases 1 to 1394)
 AUTHORS Frey,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (14-JUL-1992) J. Frey, Institut f Veterinary
 Bacteriology, University of Berne, Laenggass str 122, CH-3012
 Berne, SWITZERLAND

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1394
 /organism="Mycoplasma hypopneumoniae"
 /strain="NCTC 10110"
 /db_xref="taxon:2099"
 /clone="pJFF631"
 repeat_region 186..226
 /note="Hairpin structure"
 /rpt_type=INVERTED
 -10_signal 250..255
 -10_signal 264..269
 -10_signal 279..284
 PBS 309..315
 /gene="ldh"
 gene 309..1274
 /gene="ldh"
 CDS 327..1274
 /gene="ldh"
 /EC_number="1.1.1.27"
 /codon_start=1
 /transl_table=4
 /product="L-lactate dehydrogenase"
 /protein_id="CAA47702.1"
 /db_xref="PID:g49110"
 /db_xref="GI:49110"
 /db_xref="SWISS-PROT:P33572"
 /translation="MKPIKIALIGAGNVGNSFLYAAMNQGLASEYGIIDINPDFADGN
 AFD FEDASASLPFPI SVSRYEYKDLKDA DFIVITAGRPOKPGETRLELVADNIRI IRE
 IALKVKESGFSGISIIIVANPVDIITRAYRDASGFSDQKVI GSGTVLDTARLQFAIAKR
 AKVSPNSVQAYVMGEHGDSSFVAYSNIKIAGECFCAYSKLTGIDSSNYEKELEYPVSR
 RAYEI INRKRAFYGIGAAIAKIVSNIIKDTKNIMIAGANLRGEYGFHGVNIGVPEVVL
 GANGIEKII EISLNDKEKEKFAKSVAIIDKIYQDAIKNI"

```

repeat_region 1335..1371
                /note="Hairpin structure"
                /rpt_type=INVERTED
508 a      190 c      232 g      464 t

 1 gttaacacgc caccaggaat tgatctaaaa aaattagaac taaataatgt cgatggttat
 61 gctcttgag cttatattct cattattatt ttctcacttg tttcttcaat tggtttatgc
121 ccttttaaag gaaccaaadc cagaatataa aaaattatta aaaatacgtg gtttttctga
181 aattgaacga atcaaaaaat aaaaaaaatt tcatttttga ttcgttttaa ttaaaaaata
241 gaaaaaaatt atcattactt gtttttaatt aaaaaaaatt aaatctatca atgaaaaaat
301 ttaacaaaaa aggagaaadc aaacttatga aacctattaa aatagctcta attggtgctg
361 gaaatgtcgg aaattccttc ctttatgcag caatgaatca aggacttgca tccgagtatg
421 gaattattga tattaatcct gattttgccc atggtaatgc ttttgatttt gaagatgcct
481 cagcttcttt gccttttccg atttagtgtct cccgttatga atataaagat ctaaaaagatg
541 ctgattttat tgtaattaca gcgggaagac cacaaaaacc gggtgaaact cggcttgaat
601 tagtagctga taacatccga attatccggg aaattgcact aaaagtcaaa gaaagtggct
661 ttagtggaat aagtattatt gttgctaadc ctggtgatat aattacaagg gcttaccggg
721 atgcatctgg attttccgat caaaaagtta tcggtagtgg aactgtttta gatacagcaa
781 ggcttcaatt tgcaatcgca aaaagagcaa aagtatcgcc taattcgggt caggcctacg
841 tgatgggtga acatggtgat tcatcttttg ttgcttattc aaatattaaa attgccggtg
901 aatgtttctg tgcttattct aaactaaccg gaattgatag ctcaaattac gaaaaagaac
961 ttgaatatcc agtttctcgc cgggcttatg aaattattaa tcgtaaaagg gcaacatttt
1021 atggaattgg tgcagctatt gccaaaatag tttctaatat tatcaaagat acaaaaaata
1081 ttatgattgc cggagcaaat ttacgaggag aatacggatt tcacggagta aatatcggag
1141 ttccagttgt ttaggagca aacggaattg aaaaaattat tgagattagt cttaatgata
1201 aagaaaaaga aaaatttgcc aaatcagttg caatcattga taaaatttat caggatgcaa
1261 ttaaaaaatat ttaatttttt aggaaaaaca gtttaaaaat ctctctataa atttaattat
1321 tttatcctat gattttaaaa aagtactata aatttatagt acttttttaa tttttagcaa
1381 aaaaattgaa gctt

```

LOCUS MYC46KDSA 1740 bp DNA BCT 04-FEB-1999
 DEFINITION Mycoplasma hyopneumoniae gene for 46 kDa surface antigen, complete cds.
 ACCESSION D16682
 NID g517134
 VERSION D16682.1 GI:517134
 KEYWORDS 46 kDa surface antigen; P46; lipoprotein.
 SOURCE Mycoplasma hyopneumoniae (strain:ATCC25934 (strain J)) DNA.
 ORGANISM *Mycoplasma hyopneumoniae*
 Bacteria; Firmicutes; Bacillus/Clostridium group; Mollicutes; Mycoplasmataceae; Mycoplasma.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1740)
 AUTHORS Futo, S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (15-JUL-1993) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases. Satoshi Futo, Central Laboratory, Nippon Flour Mills Co., Ltd., Bioscience; 2114-2 Nurumizu, Atsugi, Kanagawa 243, Japan (Tel:0462-23-5115, Fax:0462-21-4970)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1620)
 AUTHORS Futo, S., Seto, Y., Mitsuse, S., Mori, Y., Suzuki, T. and Kawai, K.
 TITLE Molecular cloning of a 46-kilodalton surface antigen (P46) gene from *Mycoplasma hyopneumoniae*: direct evidence of CGG codon usage for arginine
 JOURNAL J. Bacteriol. 177 (7), 1915-1917 (1995)
 MEDLINE 95204368

REFERENCE 3 (sites)
 AUTHORS Futo, S., Seto, Y., Okada, M., Sato, S., Suzuki, T., Kawai, K., Imada, Y. and Mori, Y.
 TITLE Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay
 JOURNAL J. Clin. Microbiol. 33 (3), 680-683 (1995)
 MEDLINE 95270693

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1740
 /organism="Mycoplasma hyopneumoniae"
 /strain="ATCC25934 (strain J)"
 /db_xref="taxon:2099"
 -10_signal 187..192
 misc_feature 198
 /note="transcription initiation site"
 RBS 222..230
 CDS 235..1494
 /codon_start=1
 /transl_table=4
 /product="46 kDa surface antigen"
 /protein_id="BAA04085.1"
 /db_xref="PID:d1004604"
 /db_xref="PID:g1220114"
 /db_xref="GI:1220114"
 /translation="MKKMLRKKFLYSSAIYATSLASIIAFVAAGCGQTESGSTSDSKP
 QAETLKHKVSNDISIRIALTDPDNPRWISAQKDII SYVDETEAATSTITKNQDAQNNWL
 TQQANLSPAPKGFIIAPENSGVGTAVNTIADKGIPIVAYDRLITGSDKYDWYVSFDN
 EKVGELOGLSLAAGLLGKEDGAFDSIDQMNEYLKSHMPQETISFYTIAGSQDDNNSQY"

FYNGAMKVLKELMKNSQNKIIDLSPEGENAVYVPGWNYGTAGQRIQSFLTINKDPAGG
 NKIKAVGSKPASI FKGFLAPNDGMAEQAITKLLKLEGFDTQKIFVTGQDYNDKAKTFIK
 DGDQNM TI YKPKVLGKVAEVLRLVLI AKKNKASRSEVENELKAKLPN I SFKYDNQTY
 KVQGNINTILVSPVIVTKANVDNPDA"

BASE COUNT 670 a 239 c 258 g 573 t
 ORIGIN

```

1 tttacatttt tttataacaa tttttaaaaa ttacccttta atttatagta tttttttatt
61 ttttagtcta aattataaaa ttatcttgaa ttttatttga atttttataa tttagtacta
121 aaaaatacaa atattttttc ctattctaag aaaaattcat tttttaaaaa aaattgattt
181 ttatagtata atttatttgt ataattgaat taacttgatt tgaaagggaa caaatgaaa
241 aaaatgctta gaaaaaaaaatt cttgtattca tcagctattt atgcaacttc gcttgcacatca
301 attattgcat ttgttgcagc aggttggga cagacagaat caggttcgac ttcagattct
361 aaaccacaag ccgagactct aaaacataaa gtaagtaatg attctattcg aatagcacta
421 accgatccgg ataatcctcg atgaattagt gcccaaaaag atattatttc ttatgttgat
481 gaaacagagg cagcaacttc aacaattaca aaaaaccagg atgcacaaaa taactgactc
541 actcagcaag ctaatttaag tccagcgcca aaaggattta ttattgcccc tgaaaatgga
601 agtggagttg gaactgctgt taatacaatt gctgataaag gaattccgat tgttgacctat
661 gatcgactaa ttactggatc tgataaatat gattggtatg tttcttttga taatgaaaaa
721 gttggcgaat tacaaggtct ttcacttgcg gcgggtctat taggaaaaga agatggtgct
781 tttgattcaa ttgatcaaat gaatgaatat ctaaaatcac atatgcccc aagagacaatt
841 tctttttata caatcgcggg ttccaagat gataataatt cccaatattt ttataatggt
901 gcaatgaaag tacttaaaga attaatgaaa aattcgcaaa ataaaaaat tgatttatct
961 cctgaaggcg aaaatgctgt ttatgtccca ggatgaaatt atggaactgc cgtcaaaaga
1021 atccaatctt ttctaacaat taacaaagat ccagcaggtg gtaataaaat caaagctggt
1081 ggttcaaaac cagcttctat tttcaaagga tttcttgccc caaatgatgg aatggccgaa
1141 caagcaatca ccaaattaaa acttgaagga tttgatacc aaaaaatctt tgtaactggt
1201 caagattata atgataaagc caaaactttt atcaaagacg gcgatcaaaa tatgacaatt
1261 tataaacctg ataaagtttt aggaaaagtt gctggtgaag ttcttcgggt ttttaattgca
1321 aagaaaaata aagcatctag atcagaagtc gaaaacgaac taaaagcaaa actaccaaat
1381 atttcattta aatagataa tcaaacatat aaagtgcaag gtaaaaatat taatacaatt
1441 ttagtaagtc cagtaattgt taaaaagct aatggtgata atcctgatgc ctaaaatttc
1501 taaaagttaa aaatttgatc ttattttatt aaaaattaac ataaaaaatt agcttaaatt
1561 ttatataatt tacctaataa aatntagagc taatttttta tttatgaaag gatattaaat
1621 tgaaaaaac taatattcta tcactaaaaa aaataaaaaa agtttatggt cctgtaattg
1681 ctctttctga tgtgactttt gttgttccaa aaggggaaat aactagccta gttggtgaaa

```

LOCUS MHP37GNA 5238 bp DNA BCT 13-DEC-1994
 DEFINITION M.hyorhins p37, p29, and p69 genes.
 ACCESSION X14140
 NID g288402
 VERSION X14140.1 GI:288402
 KEYWORDS p29 gene; p37 gene; p69 gene; periplasmic binding protein.
 SOURCE Mycoplasma hyorhins.
 ORGANISM Mycoplasma hyorhins
 Bacteria; Firmicutes; Bacillus/Clostridium group; Mollicutes;
 Mycoplasmataceae; Mycoplasma.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 5238)
 AUTHORS Dudler,R., Schmidhauser,C., Parish,R.W., Wettenhall,R.E. and
 Schmidt,T.
 TITLE A mycoplasma high-affinity transport system and the in vitro
 invasiveness of mouse sarcoma cells
 JOURNAL EMBO J. 7 (12), 3963-3970 (1988)
 MEDLINE 89091146
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..5238
 /organism="Mycoplasma hyorhins"
 /db_xref="taxon:2100"
 gene 758..1969
 /gene="p37"
 CDS 758..1969
 /gene="p37"
 /codon_start=1
 /transl_except=(pos:758..760,aa:Met)
 /transl_except=(pos:881..883,aa:Trp)
 /transl_table=4
 /protein_id="CAA32357.1"
 /db_xref="PID:g577661"
 /db_xref="GI:577661"
 /db_xref="SWISS-PROT:P15363"
 /translation="MLKKLKNFILFSSIFSPIAFAISCSNTGVVKQEDVSVSQGWDK
 SITFGVSEAWLNKKKGGEKVNKEVINTFLENFKKEFNKLNANDKTKNFDDVDFKVTP
 IQDFTVLLNNLSTDNPELDFGINASGKLVFLKNNPGIITPALETTTNSFVFDKEDK
 FYVDGTDSDPLVKIAKEINKIFVETPYASWTDENHKWNGNVYQSVYDPTVQANFYRGM
 IWIKGNDETLAKIKKAWNDKDWNTFRNFGILHGKDNSFSKFKLEETILKNHFQNKFTT
 LNEDRSAHPNAYKQKSADTLGTLDDFHIAFSEEGSFAWTHNKSATKPFETKANЕКMEA
 LIVTNPIPYDVGVFRKSVNQLEQNLIQVTFINLAKNKQDTYGPLLYNGYKKIDNFQK
 EIVEVYEKAIK"
 mRNA 1950..2708
 /gene="p29"
 gene 1950..2708
 /gene="p29"
 gene 2701..4443
 /gene="p69"
 CDS 2701..4443
 /gene="p69"
 /codon_start=1
 /transl_table=4
 /protein_id="CAA32358.1"
 /db_xref="PID:g288405"
 /db_xref="GI:288405"
 /db_xref="SWISS-PROT:P15362"

/translation="MIKENLFFEWVDKNNKKLKLKWKILILLSSLLLFIFSFYSLFQP
 INYGSTRIFTKNLKELFTFSNYSKKYPSWTLWQLSWYMFLLTIRYCALGTTLGFI FAF
 FTSFVSSNFQYKFI RYI I N I I I I F F K A F P I S L F V Y F F S I G F D K E L A A T L I L F W F S W L
 W M H K Y F L D F L N N L D K T N Y K I M H M K T N E N F A S F R K T L F P Y I V N K Y F M F V V S L E S N I R W
 T T I I N A A G V I G I G L L L N D A R D F S L G W S V V G I P L L V I L V T I I F F E F L T L F L N K V I L N I K
 N I N Y Q N T S F L W I K L N F R R I F K W F F V L F F V G L N I Y S I I K I S S F T L Y P N Y I K N F W N H F F S
 F Q N E V F S H N K E N N P F Y W I L I L I Y Q C I V S I T I I A I I S L V F S I L G N E K L N N V T Q W I P L R F
 L N T L F R I I P T I I F I Y L F S I F W I G T N I F L L V A V I T A L R K S T S L V K Q L N E S I N S I N W E I Y
 K T L E I Q G K S K F Q R I I K F V F P S I K K D Y L S F L L F Y F E N Q V Q T L I L L G S V G G S L L G S K I S I
 V G Q A G E R T E N I L E L M T Y S W I S W V F I A I I Q L L Q F Y F N L I V Q N K K I S Q L Y L I K N L N T Y F T
 K I K V I F K N K F S S D Q"

BASE COUNT 2018 a 612 c 631 g 1977 t
 ORIGIN

1	ctaagagata	tttttcttta	gataacacac	cttgatcttc	ttagaaca	caagaaatcc
61	ttgctttttc	tttattttta	gcagatcaaa	acttaatfff	taatgatgtt	aaatcctatt
121	ttgaaaacat	gggatacaaa	ataaatgtta	aagattcagt	aattaaatta	gatgatacaa
181	aagatgagaa	aaaataaata	aaataatf	gtttttatat	aattttaatt	atgaacaatt
241	gacaagaaga	attattttta	aaaattatca	aaagagaaga	accagcaacc	attttgtatg
301	aagatgataa	ggcatagct	tttttagata	aatacgcaca	tacaaaagg	cacttttag
361	tagtgccaaa	aaattattca	agaaatf	tttctatc	tgatgaagat	ttatcatatt
421	taattgtaaa	agcaaggaa	tttgcttac	aagagattaa	aaaattaggt	gctactggat
481	ttaaattatt	aattaacaat	gaaccagatg	cagaacaatc	aatttttcat	acacatgtac
541	acataattcc	ttattataaa	aaataaaaat	ttaaaaagta	atgtaaaaat	ttaatttaca
601	ttactttttt	tgtataatta	tttcaacagg	ggagctgtaa	aaggctgaga	aatactctat
661	aagttgatct	agataatgct	agcgtaacga	gttgtttttt	atfctcaaat	ttttaaagct
721	atctctgtca	caaaaattaa	ttaaggaggt	agcttttttg	ctcaaaaat	taaaaaatt
781	tattctattt	tcatctatat	tttcgccaat	agcatttgct	atatcatgtt	ctaatacagg
841	agtagtcaag	caagaggatg	tatcagttag	tcaaggcaaa	tgagataaaa	gtataacatt
901	tggtgtttca	gaagcttggt	taacaagaa	aaaaggaggt	gaaaaagta	acaagaagt
961	tattaataca	tttttagaaa	atfcaaaaa	agaattta	aaactcaaaa	atgcaaatga
1021	taaaacaaa	aacttcgatg	acgttgattt	taaagtaact	ccaattcaag	actttactgt
1081	gttggttaaac	aatttatcta	ctgacaatcc	tgaattagat	tttggaatta	atgcttcagg
1141	aaaattggta	gaatttctaa	aaaataatcc	tggtataata	actccagcat	tagaaacaac
1201	aactaattct	tttgattttg	acaaagaaaa	agataaaatt	tatggtgatg	gtacagattc
1261	agatccactt	gtaaaaattg	ctaaagaaat	taataaaatt	tttggtgaaa	ctccatagtc
1321	aagttgaaact	gatgaaaatc	ataagtgaaa	tggtaatgtt	tatcaaagtg	tttacgatcc
1381	aactgttcaa	gctaattttt	atagaggaat	gatttgaata	aaaggtaatg	atgaaactct
1441	agctaaaatt	aaaaaagctt	gaaatgataa	agattgaaat	acatttagaa	atfcttggat
1501	tttacacggt	aaagataatt	cttttctaa	attcaagtta	gaagaaacta	tattaaaaaa
1561	ccactttcaa	aataaattta	caacactaaa	tgaagacaga	agcgcacatc	caaacgcata
1621	taaacaaaaa	tctgcagata	cattgggaac	ttagatgat	ttccatattg	cttttctaga
1681	agaaggttct	tttgcttgaa	cacataacaa	atcagcaaca	aaacttttg	aaactaaagc
1741	aatgaaaag	atggaagcac	ttatagtaac	taatccaatt	ccgatgatg	ttggagtgtt
1801	tagaaaaagt	gttaaccaat	tagaacaana	tttaattgtt	caaacattca	ttaatttagc
1861	taaaaaataa	caagatacat	atggccact	tttaggtgat	aatggttata	aaaaaattga
1921	caatttccaa	aaagagattg	tagaagttta	tgaaaaagcc	atfcaataaa	ttagaaataa
1981	aaaatttaac	atfcaaaaat	aaaaatgatg	attacataat	tttaagaac	ctaaacttag
2041	atataaattc	tgataaagtt	ttgtttttat	taggttcatc	aggccaagga	aaaagttctt
2101	tattaaaaac	aatttttaaa	caactgatg	taattgaagg	aacaatcctt	tttaataaac
2161	aagatatttt	tcaattaaac	aaaaaagaat	gaaaatcctt	ctfcaaaagaa	gtaagtttct
2221	taaatcagac	aaccacttca	atcccttttg	aaacagtttt	taccaatata	gtaagatcac
2281	ttcaagatta	taaaaattta	ttttataaca	tatttaattt	agtgagtaaa	tctcaaaaag
2341	aagaaattac	ttctgtttta	aaagagttaa	atattttgga	caaaatttac	cacagagttg
2401	attcactttc	tgaggagcaa	caacaaagag	tagaaattgc	taaatfaatg	atgcaaaaac
2461	ccaaaattat	tatagcagat	gaacctacaa	atfctctcga	ccctaattat	tctaaaaata
2521	ttattgaatt	aattattaaa	atggctaaaa	aatttaactc	aattttgata	atagttactc
2581	acaatgttaa	tttaattcat	gaatttgatt	cttctatttt	actaattaaa	aatcaagaat
2641	atcattttta	taaatcaaat	aaagaaataa	atfcaaatat	tttagaccag	gttttataaa
2701	atgattaaag	aaaatttatt	ttttgaatga	gtagataaaa	acaataaaaa	actaaaaata
2761	aatgaaaaaa	ttttaaatttt	attgctttcc	cttttattat	ttattttctc	cttttattcc
2821	ttatttcaac	caattaatta	tggttctaca	agaattttta	caaaaaattt	aaaagaatta
2881	tttacttttt	caaattattc	taaaaaatat	ccaagttgaa	ctctgtgaca	attaagttgg
2941	tattacatgt	ttttaaactat	tcgttattgt	gccttggtga	caacttttag	ctttattttc

3001 gcttttttta cttcttttgt aagttcta at tttcaaaa at aaaaatttat aagatacatt
 3061 attaatataa taattatfff tttcaaagca tttccaattt cattatttgt ttattttttt
 3121 tctatagggt ttgacaaaga attagcagca actttaattt tattttgatt tagttgattg
 3181 tgaatgcata agtattttct agatttttta aataatctag ataaaaactaa ttacaaaatt
 3241 atgcatatga aaactaatga aaattttgct tcttttagaa aaactttggt cccttatata
 3301 gttataaat attttatggt ttttgtttat tcattagaaa gcaacattcg ctgaaccaca
 3361 ataataaatg ctgctggagt aattgggatt ggattgctct taaatgatgc aagagatttt
 3421 tcattagggt gatctggtgt tggatatacct ttggtagtaa ttttagtaac cattatattt
 3481 tttgaatttc taactctttt tttaaataaa gttatcttaa atataaaaaa tataaattat
 3541 caaaacactt cttttttatg aataaaaatta aatttttagaa gaatttttaa atgatttttt
 3601 gtcttatttt ttgttggatt gaacatata tcaattataa aaatttcttc ctttacactg
 3661 tatccaaact atattaaaaa cttttgaaat cattttttta gctttcaaaa tgaagtattt
 3721 tcacataata aagaaaaata tccgttttac tgaattttta tattaattta tcagtgtata
 3781 gtttctatta caataattgc aataatttct ttgggtattt ccattttagg aatgaaaaa
 3841 ttaaataatg tgacacaatg aattccgctt cgttttttta atacattatt tagaataatt
 3901 ccaacaatca tttttattta tttattttct atcttttgaa taggaactaa tataatttta
 3961 ttagtagcag tgataactgc attacgtaaa tccactagtt tagttaaaca attaaatgaa
 4021 agtattaatt caattaattg agaaatata aagactttag aaattcaagg taaaagtaaa
 4081 tttcaaagaa ttatcaaatt tgtttttcca tctataaaaa aagattattt atcattttta
 4141 ctattttact ttgaaaatca agttcaaaca ttaattttat taggttcagt tggcgggtct
 4201 ttattagggt caaaaataag tattgtaggc caagcaggag aaagaacaga aaacatcttg
 4261 gagttgatga cttactcttg aattagttga gtttttatag caattattca actcttgcaa
 4321 ttctatttta atctaattgt tcaaaaataa aaaattagcc aactttatct aattaaaaat
 4381 ttaaataactt attttacaaa aattaaagta atatttaaaa ataaatttag ttcagatcaa
 4441 taataaaaaa acaacaagaa ttacttgagg tgataccctt ttcttgaaaa aagtttttga
 4501 gtgtttta at taattataat ttgaaatgaa tgtttccctg aatttaattg gagacattca
 4561 ttttatttta tctttaattc gtttgaatt gtaataataa atataatttg caattgcttt
 4621 gtgaaattgt ttaaaagtta aaaattcttt ttcgcgacca taaaaacatt ctctttttaa
 4681 tgtcccaaaa aatgattcaa taatgctatt atctaaacaa tttccttttc gagacatgga
 4741 ctgagttatt cttttttggt ttaatttttc tgaaaattgt ttatggtgat gttgtcaacc
 4801 ttgatcactg tgaaaaatta aaccttcaag atttttgtgc tttgaaaatg ctctttgaag
 4861 catttttcta atttgcttgt tattagcgtc tgtagacaag tctcaagcaa taacttcgcc
 4921 attaaacata tctaaaattg gcgataaata tgcttttcca aatggtccgc taaattcagt
 4981 tacatctgta gttcattttt gatttggttg agtagcaaca aaatttctat ttaaaatatt
 5041 gtctgcaatt ttgcccaact ttcctttgta agatttgtat tttcttctag aacaaattgc
 5101 tttgagattg aattttttca ttaatctgcg aactttttta aatccaattt tatattctct
 5161 attattaagt tcagctttta ttcttctttt tccatatctt actttatttt cttcaaaaat
 5221 aagcttgggc tgagtcga

**ANNEXE III:
EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE DE *M.*
HYOPNEUMONIAE UTILISANT LA TROUSSE
TRIPURE™**

EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE DE *M. HYOPNEUMONIAE* AVEC LA TROUSSE TRIPURE™

1. Pour chaque 50-100 mg de poumon, ajouter 1 ml de réactif "TriPure".
2. Homogénéiser le tissu.
3. Incuber à température de la pièce pendant 5 minutes.
4. Ajouter 0,2 ml de chloroforme pour chaque 1 ml de réactif "TriPure".
5. Agiter vigoureusement.
6. Incuber les tubes à température de la pièce pendant 5-15 minutes.
7. Centrifuger à 12 000 X g pendant 15 minutes à 4°C.
8. Enlever délicatement le phase aqueuse supérieure, discarder et utiliser l'interphase et la phase inférieure lors des étapes suivantes.
9. Ajouter 0,3 ml de 100 % ethanol pour chaque 1 ml de réactif "TriPure".
10. Agiter.
11. Incuber à température de la pièce pendant 2-3 minutes.
12. Retirer et jeter le surnageant.
13. Ajouter 0,1 M de citrate de sodium dans 10 % éthanol au culot. Utiliser 1 ml de citrate pour chaque 1 ml de réactif "TriPure".
14. Incuber à température de la pièce pendant 15-30 minutes, en agitant occasionnellement les échantillons.
15. Centrifuger à 2000 X g pendant 5 minutes à 4°C.
16. Retirer et jeter le surnageant.
17. Répéter les étapes 13 à 16 deux autres fois.
18. Laver le culot avec de l'éthanol 75 %. Utiliser 1,5 à 2 ml d'éthanol pour chaque 1 ml de réactif "TriPure".
19. Incuber à température de la pièce pendant 10-20 minutes, en agitant occasionnellement les échantillons.
20. Retirer et jeter le surnageant.
21. Enlever l'excès d'éthanol de chaque culot d'ADN par séchage dans un vaccum.
22. Ajouter 300 µl de 8 mM NaOH.
23. Dissoudre le culot.

24. Ajouter 19,8 μl de 0,1 M HEPES.

25. L'ADN peut être directement amplifié par PCR ou être conservé à -20°C .

**ANNEXE IV:
LISTE DES PRÉSENTATIONS ET SÉANCES
D’AFFICHES**

PRÉSENTATIONS ET SÉANCES D’AFFICHES

1. **J. Caron**, M.Ouardani, B. Ben Abdel Moumem et S.Dea (1998): Diagnostic de l’infection par *Mycoplasma hyopneumoniae* par amplification enzymatique des gènes codant pour deux protéines immunodominantes (p36 et p46). Journées de recherche et Colloque en productions animales du Québec (CPAQ). Ste-Foy, Québec, p.116.
2. **J. Caron**, M. Ouardani, B. Ben Abdel Moumem, K. Cheikh Saad Bouh and S. Dea (1998): Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs by PCR amplification of DNA fragments of the p36 and p46 genes. 79th Conference of Research Workers in Animal Diseases (CRWAD). Chicago, Illinois, USA, abstract : P96.
3. **J. Caron**, M. Ouardani, K. Cheikh Saad Bouh and S. Dea (1999): Molecular diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs by a multiplex PCR assay. 49th Annual meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM). Montréal, Québec, abstract : VM-5.
4. **J. Caron**, K. Cheikh Saad Bouh, F. Shareck, N. Sawyer and S. Dea (1999): Specificity of hyperimmune serum and monoclonal antibodies to recombinant p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 49th Annual meeting of the Canadian Society of Microbiologists (CSM). Montréal, Québec.
5. **J. Caron**, M. Ouardani and S. Dea (1999): Multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs. 42nd Annual meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD). San Diego, California, USA.
6. **J. Caron**, K. Cheikh Saad Bouh, B. Ben Abdel Moumen, N. Sawyer and S. Dea (1999): Species-specific monoclonal antibodies to the *E. coli*-expressed p36 cytosolic protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 42nd Annual meeting of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (AAVLD). San Diego, California, USA.

**ANNEXE V:
ACCUSÉS DE RÉCEPTION DES ARTICLES**

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
Journals Department

1325 MASSACHUSETTS AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-4171
TEL: (202) 737-3600
FAX: (202) 942-9355

Dr. S. Dea
Institut Armand-Frappier
Centre de Microbiologie et
Biotechnologie
531 Boulevard des Prairies
Laval, Quebec H7N 4Z3
CANADA

14 September 1999
Received: 09/13/99
Article: JCM 1112-99

Title: Detection and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* Infections in Pigs by PCR Amplification of the p36 and p46 Genes

The above manuscript has been received. It is being referred to Dr. Andrew B. Onderdonk, Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115-5804 (phone 617-525-2270, fax 617-731-1541), who will notify you as to its acceptability or suggestions for improvement. In any communications relating to this paper, please refer to the article number shown above.

In submitting this manuscript to the *Journal of Clinical Microbiology*, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If "in press" references cited in the submitted manuscript are important for it to be judged, send three copies of each to Dr. Onderdonk immediately. Failure to do so may delay the review.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance.

If the manuscript is accepted, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$30 per page for the first four pages and \$42 for each page in excess of four. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, immediately after receipt of this letter. This request must indicate how the work was financed and should be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper. Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Victoria A. Cohen
Production Editor
*Journal of
Clinical Microbiology*

Enclosure

cc: All authors

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
Journals Department

1325 MASSACHUSETTS AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005-4171
TEL: (202) 737-3600
FAX: (202) 942-9355

Dr. S. Dea
Institut Armand-Frappier
Centre de Microbiologie et
Biotechnologie
531 Boulevard des Prairies
Laval, Quebec H7N 4Z3
CANADA

17 September 1999
Received: 09/14/99
Article: JCM 1128-99

Title: Species-Specific Monoclonal Antibodies to *E. coli* Expressed p36 Cytosolic Protein of
M. hyopneumoniae

The above manuscript has been received. It is being referred to Dr. Andrew B. Onderdonk, Channing Laboratory, 181 Longwood Avenue, Boston, MA 02115-5804 (phone 617-525-2270, fax 617-731-1541), who will notify you as to its acceptability or suggestions for improvement. In any communications relating to this paper, please refer to the article number shown above.

In submitting this manuscript to the *Journal of Clinical Microbiology*, the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If "in press" references cited in the submitted manuscript are important for it to be judged, send three copies of each to Dr. Onderdonk immediately. Failure to do so may delay the review.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance.

If the manuscript is accepted, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$30 per page for the first four pages and \$42 for each page in excess of four. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, immediately after receipt of this letter. This request must indicate how the work was financed and should be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper. Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Victoria A. Cohen
Production Editor
*Journal of
Clinical Microbiology*

Enclosure

cc: All authors



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

Journals

28 September 1999
RE: JCM manuscript

Dr. S. Dea
Institut Armand-Frappier
Centre de Microbiologie et
Biotechnologie
531 Boulevard des Prairies
Laval, Quebec H7N 4Z3
CANADA

Title: Species-Specific Monoclonal Antibodies to E. coli
Expressed p36 Cytosolic Protein of M. hyopneumoniae

Dear Dr. Dea:

Dr. Andrew Onderdonk, editor in chief of the Journal of Clinical Microbiology (JCM), feels that your manuscript is not within the scope of JCM and recommends transfer to Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (CDLI). Dr. Steven Douglas, editor in chief of CDLI, agrees. I am holding your paper pending your instructions. My fax number is (202) 942-9355.

Sincerely,

Victoria A. Cohen
Production Editor
Journal of Clinical
Microbiology

VAC/ktg

1325 Massachusetts Avenue, NW • Washington, DC 20005-4171
tel: 202-737-3600 • fax: 202-942-9355

