

# Développement d'un test PCR permettant la détection de *Coxiella burnetii* et des *Chlamydiaceae*

## Development of a PCR diagnosis for the detection of *Coxiella burnetii* and *Chlamydiaceae*

C. MAINGOURD (1), P. NICOLLET (1), E. SELLAL (2)

(1) Laboratoire Vétérinaire Départemental des Deux-Sèvres, 210 Av. de la Venise Verte – BP570, 79022 NIORT Cedex

(2) Laboratoire Service International, Le Sémanet IV – 1 bis allée de la Combe, 69380 LISSIEU

### INTRODUCTION

La fièvre Q est une zoonose cosmopolite. L'agent pathogène, *Coxiella burnetii*, est une petite bactérie Gram négatif qui fait partie de la famille des rickettsies. La Chlamydie est due à une bactérie Gram négatif appartenant au genre *Chlamydomphila*. Ces deux bactéries provoquent chez les ruminants différentes pathologies. Les avortements sont les manifestations cliniques les plus fréquentes, les plus dangereuses pour la santé humaine et dont les conséquences économiques sont les plus importantes. Le but de ce travail est l'évaluation d'une PCR en temps réel utilisant des amorces spécifiques pour la détection directe de *Coxiella burnetii* et des *Chlamydiaceae* lors d'avortements infectieux chez les ruminants domestiques.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. TRAITEMENTS INFORMATIQUES DES SEQUENCES ADN

Les alignements de séquences ADN ont été réalisés en utilisant le logiciel MultAlin version 5.4.1 (Corpet., 1988). Les amorces et les sondes TaqMan® ont été dessinées grâce au logiciel PrimerExpress (PE Applied Biosystems). Les comparaisons de séquences avec l'ensemble des séquences ADN présentes dans la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894) ont été réalisées en utilisant le logiciel BLAST (Altschuld *et al.*, 1990).

#### 1.2. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les prélèvements de sangs, sérums, liquides amniotiques, placentas et écouvillons vaginaux sont conservés à +4°C pendant 5 jours et ensuite sont congelés. L'ensemble des prélèvements est traité en bactérioscopie par la méthode colorimétrique de Stamp et l'ADN total est extrait puis purifié en utilisant le système QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Allemagne).

#### 1.3. ANALYSES PCR TAQMAN®

Les analyses PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 25µL contenant 5µL d'extrait d'ADN issus des prélèvements. Les réactifs d'amplification sont ceux du kit TaqMan® Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems, USA) complétés avec les amorces (300nM) et les sondes TaqMan® (100nM) spécifiques de *Coxiella burnetii* et des *Chlamydiaceae*. L'amplification et la détection des ADN est réalisée en utilisant le thermocycleur ABI Prism 7000 (PE Applied Biosystems, USA) et le programme de thermocyclage suivant : 95°C pendant 10 minutes puis 45 cycles comprenant 95°C – 15 secondes et 60°C – 1 minute.

### 2. RESULTATS

La spécificité des séquences d'ADN (amorces) choisies a pu être évaluée dans un premier temps par comparaisons informatiques avec les banques de séquences d'ADN du NCBI. Les alignements de séquences ont montré que nos

amorces PCR présentent 100% d'homologies avec *Coxiella burnetii* et avec les 9 espèces de *Chlamydiaceae*. Dans un deuxième temps, nous avons confronté notre test PCR avec de l'ADN provenant de souches de *Coxiella burnetii* Nine Mile et de *Chlamydomphila psittaci* et *abortus*. Nous obtenons une courbe d'amplification typique pour chaque extrait d'ADN. Nous avons également réalisé l'analyse en utilisant l'ADN de 25 espèces bactériennes pouvant être présentes dans le prélèvement. Aucune réaction croisée n'a été observée. Ensuite, nous avons traité un total de 101 échantillons issus d'avortements chez des ruminants domestiques. Pour éviter d'obtenir des résultats faussement négatifs, l'amplification d'un fragment d'ADN de la GAPDH endogène au prélèvement a été utilisée comme contrôle interne d'extraction et d'amplification. Ces échantillons ont été traités simultanément par la méthode colorimétrique de Stamp. Sur les 101 prélèvements, 9 colorations de Stamp sont positives et 92 sont négatives. Le diagnostic par PCR nous a donné 41 échantillons positifs en fièvre Q, 3 positifs en Chlamydie et 57 négatifs.

### 3. DISCUSSION

Le test que nous avons mis en œuvre permet de reconnaître spécifiquement les génogroupes de *Coxiella burnetii* et des *Chlamydiaceae*. Cependant, nous n'avons pas soumis notre test à l'ensemble des espèces de *Chlamydiaceae* connues. Néanmoins, les espèces de *Chlamydomphila* reconnues pour être responsables d'avortements chez les ruminants sont essentiellement *Chlamydomphila abortus* et *psittaci*. L'addition d'un contrôle interne d'amplification permet de s'affranchir pour chaque extrait de la bonne marche de la réaction et de l'absence d'inhibiteurs de la PCR. Les extraits d'ADN provenant de souches de *Coxiella* et de *Chlamydomphila* n'ayant pas été quantifiés en nombre de bactéries, il nous a été impossible de calculer la limite de détection de notre test PCR. Cette étape doit être prochainement réalisée en collaboration avec le laboratoire LSI de Lissieu.

### CONCLUSION

Les conséquences de la coxiellose et de la chlamydie se traduisent principalement chez les ruminants par des avortements en fin de gestation, des mises bas prématurées et la mise bas à terme d'animaux chétifs qui meurent rapidement. Aucun signe clinique spécifique ne permet de s'orienter vers ces pathologies. Seul le diagnostic direct à partir des produits de l'avortement permet de détecter la nature de l'infection. Les résultats de cette validation permettent de montrer que le diagnostic par PCR en temps réel est spécifique, sensible, rapide et peut-être utilisé pour mettre en évidence les gènes des *Coxiella* et des *Chlamydiaceae* à partir d'un broyat de placenta, de mucus vaginal, de lait ou de fèces.

Corpet F. 1998. Nucl. Acids Res. 16 (22) : 10881-10890.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. 1990. J. Mol. Biol. 215:403-410.