



HAL
open science

Différenciation par le système API 50 CH et électrophorèse des mycoplasmes glucidolytiques isolés chez la chèvre

Y Richard, C Favier, J Oudar

► **To cite this version:**

Y Richard, C Favier, J Oudar. Différenciation par le système API 50 CH et électrophorèse des mycoplasmes glucidolytiques isolés chez la chèvre. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 1991, 22 (4), pp.353-358. hal-00902038

HAL Id: hal-00902038

<https://hal.science/hal-00902038>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Différenciation par le système API 50 CH et électrophorèse des mycoplasmes glucidolytiques isolés chez la chèvre

Y Richard *, C Favier, J Oudar

*École nationale vétérinaire de Lyon, laboratoire associé INRA de recherches sur la pathologie
des petits ruminants, chaire de microbiologie, BP 83, 69280 Marcy-l'Étoile, France*

(Reçu le 15 janvier 1991; accepté le 11 juin 1991)

Résumé — Le système API 50 CH a été utilisé pour différencier entre elles les 4 espèces principales de mycoplasmes glucidolytiques isolées chez les petits ruminants : *M mycoides ssp mycoides*, *M capricolum*, *M putrefaciens*, *M ovipneumoniae*. Cette étude biochimique a été complétée par une analyse électrophorétique. Ces 2 techniques ont permis de distinguer les 4 souches de référence testées. Pour les souches isolées sur le terrain, l'aspect des colonies lors de l'isolement, ainsi que les résultats fournis par le système API 50 CH ont permis de distinguer *M ovipneumoniae* et *M putrefaciens* du groupe *M mycoides* et *M capricolum*. En revanche, les 2 techniques manquaient de spécificité et n'ont pu être généralisées au diagnostic différentiel entre *M mycoides* et *M capricolum*.

mycoplasme / petit ruminant / système API 50 CH / électrophorèse

Summary — Use of Apisystem and electrophoresis for differentiation of glucidolytic mycoplasma from goat. Carbohydrate metabolism of 62 glucidolytic strains of mycoplasma belonging to 4 species (*M ovipneumoniae*, *M putrefaciens*, *M mycoides*, *M capricolum*) has been studied using the API 50 Ch system for bacterial identification. This microtechnique and colony aspect were relevant in distinguishing *M ovipneumoniae* and *M putrefaciens* from the group *M mycoides* and *M capricolum* isolated from goats, but still presented a lack of specificity in distinguishing *M mycoides* from *M capricolum*. Similar results were obtained when the mycoplasma strains were tested by electrophoresis.

mycoplasma / goat / Api 50 CH system / electrophoresis

* Correspondance et tirés à part

Les principaux mycoplasmes glucidolytiques isolés chez les petits ruminants appartiennent aux espèces *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma putrefaciens* et *Mycoplasma mycoides ssp mycoides* (LC).

Classiquement, leur diagnostic différentiel repose sur l'aspect des colonies après isolement et les critères biochimiques proposés par Cottew (1983), complétés en particulier pour *M capricolum* et *M mycoides* par un typage sérologique nécessitant le recours à un laboratoire spécialisé.

Notre objectif était d'adapter aux mycoplasmes glucidolytiques des petits ruminants le système API 50 CH proposé pour les bactéries conventionnelles, le CO₂ n'étant pas nécessaire à leur culture, et de vérifier la possibilité de généraliser cette méthode dans les laboratoires de diagnostic courant.

Cette étude biochimique a été complétée par une analyse électrophorétique à l'image de celle réalisée pour les mycoplasmes aviaires (Antoine et Walen, 1969; Khan *et al*, 1986), qui permet de les classer en différents groupes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des souches

- souche de référence de *M ovipneumoniae*, Y98 (ATCC 29419),
- souche de référence *M mycoides ssp mycoides* Y Goat (LC),
- souche de référence de *M capricolum* California Kid (ATCC 27343),
- souche de référence de *M putrefaciens*, KS1 (ATCC 15718),
- souches du terrain (58), isolées et identifiées au laboratoire, se répartissant de la manière suivante : 27 souches de *M ovipneumoniae*, 11 souches de *M mycoides ssp mycoides* (LC), 13

souches de *M capricolum*, 7 souches de *M putrefaciens*.

Microméthode

La galerie API 50 CH est commercialisée par API System (La Balme Les Grottes, 38390 Montalieu Vercieu), sous la référence 5030.

Les microtubes à ensemercer contenaient des substrats appartenant à une même famille chimique : oses et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

Le milieu servant à inoculer les galeries doit être adapté et choisi parmi les milieux reconnus comme les plus conformes aux exigences nutritionnelles du groupe de micro-organismes étudiés.

Milieux

Milieu de base (milieu MB)

Il s'agit d'un milieu avec base liquide «Mycoplasma Broth Base» (Oxoid, Biolyon, 69570 Dardilly, réf CM 403), ajusté au pH 7,8, auquel on peut ajouter un mélange inhibiteur bactérien n'affectant pas la culture des mycoplasmes glucidolytiques des petits ruminants.

Ce mélange était constitué de 0,125% de méthicilline (SIGMA, réf M1757), 0,025% d'acétate de thallium I (Merck, réf M 12365) et 625 UI de Bacitracine ND (Laboratoire Martinet) pour 100 ml de milieu fini.

Milieu de base enrichi (MBE)

C'est du milieu MB enrichi par 20% de sérum de cheval et 10% d'extrait de levure.

Milieu d'inoculation (MI)

Le milieu MB enrichi de 10% de sérum de cheval a servi à la suspension de mycoplasmes pour inoculation de la plaque et contenait 0,01% de rouge de phénol comme indicateur coloré.

Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été obtenu après centrifugation d'une culture du mycoplasme en milieu liquide.

Le mycoplasme à tester a été repiqué 3 fois sur bouillon et gélose mycoplasme MBE et mis en culture.

La masse bactérienne récoltée provenait de 8 ml de bouillon incubé 48 h à 37 °C pour *M ovipneumoniae* et *M putrefaciens*. Pour *M mycoides* et *M capricolum*, la masse bactérienne récoltée provenait de 4 ml de bouillon incubés 24 h à 37 °C. Le titre était d'environ $1,5 \times 10^7$ unités formant colonie (UFC)/ml.

La culture a été centrifugée 30 min à 10 000 g sur centrifugeuse Beckman J21 C, avec rotor JA 14, dans des tubes de polycarbonate de 10 ml, vissés, stériles.

Après rejet du surnageant, le culot bactérien a été remis en suspension et homogénéisé dans 0,5 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'une pipette Pasteur à extrémité capillaire. On a obtenu approximativement l'opacité du tube n° 4 de Mac Farlan. (API System réf 7090). On a ajouté ensuite 8 ml de milieu M1.

Inoculation de la galerie

La suspension bactérienne a été répartie à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans les 50 tubes de la galerie en respectant les conditions de stérilité et en opérant sous une hotte stérile à flux laminaire.

Lecture de la galerie

Le pouvoir fermentatif a été recherché en anaérobiose selon les recommandations du fabricant en rajoutant de l'huile de vaseline dans chaque cupule. Les dernières lectures ont été réalisées après 6 j d'incubation à 37 °C et ont servi à définir le profil glucidolytique de la souche testée.

Électrophorèse

L'étude des protéines des 4 souches de référence, des 13 souches de *M capricolum* et des 11 souches de *M mycoides* a été déterminée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (Laemmli, 1970), sur un gel de résolution à 10% d'acrylamide et révélation par coloration au bleu de Coomassie R 250. Les souches de mycoplasmes ont été cultivées en milieu liquide

(MBE), concentrées par centrifugation, lavées en PBS et conservées à + 4 °C avant électrophorèse afin d'éviter la présence d'agrégats provoqués par la congélation (Antoine et Walen, 1969); la lyse a été effectuée par le mélange dodécyl sulfate de sodium et β mercaptoéthanol porté à 100 °C pendant 5 min.

RÉSULTATS

Étude biochimique

Les 4 souches de référence possédaient 6 caractères positifs communs : glucose, mannose, maltose, amidon, glycogène, turanose.

Elles se différençaient entre elles par 5 autres caractères (tableau I).

La généralisation du système API 50 CH à un plus large échantillonnage n'a pas confirmé ces résultats :

- sur 13 souches de *M capricolum*, 3 n'utilisaient pas le tagatose et 8 hydrolysaient le sorbitol;

- par contre, sur 11 souches de *M mycoides*, 5 souches étaient tagatose positif et 1 souche sorbitol négatif; l'hydrolyse du tagatose et du sorbitol n'a pu donc être retenue comme caractère de différenciation entre ces 2 espèces;

- de même l'hydrolyse de N-acétylglucosamine n'a pas été un caractère constamment positif pour *M ovipneumoniae* puisque sur les 27 souches testées, 7 se révélaient N-acétylglucosamine négatives de même que les 7 souches de *M putrefaciens*.

Cependant, lorsque l'on a tenu compte de l'aspect des colonies lors de l'isolement et des résultats obtenus par le système API 50 CH, il a été possible de séparer les souches de *M ovipneumoniae* (colonies sans centre) et celles de *M putrefaciens* (colonies avec centre) lorsqu'elles sont fructose⁻, N-acétylglucosamine⁻ des

Tableau I. Différenciation biochimique des 4 souches de référence de mycoplasmes glucidolytiques par le système API 50 CH.

| Souches | Glucides utilisés | | | | |
|---|-------------------|------------|-----------|----------------------|----------|
| | D-fructose | D-sorbitol | Tréhalose | N-acétyl glucosamine | Tagatose |
| <i>M capricolum</i> ATCC 27343 | + | - | - | + | + |
| <i>M mycoides</i> <i>ssp mycoides</i> Y Goat (LC) | + | + | + | + | - |
| <i>M ovipneumoniae</i> ATCC 29419 | - | - | - | + | - |
| <i>M putrefaciens</i> ATCC 15718 | - | - | - | - | - |

souches de *M capricolum* et de *M mycoides* (colonies avec centre et fructose+, N-acétyl-glucosamine+).

Electrophorèse

Les profils électrophorétiques, compris entre 180 et 31 kDa, ont permis de distinguer les 4 souches de référence (fig 1) :

- *M ovipneumoniae* (Y98) s'est caractérisée par 15 bandes protéiques dont les plus nettes se situaient à 114, 75, 48, 41, 40 et 37 kDa;
- *M putrefaciens* KS1 s'est définie par 17 bandes d'égale intensité et l'on a noté l'absence de la P 114 et la P 37 de *M ovipneumoniae*;
- *M capricolum* (CK) a montré 17 bandes, en particulier 6 bandes, à 96, 66, 47, 43 et 33 kDa;
- *M mycoides* (Y Goat) a compté 20 bandes avec en particulier 9 bandes très marquées à 78, 72, 63, 57, 48, 41, 40, 34

et 31 kDa. Parmi elles, il faut retenir les bandes P 63 et P 40/41 qui n'existaient pas chez *M capricolum*, pour lequel on a noté en revanche une bande P 66 bien nette.

Ces différences n'ont cependant pas été retrouvées par l'examen électrophorétique des 11 souches de *M mycoides* et 13 souches de *M capricolum* isolées sur le terrain.

DISCUSSION

Par les tests biochimiques proposés par Cottew (1983), *M ovipneumoniae* et *M putrefaciens* se différencient aisément puisque glucose, arginine, phosphatase, chlorure de tétrazolium, digitonine et sérum coagulé sont positifs pour *M putrefaciens* tandis que *M ovipneumoniae* ne fermente que le glucose. Il n'est pas de même pour *M capricolum* et *M mycoides ssp mycoides*, dont le diagnostic de certitude se heurte à certaines difficultés d'interpréta-



Fig 1. Profil électrophorétique des 4 souches de référence.

tion avec les tests classiques (dégradation lente ou variable de l'arginine).

Les 4 espèces principales de mycoplasmes glucidolytiques utilisent, dans le système API 50 CH, le glucose, le mannose, le maltose, l'amidon, le glycogène et le turanose. *M. ovipneumoniae* se différencie par l'aspect particulier de ses colonies sans centre. *M. capricolum* et *M. mycoides* se singularisent par l'utilisation de la N-acétyl-glucosamine et du fructose.

Donc le système API 50 CH d'utilisation plus pratique, est susceptible d'être employé dans les laboratoires de diagnostic courant pour la différenciation des souches de terrain. Il permet de séparer les mycoplasmes à pouvoir pathogène mineur (*M. ovipneumoniae* et *M. putrefaciens*) des

mycoplasmes pathogènes majeurs (*M. mycoides* et *M. capricolum*).

M. mycoides et *M. capricolum* dont le diagnostic biochimique est parfois incertain par les tests de Cottew, restent tout aussi peu différenciables par le système API 50 CH.

De même le profil électrophorétique réalisé sur les souches de référence de *M. mycoides* et *M. capricolum* permet de les différencier mais cette technique ne peut être généralisée à un échantillon plus large de souches. Notre étude ne confirme pas l'intérêt de cette méthode pour les mycoplasmes caprins, contrairement à ce que rapportent Khan *et al* (1986) et Antoine et Walen (1986) pour les mycoplasmes aviaires.

Par suite, la différenciation de certitude entre *M mycoides* et *M capricolum* nécessite le recours au diagnostic sérologique par les tests d'inhibition de croissance et d'immunofluorescence avec sérum de référence, par un laboratoire spécialisé.

RÉFÉRENCES

- Antoine O, Walen PH (1969) Identification des mycoplasmes isolés dans les voies respiratoires des oiseaux de basse-cour. *Rech Vét (Paris)* 3, 13-40
- Cottew GS (1983) Recovery and identification of caprine and ovine mycoplasmas. In: *Methods in mycoplasmaology* n° 2 (Barile MF, Tully JG, eds) Academic Press, New York, 91-104
- Khan MJ, Lam KM, Yamamoto R (1986) *Mycoplasma gallisepticum* strain variations detected by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Dis* 31, 315-320
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227, 680-685