



HAL
open science

Extraction d'ADN et amplification PCR sur des poussières prélevées en élevages de ruminants et en lieux publics : exemple du projet EXPAIRCOX

Elsa Jourdain, Michael Treilles, Séverine Barry, Cyril Maingourd, Marie Massot, Virginie Thibault-Poisson, Lucie Pineau, Florence Tardy, Pauline Chaigneau, Alice Jardin, et al.

► To cite this version:

Elsa Jourdain, Michael Treilles, Séverine Barry, Cyril Maingourd, Marie Massot, et al.. Extraction d'ADN et amplification PCR sur des poussières prélevées en élevages de ruminants et en lieux publics : exemple du projet EXPAIRCOX. Rencontres de santé publique vétérinaire Tours, Sep 2021, tours, France. hal-03358062

HAL Id: hal-03358062

<https://hal.inrae.fr/hal-03358062>

Submitted on 29 Sep 2021

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Extraction d'ADN et amplification PCR sur des poussières prélevées en élevages de ruminants et en lieux publics : exemple du projet EXPAIRCOX

Elsa Jourdain, Michael Treilles, Séverine Barry, Cyril Maingourd, Marie Massot, Virginie Thibault-Poisson, Lucie Pineau, Florence Tardy, Pauline Chaigneau, Alice Jardin, Maryline Chauvineau, Karine Sommier, Raphaël Lamothe, Renaud Pouget, Maxime Robert, Raquel Cenicerros, Marc Tabouret, Jaqueminie Vialard, Elodie Rousset

Rencontres de santé publique vétérinaire
Tours, 1^{er} octobre 2021



Projet EXPAIRCOX

Amélioration des connaissances sur l'**EX**position **Aé**rienne des professionnels ag**R**icoles et de la population générale à **CO**Xiella burnetii : études épidémiologiques et sociologiques dans une région régulièrement confrontée à la fièvre Q

Détection et caractérisation de *C. burnetii* dans **l'environnement**

→ étude transversale répétée sur **poussières prélevées en élevages et lieux publics**

Perception des risques sanitaires par les parties prenantes → **enquêtes socioanthropologiques**

Bonjour, je rencontre les éleveurs du coin pour voir quelles expériences ils ont avec la fièvre Q. Je peux vous rencontrer ?

ok, dans une heure



VOLET 1



VOLET 2

Estimation de la **fréquence d'infection** de la population

→ enquête de **séroprévalence** chez les **donneurs de sang**



VOLET 3

Identification des **pratiques agricoles** favorisant l'exposition à *C. burnetii*

→ **Études de la dispersion** lors de la manipulation des fumiers en élevages caprins



Projet EXPAIRCOX

VOLET 1

Détection et caractérisation de *C. burnetii* dans l'environnement

→ étude transversale répétée sur poussières prélevées en élevages et lieux publics



Réflexion méthodologique sur l'utilisation des prélèvements de poussière



Elevages de volailles

→ plans de contrôle des salmonelles



Elevages de ruminants



Lieux publics

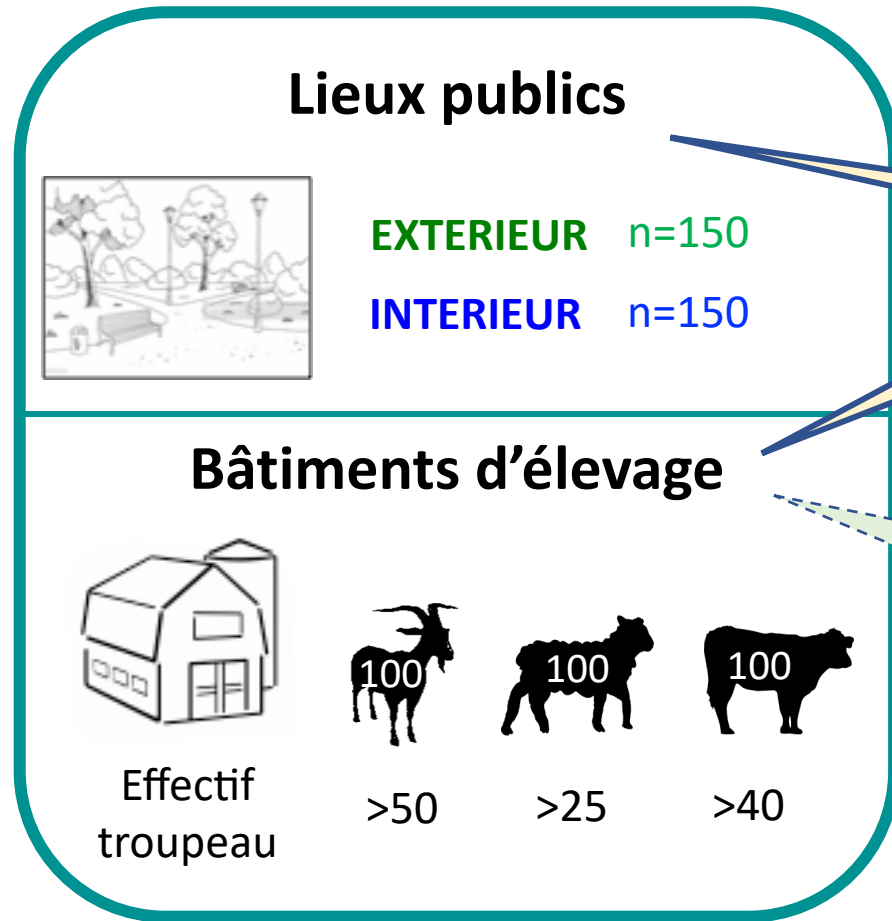
→ contextes de recherche

Enjeu : prélèvement facile à réaliser pouvant servir d'indicateur à l'échelle collective



Verrou méthodologique : difficultés de détection et de quantification car matrice complexe avec présence d'inhibiteurs de PCR

Plan d'échantillonnage EXPAIRCOX (2018-2019)



Analyses PCR pour recherche de :

Coxiella burnetii

Agent de la paratuberculose
Mycoplasmes

Tests exploratoires



Choix du type de prélèvement

Chiffonnette

5 x 1m linéaire

1 chiffonnette
par bâtiment ou
pièce prélevée



Grandes surfaces ++
Grand volume d'échantillon



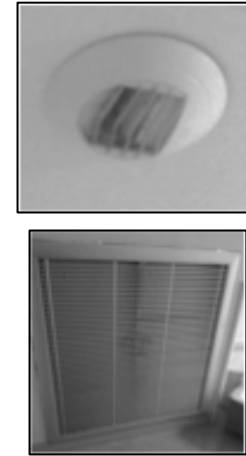
**Implique une mise en suspension
au laboratoire**

- Risque de contamination par aérosols
→ *Tubes contrôles ouverts sous PSM*
- Volume de stockage & de déchets
- Pénibilité des manipulations (*stomacher ?*)



Écouvillon

1 écouvillon par
grille d'aération,
radiateur...



Petites surfaces ++

Nylon/viscose floqué >> coton ⚠️

Milieu de conservation SRK (pour *C. burnetii* → *surtout effet humidification*)



**Effet lieu de prélèvement pour les
grandes surfaces**

→ Critères de choix

- **Support à prélever**
surface, nature → *facilité de réalisation
du prélèvement*
- **Facilité de
manipulation au
laboratoire** et
risques de
contamination par
aérosols
- **Volume de
stockage**

Etapas de traitement du prélèvement

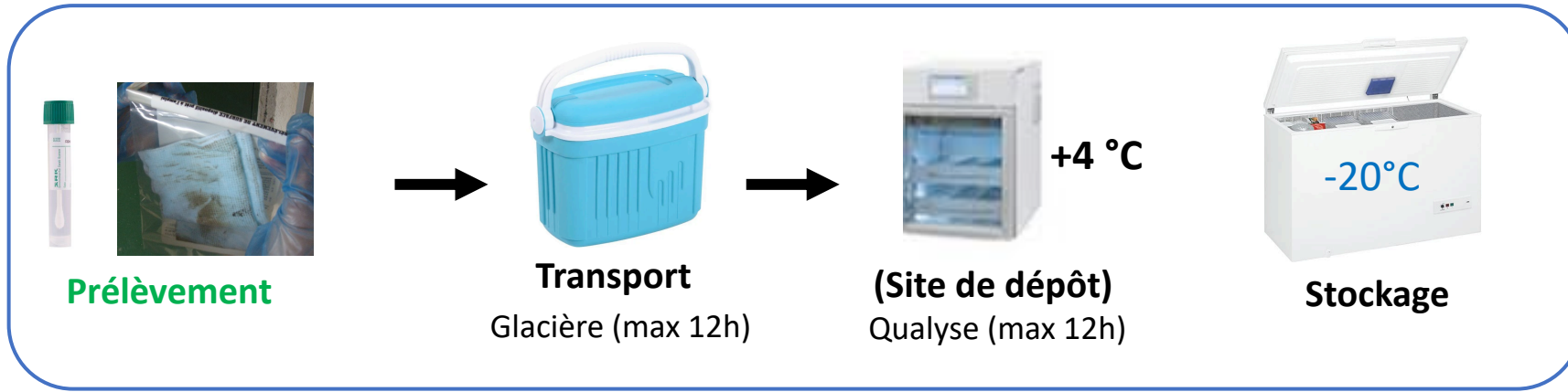


Conditions *a priori* suffisantes pour la détection de

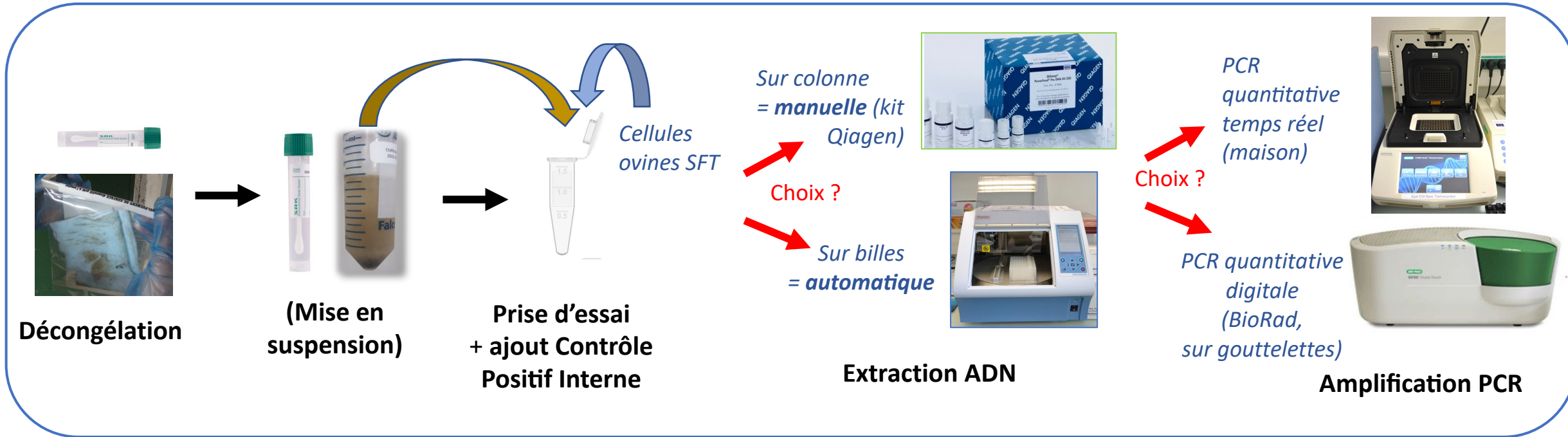
- *C. burnetii*
- *M. paratuberculosis*

⚠ Conditions peu appropriées pour la détection d'autres agents pathogènes tels que mycoplasmes

TERRAIN



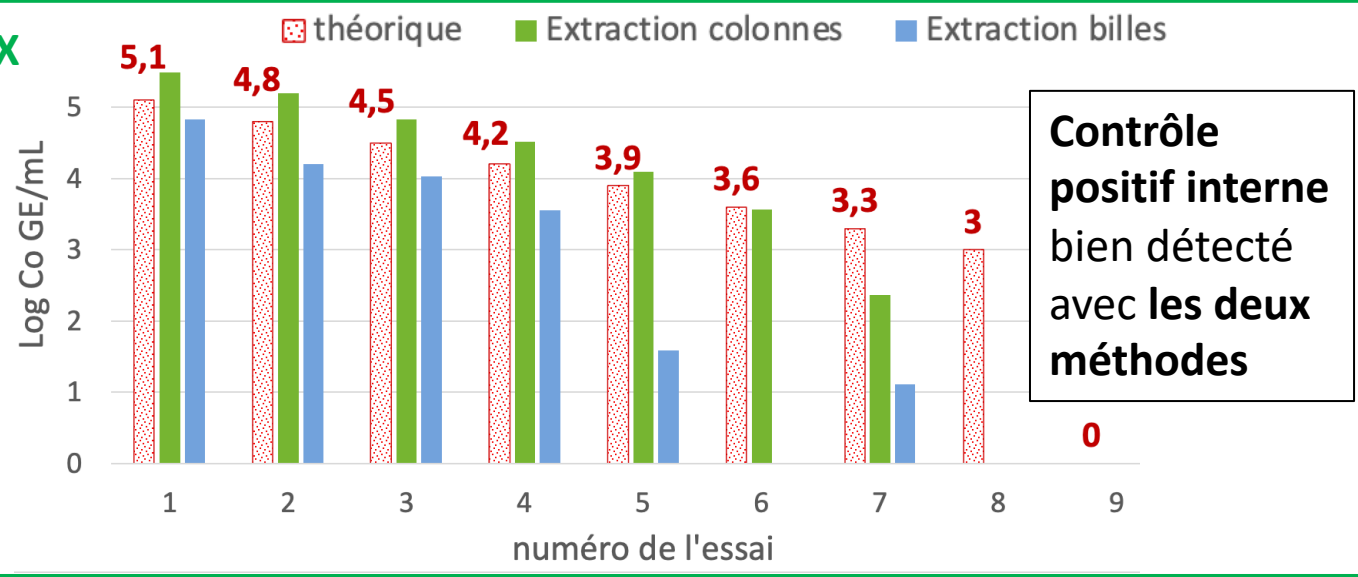
LABORATOIRE



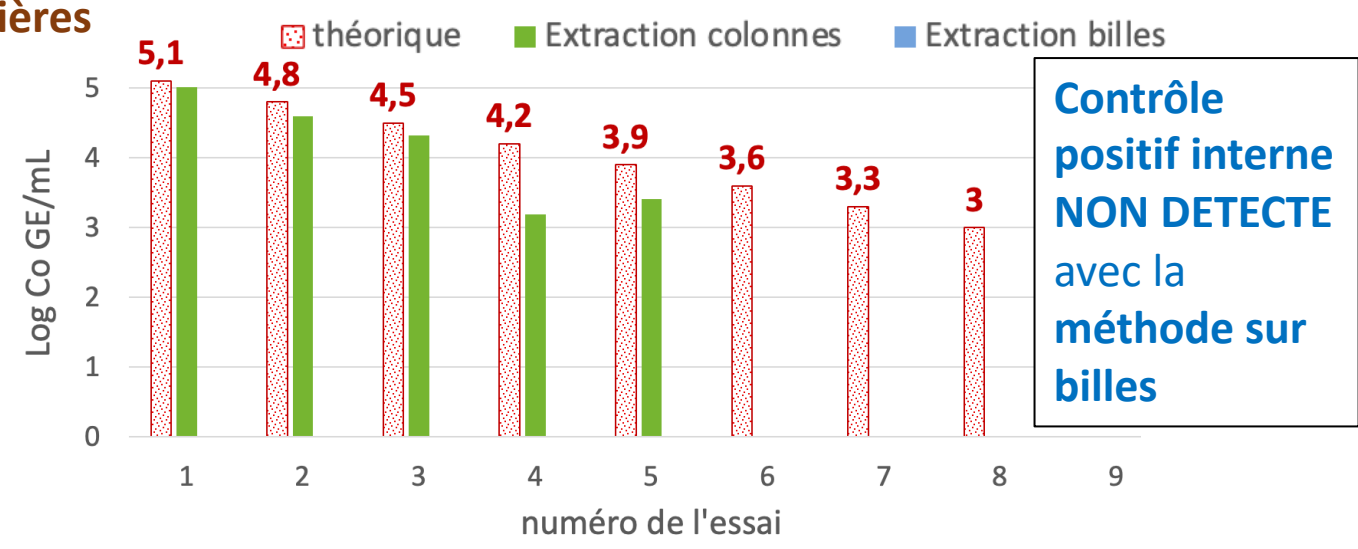
Extraction d'ADN : billes ou colonnes ?

Test PCRq sur pool d'échantillons **dopés avec MR *Coxiella Anses***

PBS 1X



Poussières



Extracteur à billes

- Pipetage ↘
- Contamination ↘



MAIS...

Sur PBS :

- bonne détection de *C. burnetii* ssi forte concentration (limite de détection élevée)
- meilleure amplification du contrôle interne que du gène d'intérêt → *compétition des ADN sur les billes ?*

Sur poussières :

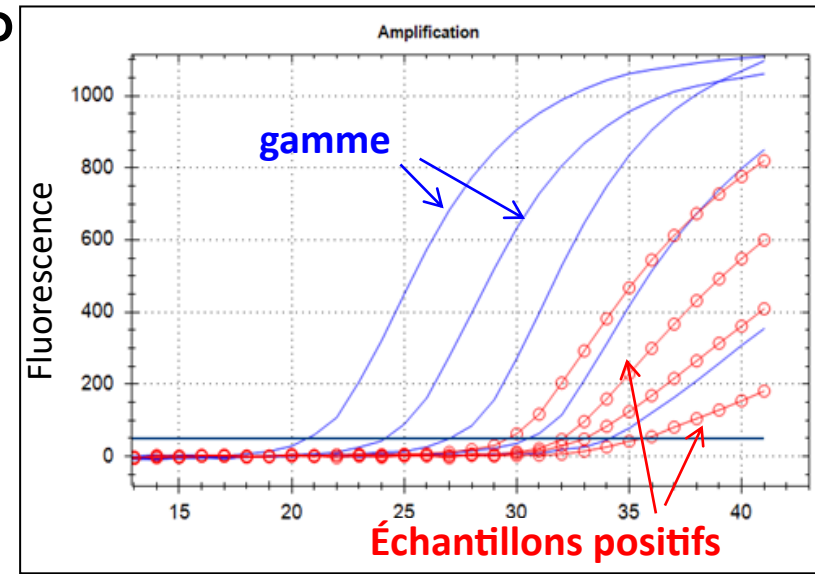
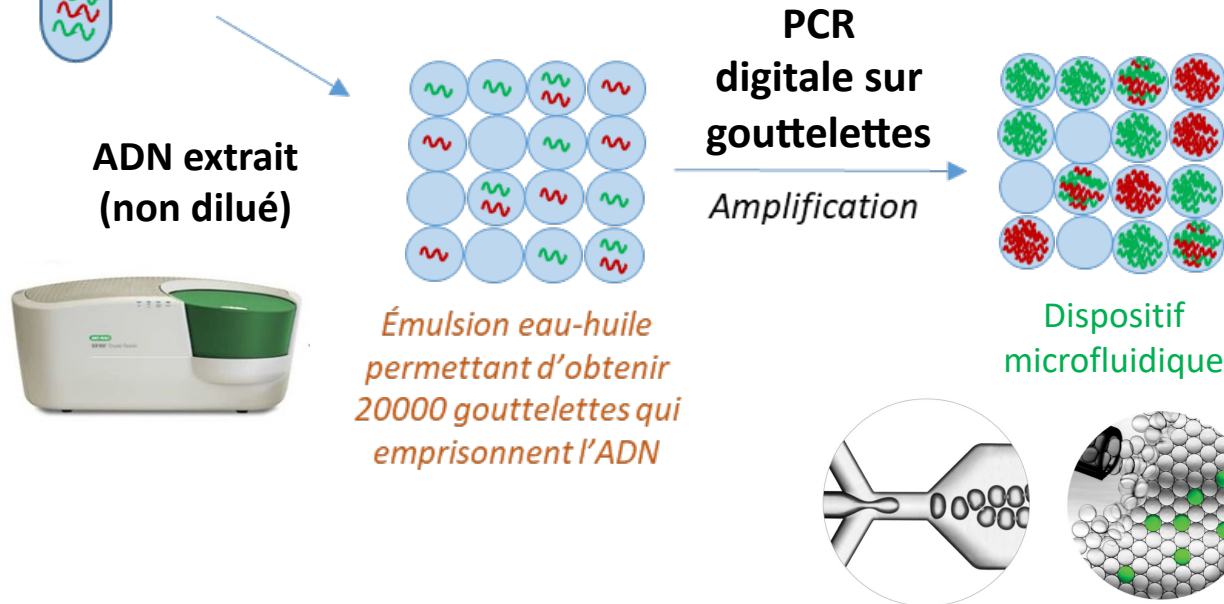
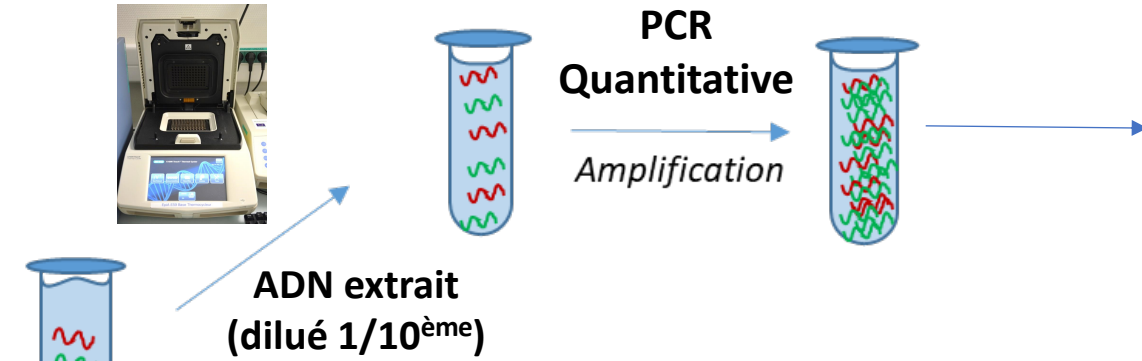
- Inhibition +++



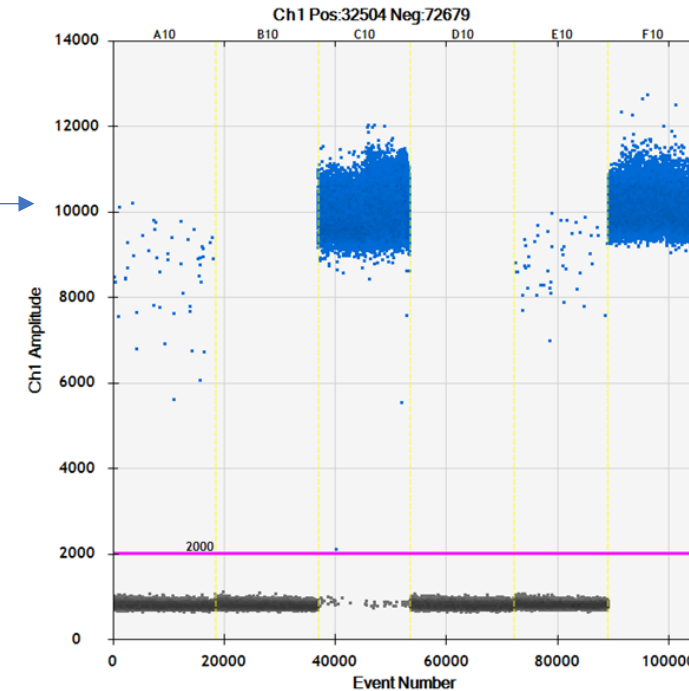
Protocole retenu : extraction sur colonne

PCR quantitative temps réel ou digitale ?

- *C. burnetii* (cible IS1111 – méthode « maison » LNR)
- GADPH ruminant



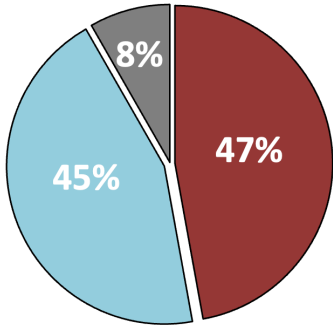
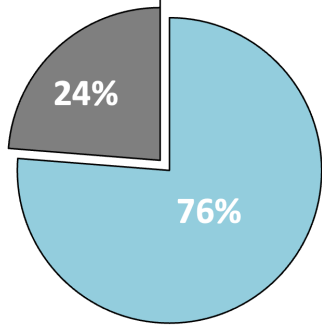
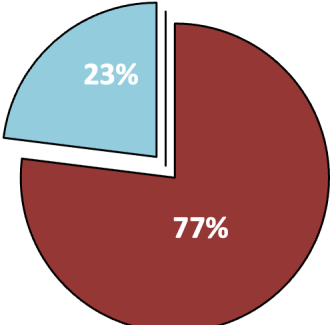
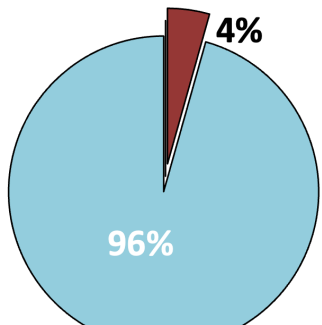


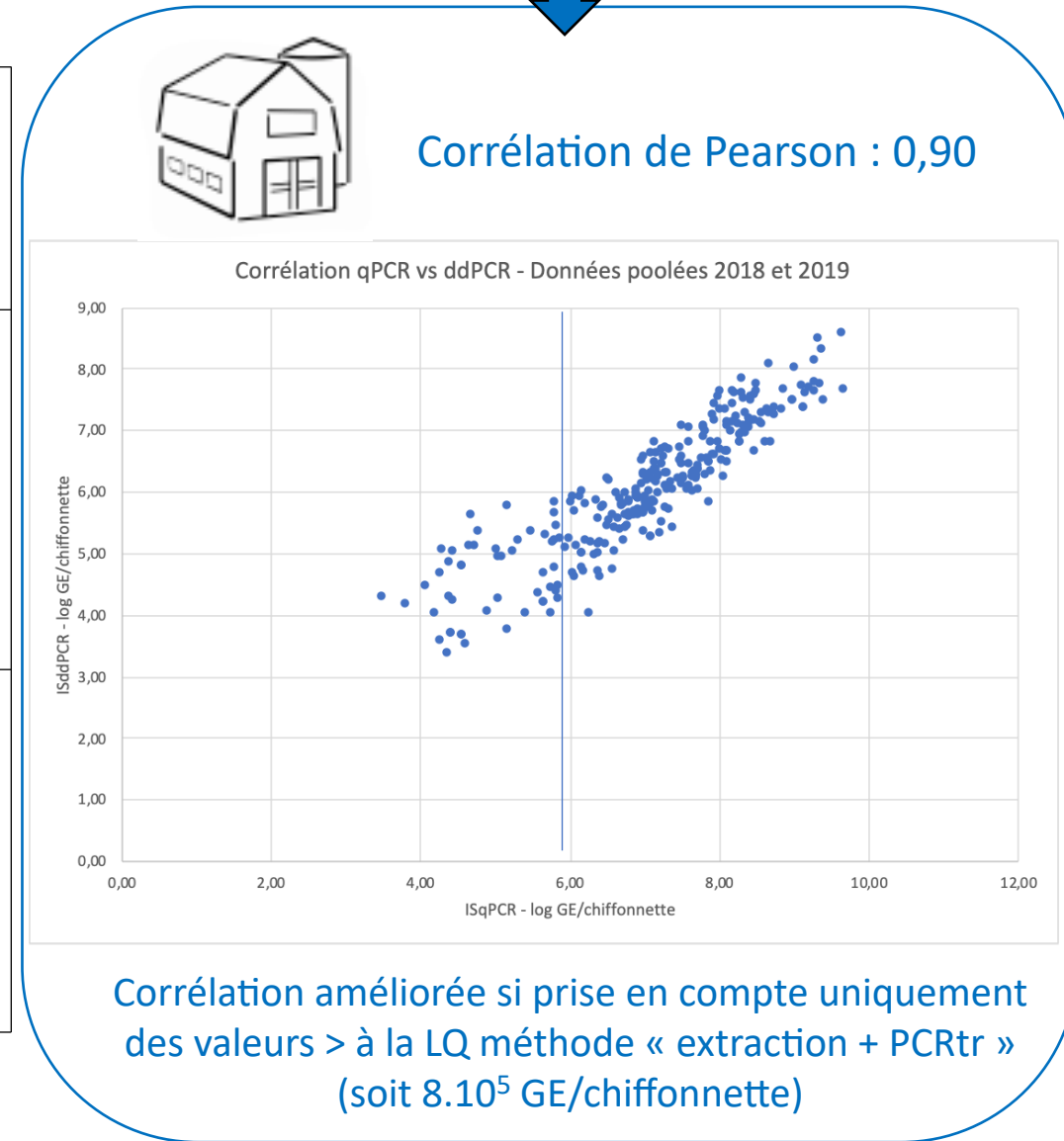
- Valeur Ct si PCR temps réel → non reproductible !
- Quantification en référence à une gamme



- Quantification absolue du nombre de copies (précision ++)
- Réactions PCR dans chaque gouttelette → ↘ risque d'inhibition

PCR quantitative temps réel ou digitale ?

<p><i>Recherche d'ADN de Coxiella burnetii</i> (gène IS1111)</p>	 <p>Elevages n=543</p>	 <p>Lieux publics n=160</p>
<p>PCR quantitative</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ Positifs ■ Négatifs ■ Ininterprétables 		
<p>PCR digitale</p>		

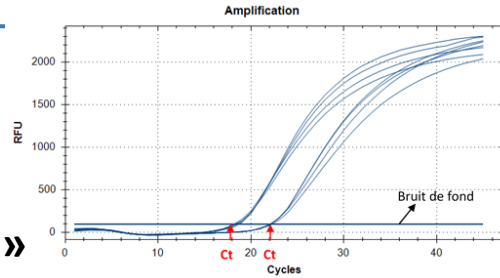


PCR quantitative temps réel ou digitale ?

PCR quantitative



Thermocycleur « classique »



Problèmes d'inhibition +++

- Résultats « non interprétables »
- Dilution : ↘ sensibilité
- Multiplexage CPI : ↘ sensibilité, coût
- Colonnes anti-inhibiteurs (coût, temps)



Dépendance à une gamme

- Préparation
- Stockage



Utilisation des valeurs Ct à proscrire pour des comparaisons inter-labos



**Protocole retenu :
amplification par PCR digitale**

PCR digitale



Générateur de gouttelettes

- disponible uniquement en **plateformes**
- analyses par plaques de 96



Technicité du manipulateur importante

- pour l'obtention d'un nombre de microgouttelettes suffisants et fiables

→ *pas avec méthode nouvelle génération*

→ *technologie BioRad vs Qiagen*



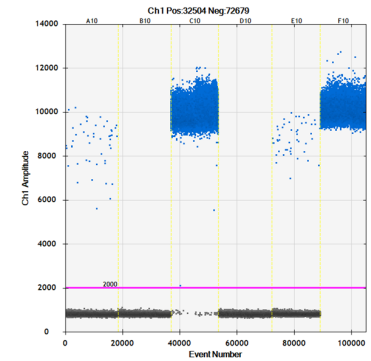
Inhibition limitée

- partitionnement des réactions PCRtr
- **Sensibilité +++**



Quantification absolue

- LQ ???



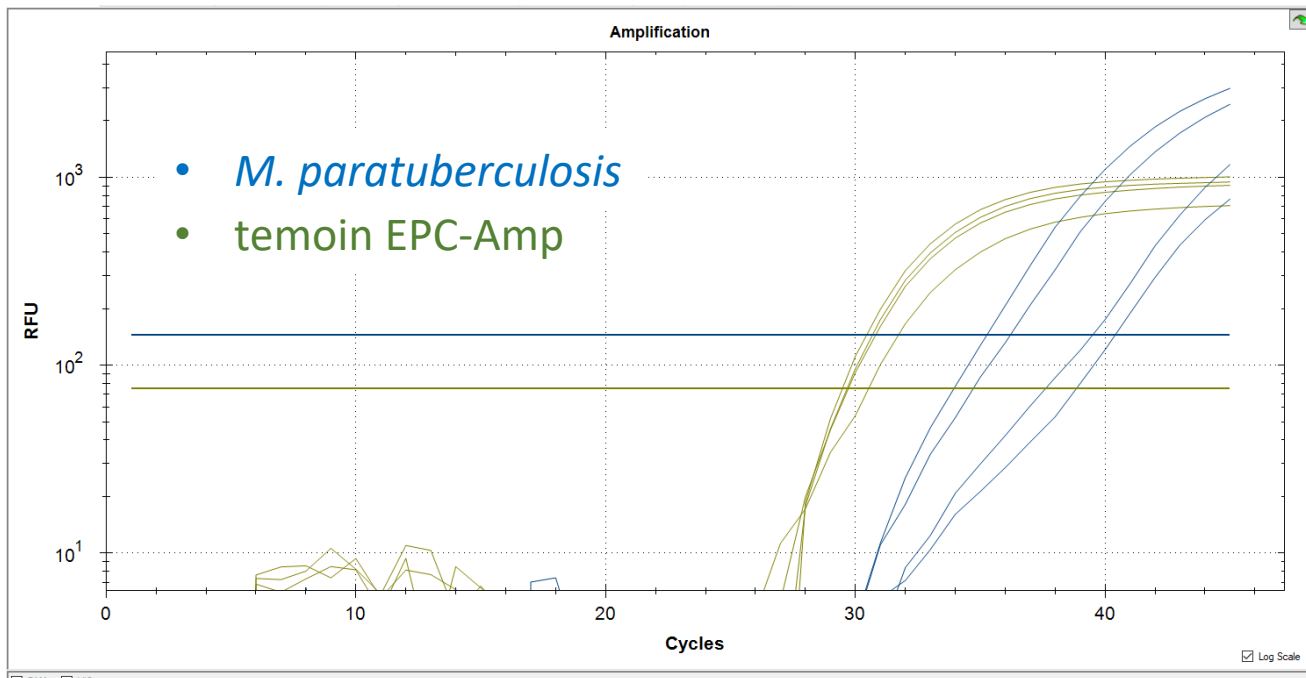
Tests PCR paratuberculose



Poussières de bâtiments d'élevage

Analyse des extraits d'ADN avec le kit PCR *BioX Diagnostics – Adiavet PARATB RealTime*

Valeurs Ct comprises entre 33 et 43 (positifs faibles)



En 2018	En 2019
Non détectés = 188	Non détectés = 161 Positifs faibles = 27
Positifs faibles = 51	Non détectés = 19 Positifs faibles = 30 (Non analysés, n = 2)



Paratuberculose confirmée par une analyse de laboratoire

N=21	Pos 2018	Pos 2019	Pos 2018 et 2019	Non détecté
Bovins	2	0	1	5
Caprins	1	5	4	2
Ovins	0	0	0	1
TOTAL	3	5	5	8

Détection dans les poussières de 13 élevages sur 21



Méthodologie fonctionne pour la paratuberculose = indicateur à explorer

Tests *Mycoplasma spp.*



Poussières de
bâtiments d'élevage

CONTEXTE: bactéries non zoonotiques mais pertinence +++++ des prélèvements d'élevage

- Maladie souvent récurrente sur un site donné (Agalactie contagieuse des petits ruminants = « Mal di sito »)
- Transmission à des professionnels de santé (*M. suis* éleveurs porcins...) avec ou sans conséquences cliniques
- Peu de données sur le risque environnemental (biofilm, test de survie, etc...)

⇒ **EXPAIRCOX=excellente occasion pour un test**

RESULTATS DIFFICILEMENT EXPLOITABLES:

- **Non optimisation des flux et du stockage des échantillons pré-extraction ADN**
- Test n° 1: PCR ciblant le genre *Mycoplasma* + PCR nichée pour capter toutes les espèces = **contamination croisée ++**
- Test n°2: qPCR spécifique d'espèces sur un sous échantillonnage
 - 0/41 prélèvement bovin positif pour *M. bovis*
 - 1/36 prélèvement caprin positif (Ct=36) pour *M. mycoides subsp. capri*: **un des agents de l'Agalactie Contagieuse**

PERSPECTIVES:

- **Amélioration méthodologique** (traitement des échantillons, type de PCR, effet des inhibiteurs...) à prévoir
- **A creuser en testant plus d'échantillons**

Conclusions/Perspectives

- **Détection PCR sur matrice « poussières » pour les 3 agents**

- Applications sur poussières prélevées en **lieux publics** et en **élevage**
- Détection d'**ADN**



- **Perspectives**

- Pour les 3 agents : estimation des **LD & LQ méthode** « extraction + PCR digitale »
- Pour la **fièvre Q** :
 - Analyse des résultats = **charges + génotypes** → RDV en 2022 !
 - Développement d'un modèle de laboratoire pour estimer la **viabilité**
- Pour la **paratuberculose** et les **mycoplasmoses**
 - **Applicabilité sur le terrain** à mieux évaluer
- Perspectives d'application pour le séquençage d'agents non cultivables ?

Remerciements

- Les éleveurs qui ont accepté de participer à l'étude
- Les « préleveurs de poussière » : Christophe Aubert, Joël Haie, David Brillaud
- Les personnes de l'UMR EPIA qui ont contribué à l'établissement du protocole et l'analyse des données : I. Lebert, X. Bailly, David Abrial, Marion Larribe



Questions ?