

*Bull. Acad. Vét. de France*, 1996, 69, 197-203

## **Isolement d'une souche de *Mycoplasma pullorum* à partir d'œufs embryonnés de dindes**

par Isabelle KEMPF\*, Fabienne GESBERT\*, Pierre-Yves MOALIC\*,  
Michèle GUITTET\* et Georges BENNEJEAN\*

---

### RÉSUMÉ

La souche mycoplasémique 94254 est isolée d'embryons de dindonneaux morts. Ses caractères biochimiques sont identiques à ceux de *Mycoplasma pullorum* C/CKK et les tests d'inhibition de croissance et immuno-enzymatiques se révèlent positifs vis-à-vis du sérum-anti *M. pullorum*. Son profil protéique est également très voisin de celui de la souche de référence et la souche 94254 entraîne une mortalité embryonnaire après inoculation à l'œuf embryonné de poule. L'isolement de cette souche à partir d'embryons morts de dindes constitue apparemment un phénomène nouveau puisque *M. pullorum* semblait jusqu'alors limité à l'espèce poule et non pathogène pour cette espèce.

**Mots-clés :** *Mycoplasma pullorum* – Embryons de dinde.

### SUMMARY

#### ISOLATION OF A *MYCOPLASMA PULLORUM* STRAIN FROM EMBRYONATED TURKEY EGGS

The mycoplasmal strain 94254 was isolated from dead turkey embryos. Tests showed that this strain was biochemically identical and antigenically related to *Mycoplasma pullorum* strain C/CKK. The protein patterns of 94254 and *M. pullorum* reference strains were very similar. Inoculation of 94254 strain into chicken embryonated eggs resulted in mortality. Isolation of this strain from dead turkey embryos seems to be a new phenomenon since *M. pullorum* was, up to now, considered as non pathogenic and restricted to chickens.

**Key-words :** *Mycoplasma pullorum* – Turkey embryo.

---

\* CNEVA-Ploufragan – Unité de Mycoplasmiologie – Bactériologie Zoopôle, BP 53 – 22440 Ploufragan France.

## INTRODUCTION

*Mycoplasma gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) et *M. iowae* (MI) constituent à l'heure actuelle les principaux mycoplasmes réputés pathogènes de la dinde. D'autres espèces mycoplasmaïques apparemment non pathogènes, telles que *M. cloacae*, *M. gallinaceum*, *M. gallopavonis*, *M. iners* ou *M. lipofaciens* peuvent être isolées en l'absence de pathologie associée (9). Cependant, en 1994, nous avons eu l'occasion d'isoler une espèce mycoplasmaïque, autre que celles précédemment citées, à partir d'embryons de dindes morts, issus d'un troupeau indemne de MG, MS, MM et MI. Le présent article décrit les circonstances de cet isolement et les caractéristiques de la souche isolée.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

**Animaux :** 12 œufs embryonnés, morts entre le 15<sup>e</sup> et le 21<sup>e</sup> jour d'incubation, sont prélevés pour recherche de mycoplasmes par culture. Ces œufs ont été pondus par les dindes d'un troupeau indemne de MG, MM, MS et MI. Pour ce lot de dindes, ainsi que, par la suite, pour les dindonneaux issus de ce lot, les examens sérologiques effectués par agglutination rapide sur lame ou test immuno-enzymatique et les recherches de mycoplasmes par culture à partir d'écouvillons cloacaux ou trachéaux se sont toujours révélés négatifs.

**Souches :** les souches de référence utilisées sont les suivantes : *Mycoplasma gallisepticum* ATCC 15302, *Mycoplasma gallisepticum* A5969, *Mycoplasma synoviae* WVU 1853, *Mycoplasma pullorum* C/CKK, *Mycoplasma glycophilum*, *Mycoplasma gallinaceum* D/DD, *Mycoplasma gallinarum* ATCC 19708, *Mycoplasma iners* ATCC 15969, *Mycoplasma anatis* ATCC 25524, *Mycoplasma meleagridis* ATCC 25294, *Mycoplasma gallopavonis* WR1, *Mycoplasma iowae* 1695 et *Acholeplasma laidlawii* PG8 et *Acholeplasma axanthum*.

**Culture de mycoplasmes :** le milieu utilisé pour l'isolement ou la culture des mycoplasmes est le milieu FM4 (8) contenant de l'extrait de levure et du sérum de porc.

**Tests biochimiques :** les tests biochimiques sont effectués selon des techniques précédemment décrites (17). Les caractères étudiés sont la sensibilité à la digitonine, la recherche du métabolisme du glucose ou de l'arginine, la réduction des sels de tétrazolium, l'activité phosphatase, la production de films et spots et la possibilité de culture sur milieu sans Nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) ni L-cystéine.

**Tests sérologiques :** une technique immuno-enzymatique est effectuée sur membrane de filtration à l'aide de l'appareil Minifold-

Apparatus (Cera Labo) selon la technique de Poumarat (18). Des tests d'inhibition de croissance sont réalisés selon la méthode de Clyde (6).

**Préparation et analyse des échantillons de protéines cellulaires totales :** les protéines cellulaires totales de mycoplasmes sont préparées comme décrit précédemment (11), avant d'être soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12,5% selon la technique décrite par LAEMMLI (15).

**Détermination de la sensibilité à différents antibiotiques :** les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de la spiramycine, de la tylosine, de la josamycine, de la tiamuline, de l'érythromycine et de l'enrofloxacin sont déterminées à l'aide de tests d'inhibition du métabolisme (12).

**Étude du pouvoir pathogène :** L'étude du pouvoir pathogène est réalisée par inoculation sur œufs embryonnés de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiés. Pour chaque souche testée, trois dilutions sont testées en inoculant 20 œufs embryonnés de sept jours par voie intra-vitelline à l'aide de 0,1 ml de culture de mycoplasmes titrant approximativement  $10^7$ ,  $10^3$  ou  $10^5$  unités changeant couleur. Les œufs sont mirés tous les jours. Tous les embryons morts ou survivants sont examinés, les lésions sont relevées et des cultures pour recherche de mycoplasmes sont réalisées.

## RÉSULTATS

**Isolement de la souche 94254 :** le vitellus des embryons de dindes morts est prélevé et mis en culture sur milieu FM4 liquide ou gélosé. Des subcultures sont effectuées à partir de cinq tubes montrant une acidification du milieu après 24 heures d'incubation, ainsi qu'à partir des 7 autres tubes présentant un léger trouble sans acidification après sept jours d'incubation. Des colonies d'aspect mycoplasmaïque sont observées en 24 heures sur les boîtesensemencées à partir des cinq tubes acidifiés et de cinq des sept autres tubes.

Pour chaque embryon, deux colonies sont clonées trois fois par repiquages successifs de colonies isolées et filtrées sur  $0,22 \mu\text{m}$ .

**Caractères culturels :** les différents clones cultivent sur milieu FM4 en 24 à 48 heures et donnent des colonies circulaires et bombées sans point central. L'aspect des colonies demeure inchangé même après trois passages sur gélose FM4 ne contenant pas d'antibiotique. Les clones peuvent être cultivés en l'absence de NAD et L-cystéine et la culture est possible après filtration sur membrane de porosité  $0,45 \mu\text{m}$ .

**Caractères biochimiques :** tous les tests biochimiques sont réalisés en présence de témoins positifs et négatifs. Les caractères biochimiques de tous les clones étudiés sont identiques. La suite de l'article concerne donc

la description de l'un de ces clones dénommé 94254. La souche 94254 se montre sensible à la digitonine (1,5% P/V), utilise le glucose mais n'hydrolyse pas l'arginine et ne présente pas d'activité phosphatase. Elle ne réduit pas le chlorure de 2-3-5 tétrazolium et ne produit pas de films et spots sur milieu contenant une émulsion de jaune d'œuf.

Cet ensemble de caractères est identique à ceux présentés par deux espèces de mycoplasmes des volailles, à savoir *M. gallinaceum* et *M. pullorum* (nous avons privilégié pour les tests présentés ci-après la comparaison de la souche 94254 à ces deux espèces).

**Tests sérologiques :** La souche 94254 est analysée selon une technique immuno-enzymatique à l'aide des sérums de lapins hyperimmuns dirigés vis-à-vis des espèces de mycoplasmes aviaires présentant des caractères biochimiques voisins, à savoir : *M. pullorum*, *M. gallinaceum*, *M. anatis*, *M. glycyphilum*, *M. gallopavonis*, *M. meleagridis*, *M. iowae* et *M. colombo-borale*. Seul le sérum anti-*M. pullorum* C/CKK donne une réaction positive.

**Test d'inhibition de croissance :** la souche 94254 est analysée à l'aide des sérums de lapins hyperimmuns anti-*M. pullorum*, *M. gallinaceum*, *M. gallisepticum* et anti-*M. gallopavonis*. Une zone d'inhibition de 5-6 mm autour du disque est observée uniquement avec le sérum anti-*M. pullorum*. La zone d'inhibition obtenue avec la souche de référence *M. pullorum* C/CKK est également de six mm autour du disque.

**Étude des profils électrophorétiques de protéines cellulaires :** les protéines cellulaires totales extraites à partir des souches 94254, *M. pullorum* C/CKK, *M. gallinarum* et *M. gallisepticum* ATCC 15302 sont déposées sur un même gel d'acrylamide à 12,5%. Les profils obtenus pour la souche 94254 sont très proches de ceux de la souche de référence de *M. pullorum* et diffèrent des autres souches testées (résultats non montrés).

**Détermination des concentrations minimales inhibitrices de différents antibiotiques :** les CMI de la souche 94254 et de la souche de référence *M. pullorum* C/CKK sont déterminées vis-à-vis de six molécules. Les valeurs obtenues pour ces deux souches sont respectivement : tiamuline : < 0,125 µg/ml et < 0,125 µg/ml, érythromycine : > 32 et > 32 µg/ml, tysoline : 1,4 et 4 µg/ml, josamycine : 0,5 et 1,4 µg/ml, spiramycine : 0,4 et 2,8 µg/ml, et enrofloxacin : < 0,125 et 0,17 µg/ml.

**Pouvoir pathogène pour l'embryon de poule :** douze jours après inoculation, la mortalité des œufs non inoculés ou inoculés avec du milieu stérile reste inférieure à 15%. A la même date, pour les œufs inoculés avec la souche de référence de *M. pullorum*, les pourcentages de mortalité varient de 30 à 65% selon le titre de la culture inoculée. Avec l'isolat 94254, la mortalité avoisine 50% quel que soit le titre de la culture inoculée. Les embryons inoculés morts sont de petite taille et des dépôts d'urates sont parfois observés à la surface des membranes vitellines; quelques-uns

présentent un œdème de la tête. Des mycoplasmes présentant les caractères biochimiques de *M. pullorum* sont retrouvés sur les cultures réalisées à partir des vitellus des embryons morts.

### ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

Les résultats présentés ici permettent d'affirmer que la souche mycoplasmaïque isolée d'embryons de dindes morts, indemnes d'autres agents pathogènes, présente les caractères biochimiques et antigéniques de *Mycoplasma pullorum*. A notre connaissance, il semble que l'isolement de *M. pullorum*, à partir d'embryons de dindes morts, soit un phénomène rare, sinon nouveau, et ceci nous a incités à rechercher dans la bibliographie les éléments d'information disponibles vis-à-vis de cette espèce.

En 1958, ADLER et coll. décrivent l'isolement de souches mycoplasmaïques appartenant au sérotype C, à partir de poulets, de poussins de un jour ou de perdrix (1). YAMAMOTO et ADLER (21) montrent que les souches C et Tu isolées d'appareils respiratoires de poulets, fermentent le glucose et le sucrose et réduisent le bleu de tétrazolium. Les autres caractères biochimiques sont décrits par BARBER et FABRICANT (3, 4).

Diverses techniques sérologiques (agglutination, inhibition de l'hémagglutination, inhibition de croissance, inhibition du métabolisme, immunodiffusion en gélose, fixation du complément, immunofluorescence) ont été utilisées en vue de différencier les sérotypes de mycoplasmes des volailles puis de définir les espèces. Ainsi, l'espèce *Mycoplasma pullorum* est définie en 1982 par JORDAN et coll. (10). Cette espèce, dont la souche de référence est la souche C/CKK, possède un génome dont le % de GC est de 29 mol%. La souche fermente le glucose en aérobie et en anaérobie, n'hydrolyse pas l'arginine, ne réduit pas le chlorure de tétrazolium, ne présente pas d'activité phosphatase et ne produit pas de films et spots. Les tests d'inhibition de croissance montrent que seul le sérum homologue inhibe sa croissance mais non les 57 autres antisérums testés parmi lesquels la majorité des sérums spécifiques des espèces mycoplasmaïques aviaires.

En ce qui concerne le pouvoir pathogène expérimental, l'inoculation dans les sinus ou dans la trachée de dindonneaux, de cultures réalisées à partir de deux souches isolées d'exsudats trachéaux de poulet et appartenant au sérogroupe C, n'induit pas de lésions (13). Dans les conditions expérimentales retenues par YODER et HOFSTAD (22), aucun des six isolats de sérotype C testés n'entraîne de mortalité après inoculation à l'embryon de poulet. L'inoculation dans les sacs aériens thoraciques et dans les régions tendineuses du jarret ou de la patte chez le poulet ou chez le dindonneau n'entraîne pas l'apparition de lésions d'aérosacculite ou de

tendinite. En 1976, DIERKS et coll. (7) montrent que l'inoculation à des dindonneaux dans les sacs aériens et dans les sinus infra-orbitaux entraîne l'apparition de lésions d'aérosacculite modérées à moyennes.

Plusieurs études décrivent les résultats de recherches de mycoplasmes à partir de volailles domestiques ou sauvages. Au Japon, KOSHIMIZU et coll. (14) isolent quatre souches de sérotype C ou P à partir de cailles communes ou de poulets domestiques. SHIMIZU et coll. (20) rapportent l'isolement de souches appartenant au sérotype C à partir de trachées, d'appareils génitaux ou d'embryons de poulet (*Gallus gallus*) ainsi qu'à partir de faisans (*Phasianus colchicus*). BENCINA et coll. (5) isolent *M. pullorum* à partir de poulets et d'embryons de poulet mais pas à partir de dindes, oies, canards, pigeons ou cailles. En Espagne, *M. pullorum* est également isolé par POVEDA et coll. (19) à partir de poules et de pigeons mais non à partir des autres espèces aviaires testées et appartenant aux Galliformes, Anseriformes, Gruiformes, Passeriformes, Columbigiformes, Falconiformes, Psittaciformes et Trogoniformes. En France, une souche apparentée à *M. pullorum* est isolée à partir de faisans d'élevage par KEMPF et coll. (11). AMIN et JORDAN (2, 9) examinent plusieurs milliers de prélèvements de volailles sans isoler de souches appartenant au sérotype C.

## CONCLUSION

Ainsi, selon les publications recensées ici, *M. pullorum* ne semblait pas, jusqu'à présent, une espèce habituelle chez la dinde et son pouvoir pathogène paraissait limité. Cependant l'appartenance de la souche 94254 à l'espèce *M. pullorum* a pu être récemment confirmée par MOALIC et coll. (16) après détermination et analyse des séquences des gènes d'ARN ribosomiques.

Dans nos conditions expérimentales, la mortalité embryonnaire observée avec la souche 94254 avoisine celle de la souche de référence C/CKK. Cependant, sur le terrain, d'autres souches présentant les mêmes caractères biochimiques et antigéniques ont récemment été isolées à partir de divers troupeaux de dindes reproductrices ou d'embryons de dindonneaux morts. Il est donc impératif d'évaluer maintenant le pouvoir pathogène de la souche 94254 et d'autres isolats "terrain" vis-à-vis de l'espèce dinde, et ce à différents âges. De plus la comparaison des profils d'acides nucléiques digérés par des enzymes de restriction sont actuellement menés pour la souche 94254 ainsi que pour les autres isolats récents de *M. pullorum* afin d'évaluer leurs degrés d'homologie avec l'espèce de référence C/CKK.

## RÉFÉRENCES

- [1] ADLER [H.E.], FABRICANT [J.], YAMAMOTO [R.], BERG [J.]. - Symposium of chronic respiratory disease of poultry. Isolation and identification of pleuro-pneumoniae-like organisms of avian origin. *Am. J. Vet. Res.*, 1958, 19, 440-447.
  - [2] AMIN [M.M.], JORDAN [F.T.W.]. - A comparative study of some cultural methods in the isolation of avian mycoplasma from field material. *Avian Pathology*, 1978, 7, 455-470.
  - [3] BARBER [T.L.], FABRICANT [J.]. - Identification of mycoplasmatales: characterization procedures. *Applied Microbiology*, 1971, 21, 600-605.
  - [4] BARBER [T.L.], FABRICANT [J.]. - A suggested reclassification of avian mycoplasma serotypes. *Avian Diseases*, 1975, 15, 125-128.
  - [5] BENCINA [D.], DORRER [D.], TARDINA [T.]. - Mycoplasma species isolated from six avian species. *Avian Pathology*, 1987, 16, 653-664.
  - [6] CLYDE [W.A.]. - Growth inhibition tests. In RAZIN [S.] and TULLY [J.G.]: *Methods in Mycoplasmaology*, 405-410, *Academic Press*, 1983.
  - [7] DIERKS [R.E.], NEWMAN [J.A.], POMEROY [B.S.]. - Characterization of avian mycoplasmas. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1967, 143, 170-189.
  - [8] FREY [M.L.], HANSON [R.P.], ANDERSON [D.P.]. - A medium for isolation of avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, 1968, 29, 2163-2171.
  - [9] JORDAN [F.T.W.], AMIN [M.M.]. - A survey of mycoplasma infections in domestic poultry. *Res. Vet. Sci.* 1989, 28, 96-100.
  - [10] JORDAN [F.T.W.], ERNO [H.], COTTEW [G.S.], HINZ [K.M.], STIPKOVITS [L.]. - Characterization and taxonomic description of five Mycoplasma serovars (serotypes) of avian origin and their elevation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. *Int. J. Syst. Bact.*, 1982, 32, 108-115.
  - [11] KEMPF [I.], GESBERT [F.], GUINEBERT [E.], GUITTET [M.], BENNEJEAN [G.]. - Isolement et caractérisation d'une souche mycoplasémique chez des faisans d'élevage. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 1991, 167, 1133-1139.
  - [12] KEMPF [I.], OLLIVIER [C.], L'HOSPITALIER [R.], GUITTET [M.], BENNEJEAN [G.]. - Concentrations minimales inhibitrices de 13 antibiotiques vis-à-vis de 21 souches de mycoplasmes de volailles. *Le Point Vet.*, 1989, 20, 83.
  - [13] KLECKNER [A.L.]. - Serotypes of avian pleuro-pneumoniae-like organisms. *Am. J. Vet. Res.*, 1960, 21, 274-280.
  - [14] KOSHIMIZU [K.], MAGARIBUCHI [T.], TANABE [K.], KONO [N.]. - Isolation and characterization of mycoplasmas from gallinaceous birds. *Jap. J. Vet. Sci.*, 1978, 40, 445-449.
  - [15] LAEMMLI [U.K.]. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685.
  - [16] MOALIC [P.Y.], KEMPF [I.], GESBERT [F.], LAIGRET [F.]. - Identification of two pathogenic avian mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*, soumis à *Int. J. Syst. Bacteriol.*
  - [17] NOUGAYREDE [P.], GAILLARD-PERRIN [G.], ANDRAL [B.]. - Apport du laboratoire pour le diagnostic des mycoplasmoses majeures de la dinde. *Le Point Vétérinaire*, 1985, 17, 127-140.
  - [18] POUMARAT [F.], PERRIN [B.], LONGCHAMBON [D.]. - Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF Dot). *Veterinary Microbiology*, 1991, 29, 329-338.
  - [19] POVEDA [J.B.], CARRANZA [J.], MIRANDA [A.], GARRIDO [A.], HERMOSO [M.], FERNANDEZ [M.], DOMENECH [J.]. - An epidemiological study of avian mycoplasma in southern Spain. *Avian Pathology*, 1990, 19, 627-633.
  - [20] SHIMIZU [T.], NUMANO [K.], UCHIDA [K.]. - Isolation and identification of mycoplasmas from various birds: an ecological study. *Jap. J. Vet. Sci.*, 1979, 41, 273-282.
  - [21] YAMAMOTO [R.], ADLER [H.R.]. - Characterization of pleuro-pneumoniae-like organisms of avian origin. *J. Inf. Diseases*, 1989, 102, 243-250.
  - [22] YODER [H.W.], HOFSTAD [M.S.]. - Characterization of avian mycoplasma, *Avian Diseases*, 1964, 8, 481-512.
-