

Application de la réaction de polymérisation en chaîne au diagnostic direct de la chlamydie abortive (*Chlamydomphila abortus* et *Chlamydomphila pecorum*) des petits ruminants au Maroc

S. El Jaï^{1*} A.H. Remmal¹ A. Rodolakis²
A. Souriau² A.H. El Idrissi³

Mots-clés

Ovin – Caprin – *Chlamydomphila abortus* – *Chlamydomphila pecorum* – Ornithose – PCR – Maroc.

Résumé

Dans le but d'améliorer le diagnostic direct de la chlamydie abortive des petits ruminants, 225 écouvillons vaginaux prélevés de brebis et de chèvres ayant avorté ont été testés pour la recherche d'ADN de *Chlamydomphila* en utilisant deux types de PCR, une PCR (CTU/CTL) spécifique des Chlamydiales et une PCR (CPS/CPC) spécifique des espèces *Chlamydomphila abortus* et *Chlamydomphila pecorum*. Le gène *omp1* codant pour la protéine majeure de la membrane externe des Chlamydiales a été détecté par la PCR (CTU/CTL) dans 65 échantillons (29 p. 100) des prélèvements analysés dont 80 p. 100 avaient été réalisés dans un délai inférieur à quatre semaines après l'avortement. La majorité des prélèvements positifs par la PCR (CTU/CTL) (69 p. 100) provenaient de troupeaux reconnus positifs par le test de fixation du complément. La PCR spécifique d'espèce appliquée aux prélèvements positifs par PCR (CTU/CTL) n'a permis de détecter les fragments attendus de *Chlamydomphila abortus* (1 800 pb) et de *Chlamydomphila pecorum* (580 pb) que dans quatre des 65 prélèvements testés. Les autres prélèvements ont été négatifs (63 p. 100) ou non concluants (31 p. 100) avec des bandes non spécifiques de tailles intermédiaires. La restriction enzymatique des produits d'amplification (PCR-CTU/CTL) a révélé une grande diversité génétique parmi les 65 prélèvements testés. Seuls 15 prélèvements ont montré un profil de digestion typique de *Cp. abortus*, mais le reste des prélèvements (77 p. 100) ont montré des profils de *Cp. pecorum* ou proches de cette espèce. La culture sur cellules McCoy de 26 écouvillons vaginaux et produits d'avortements provenant d'animaux avortant et confirmés positifs pour la chlamydie (sérologie et PCR) a révélé la présence de *Chlamydomphila* dans huit prélèvements dont sept ont été caractérisés de type *Cp. abortus* et un de type *Cp. pecorum*. Les prélèvements restants n'ont donné aucun effet cytopathogène après cinq passages successifs, ou ils étaient contaminés. D'autres études ont été menées sur la souche *Cp. pecorum*, désignée M14, isolée pour la première fois au Maroc, pour tester sa virulence chez la souris. Ces résultats ont suggéré une variabilité génétique des souches abortives et une association de *Chlamydomphila pecorum* aux avortements chez les ovins et les caprins au Maroc. Cette diversité génétique mérite d'être étudiée davantage pour orienter les stratégies de vaccination contre la chlamydie abortive au Maroc.

1. Département de Biologie, université Mohammed Ben Abdellah, Fès, Maroc

2. Laboratoire de Pathologie infectieuse et immunologie, Inra Nouzilly, Tours, France

3. Département de Microbiologie, immunologie et maladies contagieuses, Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, BP 6202-Instituts, 10101 Rabat, Maroc

* Auteur pour la correspondance

Tél. : +212 61 08 88 71 ; e-mail : jasmin33332001@yahoo.fr

■ INTRODUCTION

Au Maroc, l'élevage des petits ruminants représente l'une des principales activités de la population dans le monde rural. Il y constitue la principale source de revenu pour les petits et moyens agriculteurs qui dépendent essentiellement de la diversité de production de cet élevage, notamment la viande, la laine, le lait et le cuir.

En plus des contraintes climatiques liées à la sécheresse, les petits ruminants, notamment dans les zones pastorales, sont soumis sans cesse aux avortements en série affectant directement la productivité et la rentabilité de l'élevage. Des enquêtes menées dans plusieurs régions du Maroc rapportent des taux d'avortements variant de 6 à 27 p. 100 selon les régions et les années (2, 7, 9, 10). Les analyses sérologiques menées à l'occasion de ces enquêtes révèlent l'implication d'infections multiples, mais la chlamydie reste la principale pathologie associée aux foyers d'avortements investigués. En plus des dégâts économiques importants qu'elle génère, cette maladie est considérée comme une zoonose pouvant provoquer des fausses couches chez des femmes ayant participé à la mise bas de brebis ou de chèvres atteintes de la chlamydie (4, 21, 31).

Les agents responsables de cette pathologie appartiennent à la famille des Chlamydiaceae qui comprend, selon une récente taxonomie, deux genres, *Chlamydia* (*C.*) et *Chlamydomphila* (*Cp.*) avec plusieurs espèces (11). Les espèces les plus impliquées en pathologie des petits ruminants sont représentées par *Chlamydomphila abortus* (par ex., *Chlamydia psittaci*, sérotype 1) et *Chlamydomphila pecorum* (par ex., *Chlamydia pecorum*, sérotype 2). La première espèce est généralement reconnue comme souche abortive et la deuxième comme souche d'origine intestinale chez les animaux sains (18) ; les deux espèces peuvent infecter le placenta des petits ruminants et être par conséquent responsables des avortements (5, 11, 24) bien que très peu d'isollements de *Cp. pecorum*, à partir d'avortements de ruminants, ait été rapportés dans la littérature (32). En revanche, *Cp. pecorum* a été isolé d'avortements chez les koalas (15). Les symptômes cliniques de la chlamydie abortive n'étant pas toujours évocateurs, le diagnostic clinique reste présumptif et doit être confirmé par le diagnostic de laboratoire. Ce dernier repose sur la recherche directe du germe dans les produits d'avortements ou dans les sécrétions vaginales, associée à la recherche des anticorps anti-*Chlamydia* dans le sérum des animaux infectés (23). Cependant, les techniques sérologiques couramment utilisées telles que la réaction de fixation du complément et le test Elisa présentent des limites dans la mesure où elles ne détectent que les anticorps communs à la famille des Chlamydiaceae et ne permettent pas de différencier entre les souches d'origine abortive (*Cp. abortus*) et celles d'origine intestinale (*Cp. pecorum*) dont la présence est considérée comme normale dans le tube digestif. Pour améliorer le diagnostic sérologique de la chlamydie abortive, un test Elisa utilisant une protéine recombinante comme antigène a été développé et évalué pour le diagnostic sérologique de la chlamydie abortive (29). Le test semble avoir une sensibilité et une spécificité respectivement de 90,9 et de 85,9 p. 100 (3) mais n'est disponible que depuis peu pour les laboratoires vétérinaires.

Actuellement, le diagnostic moléculaire des infections à *Chlamydomphila* est en pleine évolution. Les techniques de biologie moléculaire et l'amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), appliquées à la recherche des acides nucléiques chlamydiens, apportent une contribution nouvelle au diagnostic de la chlamydie abortive (8, 13, 16, 28). La connaissance de la séquence du gène *omp1* codant pour la protéine majeure de la membrane externe (MOMP : *major outer membrane protein*), protéine très conservée chez le genre *Chlamydomphila*, a permis de développer des amorces spécifiques pour l'amplification génique de l'ADN *Chlamydomphila* (14, 18, 33). D'autres séquences ont été également identifiées pour augmenter la sensibilité de détection de cette bactérie (16) mais aussi pour pouvoir amplifier de façon sélective les gènes de *Cp. abortus* et de *Cp. pecorum* (27, 28). Les résultats prometteurs de ces travaux ont incité les auteurs à mener cette étude pour mettre au point et évaluer la technique de PCR comme outil de diagnostic direct, rapide et spécifique de la

chlamydie abortive, en utilisant des prélèvements cliniques collectés à partir de brebis et de chèvres ayant avorté. Cet outil devrait faciliter l'identification et la caractérisation des *Chlamydomphila* associés aux avortements chez les ovins et les caprins au Maroc, une étape préalable pour développer et instaurer des mesures de prévention efficaces et adaptées au contexte local.

■ MATERIEL ET METHODES

Collecte et traitement des prélèvements

Lors d'enquêtes épidémiologiques des foyers d'avortements, réalisées pendant trois campagnes agricoles (1998, 1999 et 2000), 225 écouvillons vaginaux de brebis et de chèvres provenant de 24 troupeaux ont été collectés pour le diagnostic direct de la chlamydie abortive. Seuls les prélèvements réalisés sur des femelles ayant avorté dans un délai variant d'un à 60 jours précédant la visite ont été considérés dans ce travail. Le statut sérologique des troupeaux enquêtés par rapport à l'infection à *Chlamydomphila* fait l'objet d'une autre publication (10).

Les écouvillons vaginaux ont été acheminés le même jour au laboratoire dans des conditions frigorifiques. Au laboratoire, les écouvillons ont été transférés dans des cryotubes contenant chacun 800 µl du milieu de conservation (30) [saccharose (74,6 g/l), KH₂PO₄ (0,512 g/l), K₂HPO₄ (1,237 g/l), acide L-glutamique (0,721 g/l), gentamicine, nystatine (50 µg/ml), vancomycine, streptomycine (100 µg/ml)] et agités au vortex pendant 30 s. Les échantillons ainsi préparés ont été directement analysés ou conservés à -70 °C jusqu'à leur utilisation.

Souches témoins

Deux souches ovines d'origine française, *Cp. abortus* (souche AB7) d'origine abortive (12) et *Cp. pecorum* (souche iB1) isolée de fèces de brebis saine (6), ont été utilisées comme souches témoins dans ce travail. Elles ont été cultivées sur œufs embryonnés et les membranes vitellines infectées ont été récupérées, broyées et stockées à -70 °C.

Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN des échantillons a été réalisée par la technique rapide avec traitement à la protéinase K. Un volume de 50 µl du prélèvement a été transvasé dans un tube stérile auquel ont été rajoutés 30 µl de protéinase K à 2 mg/ml, 30 µl de tampon de PCR 10X et 190 µl d'eau pure. Les tubes ont été agités au vortex et incubés dans un bain-marie à 56 °C pendant 90 min, puis portés dans un bain-marie bouillant (100 °C) pendant 10 min afin de dénaturer la protéinase K. Au terme de ce traitement, l'ADN libéré a été utilisé dans les réactions d'amplification génique. Les membranes infectées par les souches témoins (AB7 et iB1) ont été également lysées de la même façon. Les lysats obtenus ont été considérés comme des témoins positifs pour la PCR.

Réactions d'amplification

Tous les écouvillons vaginaux ont été analysés par PCR (CTU/CTL) spécifique des Chlamydiales pour la détection directe du gène *omp1* codant pour la MOMP. Les prélèvements positifs ont été par la suite testés par une PCR multiplex pour déterminer les espèces de *Chlamydomphila* impliquées.

La PCR (CTU/CTL) développée par Denamur et coll. (8), utilisant une paire d'amorces spécifiques pour l'amplification d'un fragment de 1 050 pb du gène codant pour la MOMP, a été adoptée avec modification. Un volume de 2,5 µl d'une préparation d'ADN a été analysé par PCR dans un volume réactionnel final de 25 µl

contenant 50 μ M de chaque dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 200 nmoles de chacune des amorces CTU et CTL (CTU, 5'-AT GA AA AA AC TC TT GA AA TC GG-3'; CTL, 5'-CA AG AT TT TC TA GA (T/C)T TC AT (C/T)T TG TT-3'), 1,5 mM de $MgCl_2$ et 0,5 U de la Taq polymérase *Thermus aquaticus* (Boehringer, Mannheim). Le mélange a été couvert de 100 μ l d'huile minérale. Les tubes ont été portés dans un thermocycleur de type PCT-100 (MJ Research). Les échantillons ont subi une étape de préamplification à 94 °C pendant 10 min pour dénaturer l'ADN. Ensuite, ils ont été soumis à 40 cycles d'amplification. Chaque cycle a consisté en une dénaturation de 30 s à 94 °C, une hybridation des amorces avec l'ADN cible pendant 30 s à 50 °C, une extension des séquences pendant 90 s à 72 °C. A la fin des 40 cycles, les échantillons ont été incubés pendant 10 min à 72 °C pour une élongation finale des fragments amplifiés.

Pour caractériser l'espèce, la PCR multiplex (CPS/CPC) décrite par Sidi Boumedine et coll. (28) a été effectuée sur les prélèvements positifs par PCR (CTU/CTL). Deux couples d'amorces, l'un constitué d'amorces spécifiques de *Cp. abortus* (CPS/F : 5'-GA AA CT CT TT GC AG CA TC CC-3'; et CPS/B : 5'-AA GC CA TA CT CC CG AC CA AG-3') et l'autre d'amorces spécifiques de *Cp. pecorum* (CPC/F : 5'-TT CG AC TT CG CT TC TT AC GC-3'; et CPC/B : 5'-TG AA GA CC GA GC AA AC CA CC-3') ont été utilisés pour l'amplification sélective de deux fragments de taille respective de 1 800 pb et 580 pb. La préparation de la réaction et les conditions d'amplification ont été identiques à celles de la PCR (CTU/CTL) mais la température d'hybridation des amorces avec l'ADN cible a été fixée après plusieurs essais à 60 °C. Deux contrôles positifs (ADN souche AB7 et iB1) et deux négatifs (tampon de lyse et H_2O pure) ont été inclus systématiquement dans toutes les réactions d'amplification.

Visualisation des produits de PCR par électrophorèse

Afin de visualiser les produits d'amplification, un volume de 18 μ l de la réaction de PCR mélangé à 2 μ l de tampon de chargement (0,25 p. 100 de bleu de bromophénol, 40 p. 100 de saccharose) a été analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 1,5 p. 100 dans le tampon TAE 1X (pH 8) [TAE 50X : Tris 2M, Edta 50 mM (pH 8), acide acétique glacial 57,1 ml]. Le marqueur standard, Ladder DNA 1Kp, 100- pb (Gibco), a été utilisé pour apprécier la taille moléculaire des produits d'amplification. La migration a été effectuée pendant 1 h 30 sous un voltage de 75 V. Le gel a été ensuite coloré pendant 30 min dans un bain de bromure d'Éthidium (0,5 μ g/ml), puis lavé pendant 30 min dans du tampon TAE 1X. Le gel a été photographié à l'aide d'un appareil polaroid adapté sous les UV d'un transilluminateur (320 nm).

Analyse des produits d'amplification par restriction enzymatique

Les produits d'amplification du gène par PCR (CTU/CTL) ont été analysés par digestion enzymatique à l'aide de l'endonucléase *AluI* selon la méthode décrite par Denamur et coll. (8). Un volume de 30 μ l de chaque produit d'amplification a été digéré pendant 16 h à 37 °C, par cinq unités de *AluI* (Boehringer) dans un volume final de 40 μ l en présence du tampon spécifique de l'enzyme. Les produits de digestion et le marqueur de taille moléculaire (marqueur V de Boehringer) ont été analysés par électrophorèse verticale sur gels de polyacrylamide à 8 p. 100 (W/V) ou par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (4 p. 100) à faible point de fusion. Les voltages utilisés, pour la migration, ont été respectivement de 20 mA pendant 30 min, puis 60 mA pendant 2 h 30 et 45 V pendant 2 h 30. Les gels ont été colorés et photographiés comme décrit précédemment.

Culture des prélèvements et isolement des souches de *Chlamydia*

L'isolement des *Chlamydia* a été tenté pour 26 prélèvements (écouvillons, produits d'avortements tels les cotylédons et foies d'avorton) provenant de troupeaux ovins et caprins reconnus positifs pour la chlamydie (sérologie positive et/ou PCR positive) (tableau I). Les prélèvements ont été cultivés sur cellules McCoy (23). Les prélèvements susceptibles de contenir des *Chlamydia* ont été également traités par la technique des plages de lyse (22) au laboratoire d'Immunologie et de pathologie infectieuse à l'Inra de Tours, France. L'infection des tapis cellulaires par *Chlamydia* a été mise en évidence par la coloration à l'orange d'acridine (23) et à l'aide des techniques d'immunofluorescence (IF) et de microimmunofluorescence (MIF) (23) en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques au genre *Chlamydia* (RC6C4, LC1B11, AD5A8) et aux deux espèces *Cp. abortus* (CA5G11, BA6H6, Ch.Type1, Mel. S1) et *Cp. pecorum* (3DA1A7, Ch. Type 2).

■ RESULTATS

PCR (CTU/CTL) spécifique du gène *omp1*

Sur les 225 écouvillons analysés, 65 échantillons dont 30 d'origine ovine (46 p. 100) et 35 d'origine caprine (54 p. 100) ont été révélés positifs pour le fragment (1 050 pb) spécifique du gène de la protéine MOMP (figure 1). Soit un taux global de 29 p. 100 des échantillons révélés positifs par PCR (CTU/CTL). La technique a révélé au moins un prélèvement positif dans 17 troupeaux sur les 24 analysés, soit un taux de positivité de 71 p. 100. Le nombre de prélèvements positifs a varié en fonction des troupeaux, représentant 5 à 100 p. 100 des prélèvements analysés (tableau II).

Il a été noté que 80 p. 100 des prélèvements positifs ont été réalisés dans un délai inférieur à quatre semaines après l'avortement et seulement 20 p. 100 entre quatre à huit semaines. Les résultats de la PCR en fonction de l'espèce et du délai des prélèvements après l'avortement ont été récapitulés au tableau III.

La répartition des résultats de la PCR en fonction du statut sérologique des troupeaux a été présentée au tableau IV. Il a été constaté

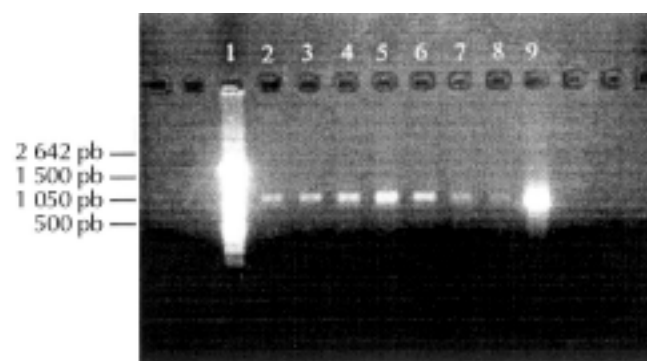


Figure 1 : analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR (CTU/CTL). Colonne 1 : DNA Ladder 100 pb (Gibco BRL) ; colonne 2 : B 80/K/16/5/98 ; colonne 3 : C 108/Z/28/10/98 (M14) ; colonne 4 : B 16/K/24/2/98 ; colonne 5 : B Z/27/11/99 ; colonne 6 : iB1 (*Cp. pecorum*) ; colonne 7 : B132/K/25/11/98 ; colonne 8 : C Z/6/2/00 ; colonne 9 : AB7 (*Cp. abortus*). Les valeurs à gauche du gel sont les tailles du marqueur en paires de bases. B : brebis ; C : chèvre. B et C sont suivis des références de troupeaux d'origine (tableau II).

Tableau I

Origines et caractéristiques des prélèvements cultivés

Echantillon	Type de prélèvement	Espèce	Sérologie Titre	PCR		Culture cellulaire (nb. de passages)	IF et MIF
				CTU/CTL	CPS/CPC		
C12/Z/20/2/98	Ecouvillon	Chèvre	-	+	-	+ (P4)	<i>Cp. abortus</i>
B16/K/24/2/98	Ecouvillon	Brebis	-	+	1 400 pb/400 pb	-	Négatif
B80/K/16/5/98	Ecouvillon	Brebis	-	+	+ 1 800 pb	+ (P4)	<i>Cp. abortus</i>
C108/Z/28/10/98 (M14)	Ecouvillon	Chèvre	-	+	+ 580 pb	+ (P3)	<i>Cp. pecorum</i>
C126/Z/11/11/98	Ecouvillon	Chèvre	-	+	-	Contamination	Négatif
B130/K/25/11/98	Ecouvillon	Brebis	-	+	+ 1 800 pb	+ (P5)	<i>Cp. abortus</i>
B132/K/25/11/98	Ecouvillon	Brebis	Sup 1/320	+	~ 600 pb	Contamination	Négatif
B133/K/25/11/98	Ecouvillon	Brebis	Sup 1/320	+	~ 600 pb	Contamination	Négatif
B135/K/25/11/98	Ecouvillon	Brebis	-	+	~ 600 pb	Contamination	Négatif
C1/S/7/2/99	Ecouvillon	Chèvre	Sup 1/160	+	-	+ (P4)	<i>Cp. abortus</i>
C6/S/7/2/99	Ecouvillon	Chèvre	Sup 1/160	+	-	Contamination	Négatif
B36/T/19/2/99	Cotylédon, foie d'avorton	Brebis	/	+	-	-	Négatif
B38/T/19/2/99	Cotylédon	Brebis	/	+	+ 1 800 pb	+ (P4)	<i>Cp. abortus</i>
C5/K1/3/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	~ 600 pb	Contamination	Négatif
C9/K1/3/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	~ 600 pb	-	Négatif
C14/K2/3/2/00	Ecouvillon	Chèvre	+ 1/80	+	-	-	Négatif
B19/K3/3/2/00	Ecouvillon	Brebis	+ 1/80	+	+ 1 800 pb	+ (P3)	<i>Cp. abortus</i>
Bcot/19/K3/3/2/00	Cotylédon	Brebis	/	+	+ 1 800 pb	+ (P3)	<i>Cp. abortus</i>
C38/Z/6/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	-	-	Négatif
C39/Z/6/2/00	Ecouvillon	Chèvre	+ 1/80	+	-	-	Négatif
C40/Z/6/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	-	Contamination	Négatif
C61/K/12/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	-	-	Négatif
C67/K/12/2/00	Ecouvillon	Chèvre	1/40	+	-	-	Négatif
C68/K/12/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	-	Contamination	Négatif
C69/K/12/2/00	Ecouvillon	Chèvre	-	Frottis	-	-	Négatif
C93/Z/1/12/00	Ecouvillon	Chèvre	-	+	+ 1 800 pb	+ (P4)	<i>Cp. abortus</i>

PCR (CTU/CTL) : PCR spécifique des Chlamydiales

PCR (CPS/CPC) : PCR spécifique des espèces *Chlamydomphila abortus* et *Cp. pecorum*

IF : immunofluorescence ; MIF : microimmunofluorescence

que 45 (69 p. 100) des prélèvements positifs par PCR provenaient de troupeaux à sérologie positive et seulement 20 (31 p. 100) étaient issus de troupeaux reconnus négatifs par la fixation du complément.

PCR multiplex spécifique d'espèce

L'application de la PCR (CPS/CPC) aux 65 prélèvements positifs pour la PCR (CTU/CTL) a mis en évidence la présence d'une population hétérogène constituée de fragments de tailles variables (figure 2) : trois prélèvements, deux collectés à partir de deux brebis et un collecté à partir d'une chèvre appartenant à trois troupeaux différents, ont présenté un fragment de 1 800 pb, spécifique de *Cp. abortus*. Un seul prélèvement a présenté un fragment de 580 pb, spécifique de *Cp. pecorum* ; il provenait d'une chèvre dont l'écouvillon a été réalisé huit jours après l'avortement. Une ou plusieurs bandes de tailles différentes (1 700 pb, 1 500 pb, 800 pb et inférieure à 580 pb) ont été amplifiées dans 20 prélèvements (figure 2). Aucun fragment n'a été détecté dans les 41 prélèvements restants (tableau V).

Digestion enzymatique des produits d'amplification

Le traitement par l'enzyme de restriction (*AluI*) des produits d'amplification de la PCR (CTU/CTL) a révélé plusieurs profils de

digestion (figure 3). Sur les 65 prélèvements analysés, 15 ont présenté un profil identique à celui de *Cp. abortus* (souche AB7) avec les coupures de tailles attendues (198 pb, 171 pb, 159 pb, 84 pb, 82 pb et 81 pb). En utilisant la PCR multiplex (CPS/CPC), parmi ces prélèvements, trois ont présenté le fragment de 1 800 pb, 7 ont donné des bandes intermédiaires et 5 n'ont pas réagi. Seul le prélèvement de chèvre qui a été caractérisé comme appartenant à l'espèce *Cp. pecorum* par la PCR multiplex (CPS/CPC) a présenté un profil de digestion avec une bande de 180 pb caractéristique des souches de *Cp. pecorum*, mais différent de celui de la souche témoin iB1 (figure 3, profil 4). Il est à noter qu'une souche de type *Cp. pecorum* (codifiée M14) a été isolée en culture cellulaire à partir de ce prélèvement (manuscrit en préparation). Le reste des prélèvements a montré des profils avec des coupures variables (figure 3, profils 2, 5 et 6), différents de ceux des souches témoins AB7 (figure 3, profil 1) et iB1 (figure 3, profil 3).

Isolement des souches de *Chlamydomphila*

Après plusieurs passages des 26 prélèvements sur cultures cellulaires et multiplications sur œufs embryonnés, seulement huit ont montré un effet cytopathogène sur les tapis cellulaires à des passages différents et ont donné des mortalités des œufs embryonnés infectés avec des lésions pathologiques et des membranes

Tableau II

Répartition des prélèvements positifs par PCR (CTU/CTL) en fonction des troupeaux étudiés (n = 24)

Référence troupeaux	Espèce	TA (%) ¹	Nb. de prélèvements ²	PCR (CTU/CTL) positive (%)	Sérologie positive (%)
Z/20/2/98	Mixte	15	10	1 (10)	0
K/24/2/98	Ovin	20	15	8 (53)	0
K/15/3/98	Ovin	25	20	1 (5)	6 (30)
K/29/3/98	Caprin	30	19	2 (11)	5 (26)
K/16/5/98	Mixte	15	9	2 (22)	2 (22)
Z/23/6/98	Ovin	16	5	0	
Z/5/9/98	Ovin	5	6	0	3 (50)
Z/28/10/98	Caprin	20	11	1 (9)	3 (27)
Z/11/11/98	Caprin	7	8	4 (50)	0
K/25/11/98	Ovin	10	6	4 (67)	5 (83)
S/7/2/99	Caprin	16	11	7 (64)	10 (90)
T/19/2/99	Ovin	15	10	10 (100)	1 (10)
Z/27/11/99	Ovin	10	6	5 (83)	0
Z/1/12/99	Caprin	8	6	0	0
Z/12/12/99	Ovin	10	14	0	4 (27)
K1/3/2/00	Caprin	20	9	5 (56)	4 (44, 5)
K2/3/2/00	Caprin	18	5	2 (40)	1 (20)
K3/3/2/00	Ovin	12	6	1 (17)	3 (50)
K4/3/2/00	Ovin	25	7	0	0
Z/6/2/00	Caprin	5	11	8 (73)	2 (18)
K/12/2/00	Caprin	30	8	3 (38)	2 (33)
A/2/10/00	Ovin	6	3	0	0
Z/1/11/00	Ovin	12	11	0	0
Z/1/12/00	Mixte	10	9	1 (11)	0
Total	–	–	225	65 (29)	51 (23)

TA : taux d'avortements

¹ Le taux d'avortements a été estimé par le nombre déclaré de femelles ayant avorté rapporté à l'effectif de femelles ayant avorté et celles ayant mis bas normalement² Les femelles ont été prélevées dans un délai après l'avortement variant de 1 à 60 j

vitellines fines et très vascularisées. Il s'agit de cinq prélèvements d'origine ovine et trois d'origine caprine. Les résultats des isolements réalisés sont illustrés dans le tableau I. Aucun effet cytopathogène n'a été observé après cinq passages pour dix prélèvements alors que huit ont été trouvés contaminés.

Les résultats de l'IF et de la MIF ont montré que sept prélèvements dont cinq ovins et deux caprins ont réagi avec les anticorps monoclonaux spécifiques du genre *Chlamydomphila* et de l'espèce

Chlamydomphila abortus. Un seul prélèvement d'origine caprine s'est révélé être de type *Chlamydomphila pecorum* en réagissant avec les anticorps monoclonaux spécifiques du sérotype *pecorum* (tableau I). Une souche (*Cp. pecorum*), désignée M14, a été isolée à partir de ce prélèvement par la technique des plages de lyse. La souche a été confirmée par coloration d'acridine à l'orange, MIF, PCR (figure 1, colonne 3 ; figure 2, colonne 2) et par digestion enzymatique des produits de la PCR (CTU/CTL) (figure 3, colonne 6).

Tableau III

Répartition des prélèvements positifs par PCR (CTU/CTL) en fonction des délais d'avortements et de l'espèce

Jours après avortement	PCR (CTU/CTL) positive			PCR (CTU/CTL) négative		
	Brebis	Chèvre	Total (%)	Brebis	Chèvre	Total (%)
< à 15	2	19	21 (32)	47	30	77 (48)
15 à 30	19	12	31 (48)	20	20	40 (25)
> 30	09	04	13 (20)	23	20	43 (27)
Total	30	35	65 (100)	90	70	160 (100)

PCR (CTU/CTL) : PCR spécifique des Chlamydiales

Tableau IV

Résultats de la PCR (CTU/CTL) en fonction de la sérologie des troupeaux

Statut sérologique des troupeaux	Résultat PCR (CTU/CTL)	
	Positive (%)	Négative (%)
Sérologie positive	45 (69)	74 (46)
Sérologie négative	20 (31)	86 (54)
Total	65 (100)	160 (100)

PCR (CTU/CTL) : PCR spécifique des Chlamydiales

 χ^2 (1 ddl) = 9,78

p < 0,01 ; il y a significativement plus d'échantillons PCR positifs parmi les troupeaux sérologiquement positifs

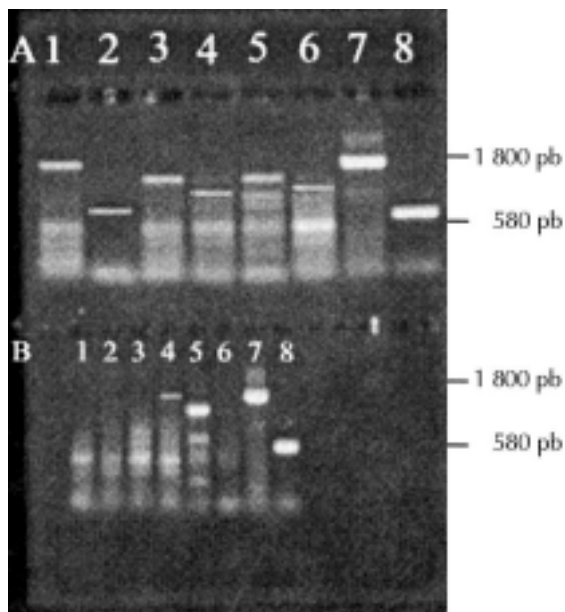


Figure 2 : analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 1% des produits de PCR multiplex (CPS/CPC). A– colonne 1 : C 1/S/7/2/99 ; colonne 2 : C 108/Z/28/10/98 (M14) ; colonne 3 : B 27/K/24/2/98 ; colonne 4 : B 18/ K/24/2/98 ; colonne 5 : B 16/ K/24/2/98 ; colonne 6 : B 26/ K/24/2/98 ; colonne 7 : AB7 (Cp. abortus) ; colonne 8 : iB1 (Cp. pecorum). B– colonne 1 : B 28/ K/24/2/98 ; colonne 2 : B 43/K/15/3/98 ; colonne 3 : B 46/Z/27/11/99 ; colonne 4 : B 80/K/16/5/98 ; colonne 5 : C 93/Z/1/12/00 ; colonne 6 : B 132/K/25/11/98 ; colonne 7 : AB7 (Cp. abortus) ; colonne 8 : iB1 (Cp. pecorum). Les valeurs à droite du gel sont les tailles en paires de bases des fragments attendus. M14 : souche Cp. pecorum isolée. B : brebis ; C : chèvre.

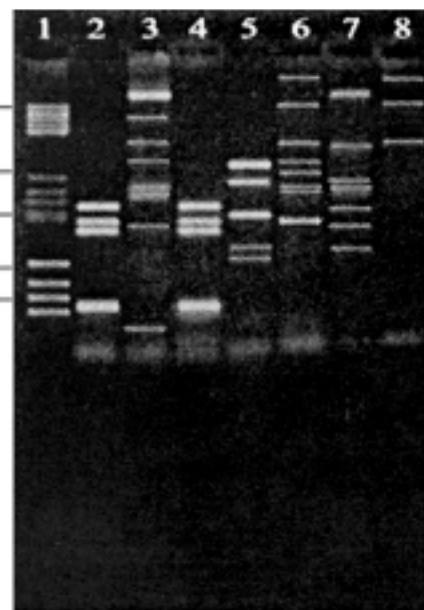


Figure 3 : analyse par électrophorèse sur gel d'agarose 4 % des fragments de digestion enzymatique par AluI des produits de PCR (CTU/CTL). Colonne 1 : marqueur de taille V (Boehringer) ; colonne 2 : C 1/S/7/2/99 (profil 1) ; colonne 3 : B 130/K/25/11/98 (profil 2) ; colonne 4 : AB7 (profil 1) ; colonne 5 : iB1 (profil 3) ; colonne 6 : C 108/Z/28/10/98 (souche M14, profil 4) ; colonne 7 : B 27/K/24/2/98 (profil 5) ; colonne 8 : C 127/Z/11/11/98 (profil 6). Les valeurs à gauche du gel sont les tailles du marqueur en paires de bases. B : brebis ; C : chèvre. Profils 1 et 3 : ce sont les profils respectifs des souches de référence AB7 et iB1. Profils 2, 4, 5 et 6 : ce sont les profils de digestion différents de ceux des souches de référence.

Tableau V

Résultats de la PCR multiplex (CPS/CPC) (nb. de prélèvements) en fonction de l'espèce animale

Espèce	PCR (CPS/CPC) positive pour				Total
	Cp. abortus	Cp. pecorum	PCR non spécifique ¹	PCR négative	
Ovin	2	0	13	15	30
Caprin	1	1	7	26	35
Total	3	1	20	41	65

PCR (CPS/CPC) : PCR spécifique des espèces *Chlamydomphila abortus* et *Cp. pecorum*

¹ Prélèvements montrant une ou plusieurs bandes intermédiaires (1 700 pb, 1 500 pb, 800 pb et inférieure à 580 pb)

■ DISCUSSION

Le but de ce travail a été d'évaluer la technique PCR comme outil de diagnostic direct et rapide de la chlamydie abortive en élevage des ovins et caprins au Maroc. Deux techniques PCR ont ainsi été adoptées pour la détection et l'identification des *Chlamydomphila* dans les écouvillons vaginaux de brebis et de chèvres

ayant avorté. La technique PCR (CTU/CTL) adoptée dans ce travail a permis de détecter la séquence nucléotidique spécifique du gène *omp1* des Chlamydiales dans 29 p. 100 des écouvillons vaginaux répartis sur 17 (71 p. 100) troupeaux parmi les 24 enquêtés.

Tous les animaux révélés positifs provenaient de troupeaux dans un contexte abortif, la majorité (71 p. 100) présentant l'évidence sérologique de l'infection à *Chlamydomphila*. Il a été également constaté que la PCR a permis de détecter le gène cible dans les prélèvements jusqu'au deuxième mois après l'avortement sachant que tous les échantillons testés dans ce travail ont été réalisés dans un délai postavortement variable d'un à 60 jours selon les animaux. La détection d'ADN chlamydien dans certains prélèvements pourrait être liée à la présence de corps bactériens non viables. Cependant, le fait que les animaux testés aient tous manifesté des avortements et provenaient dans la majorité des cas de troupeaux avec évidence sérologique de l'infection, les résultats de la PCR ont été en faveur d'infections actives avec excréation possible des *Chlamydomphila* dans les sécrétions vaginales analysées. L'isolement des *Chlamydomphila* serait idéal pour confirmer les résultats de la PCR, mais à l'exception de quatre prélèvements à partir desquels *Cp. abortus* (trois prélèvements) et *Cp. pecorum* (un prélèvement) ont été isolés, la plupart des essais d'isolement du germe en culture cellulaire n'ont pas été concluants en raison des problèmes liés principalement à la qualité des prélèvements. La possibilité de repérer par PCR des animaux éventuellement excréteurs dans les semaines qui suivent l'avortement ou la mise bas (17, 19, 24) offre un avantage énorme par rapport aux autres techniques de

diagnostic direct qui nécessitent des produits d'avortements frais, riches en *Chlamydophila* et prélevés peu de temps après l'avortement. Il a été noté qu'il était pratiquement impossible de satisfaire ces conditions dans le contexte de l'élevage extensif et pastoral au Maroc où les troupeaux sont dispersés et se déplacent sur de vastes distances. Les résultats de la PCR doivent être cependant interprétés avec précaution en raison des problèmes liés à la présence éventuelle dans les prélèvements d'inhibiteurs qui entraîneraient des faux négatifs et également à la détection des faux positifs due à la grande sensibilité de la technique. La présence d'inhibiteurs de la réaction d'amplification aurait pu être vérifiée à l'aide d'amplification de séquences universelles ou d'ajout d'ADN exogène.

Pour déterminer les espèces de *Chlamydophila* associées aux avortements, les prélèvements positifs par la PCR (CTU/CTL) ont été également testés par une PCR multiplex utilisant des amorces spécifiques de *Cp. abortus* (CPS) et de *Cp. pecorum* (CPC). La technique n'a permis de détecter les fragments attendus de *Cp. abortus* et de *Cp. pecorum* que dans quatre des 65 prélèvements testés. Les autres prélèvements (94 p. 100) ont été négatifs (aucun signal visible) ou non concluants avec des bandes non spécifiques de tailles intermédiaires. L'absence d'amplification de fragments cibles dans les prélèvements, pourtant positifs par la PCR (CTU/CTL), pourrait être expliquée par la présence d'impuretés dans les prélèvements ou par une défaillance technique qui aurait pu interférer avec la réaction d'amplification. En outre, la taille relativement grande du fragment de 1 800 pb à amplifier par les amorces CPS pourrait être un facteur empêchant l'amplification et expliquerait le grand nombre de prélèvements de *Cp. abortus* qui n'ont pas répondu. En revanche, la mise en évidence de bandes non spécifiques après plusieurs essais dans un grand nombre de prélèvements pourrait être liée soit aux problèmes de spécificité des amorces utilisées dans la réaction, soit à un polymorphisme au niveau des séquences ciblées qui pourrait être en faveur d'une possible variabilité génétique des souches marocaines. Un séquençage de ces fragments ou une hybridation avec des sondes spécifiques pourraient renseigner s'il s'agit en effet de souches de *Chlamydophila* ou de contaminations au niveau des prélèvements.

La digestion par *AluI* du gène *omp1* a également révélé la présence d'une population hétérogène de profils génétiques. Il a été convenu de noter que seuls 15 prélèvements ont montré un profil de digestion similaire à celui de *Cp. abortus* (souche AB7) et un seul prélèvement (à partir duquel M14 a été isolée) avec un profil présentant la bande type de *Cp. pecorum* (180 pb) (figure 3, piste 6) mais différent de la souche *Cp. pecorum* de référence iB1. Le reste des prélèvements a montré des profils variables qui, bien que différents de ceux identifiés dans d'autres travaux (1, 8, 25), pourraient être de type *Cp. pecorum*. D'après les études moléculaires réalisées dans le domaine de la phylogénie et la caractérisation des espèces des Chlamydiales, notamment l'homologie ADN/ADN (11), l'analyse de la séquence codant pour la MOMP (14, 18, 33) et des produits du polymorphisme des sites de restriction (RFLP) des gènes *omp1* (1, 8, 11, 25) et *omp2* (27), il est actuellement évident que les souches de *Cp. pecorum* constituent un groupe très hétérogène sur le plan génétique mais ayant une bande de 180 pb ou deux bandes équivalentes de 110 pb et de 70 pb (8). Il est à noter que certains prélèvements parmi ceux ayant des profils de digestion variables ont présenté des bandes dont la somme a été supérieure à 1 050 pb, fragment amplifié par la PCR (CTU/CTL). Il s'agirait, dans ce cas, probablement d'un mélange de souches dans les prélèvements analysés.

La souche M14 de type *Cp. pecorum* isolée d'une chèvre ayant avorté s'est avérée d'un grand intérêt épidémiologique pour la chlamydie abortive chez les petits ruminants au Maroc et dans la région. En effet, une souche de type *Cp. pecorum* a été récemment isolée à partir d'une chèvre ayant avorté en Tunisie (32).

L'implication de *Cp. pecorum* dans les avortements a été également évoquée dans une étude sérologique réalisée au Maroc sur des sérums de brebis et de chèvres ayant avorté en utilisant la technique Elisa recombinant (26).

La virulence de la souche M14 a été testée *in vivo* sur modèle souris au laboratoire de l'unité de Pathologie infectieuse à l'Inra de Tours. Les résultats de cette étude ont montré que c'est une souche pathogène provoquant des avortements suite à une colonisation du placenta mais à des degrés moindres que la souche AB7 de type *Cp. psittaci*. (19). Il a été également montré que le vaccin vivant 1B, composé d'un mutant thermosensible obtenu par mutagenèse de la souche abortive AB7 à la nitrosoguanidine (20), protège la souris contre l'infection avec la souche M14 (19).

■ CONCLUSION

Les résultats obtenus au terme de ce travail ont confirmé que la technique PCR possède un potentiel puissant pour le diagnostic direct et rapide de la chlamydie abortive chez les petits ruminants. Appliquée sur des animaux ayant avorté et associée aux résultats de la sérologie, la PCR (CTU/CTL) pourrait identifier les animaux éventuellement excréteurs du germe après l'avortement.

La technique PCR multiplex appliquée à la recherche et à l'identification directe de *Cp. abortus* et *Cp. pecorum* dans les prélèvements cliniques n'a pas montré de performances totalement satisfaisantes dans les conditions expérimentales de cette étude. Cependant, avec des ajustements techniques (en l'occurrence, purification de l'ADN), cet outil pourrait apporter une contribution significative au diagnostic direct et spécifique de la chlamydie abortive. Des études récentes (16, 27) ont permis de déterminer des amorces spécifiques pour différencier entre les deux espèces *Cp. abortus* et *Cp. pecorum* en amplifiant un fragment de taille plus petite que celle du fragment amplifié par le couple d'amorces CPS/F et CPS/B.

L'évaluation des résultats obtenus par l'analyse de restriction enzymatique des produits de PCR (CTU/CTL) a montré une grande diversité génétique avec des profils variables qui pourraient être attribués au type *Cp. pecorum*. Ces résultats, bien que préliminaires, associés à l'isolement pour la première fois au Maroc d'une souche de type *Cp. pecorum* de chèvre ayant avorté suggèrent l'association de *Cp. pecorum* aux avortements chez les ovins et les caprins. La diversité génétique des *Chlamydophila* associées aux avortements des petits ruminants au Maroc mérite d'être étudiée par des investigations plus approfondies pour repérer des marqueurs épidémiologiques et orienter les stratégies de lutte et de vaccination contre la chlamydie abortive.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier toute l'équipe du laboratoire de Pathologie infectieuse et immunologie de l'Inra de Nouzilly (Tours, France) pour leur aide précieuse et leur fourniture en souches de référence.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON I.E., BAXTER S.I., DUNBAR S., RAE A.G., PHILIPS H.L., CLARKSON M.J., HERRING A.J., 1996. Analysis of the genomes of chlamydial isolates from ruminants and pigs support the adoption of the new species *Chlamydia pecorum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **46**: 245-251.
- BENKIRANE A., JABLI N., RODOLAKIS A., 1990. Fréquence des avortements et séroprévalence des principales maladies infectieuses abortives dans la région de Rabat (Maroc). *Ann. Rech. vét.*, **21** : 267-273.

3. BUENDIA A.J., CUELLO F., DEL RIO L., GALLEGU M.C., CARO M.R., SALINAS J., 2001. Field evaluation of new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydia abortus* infection. *Vet. Microbiol.*, **78**: 229-239.
4. BUXTON D., 1986. Potential danger to pregnant women of *Chlamydia psittaci* from sheep. *Vet. Rec.*, **118**: 510-511.
5. BUXTON D., BARLOW R.M., FINLAYSON J., ANDERS-ON I.E., MACKELLAR A., 1990. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *J. comp. Pathol.*, **102**: 221-237.
6. BUZONI-GATEL D., LAYACHI K., DUBRAY G., RODOLAKIS A., 1989. Comparison of protein patterns between invasive and non invasive ovine strains of *Chlamydia psittaci*. *Res. Vet.*, **46**: 40-42.
7. CHAARANI B., ROBINSON R.A., JOHNSON D.W., 1991. Lamb mortality in Meknes province (Morocco). *Prev. vet. Med.*, **10**: 283-298.
8. DENAMUR E., SAYADA C., SOURIAU A., ORFILA J., RODOLAKIS A., ELION J., 1991. Restriction pattern of the major outer-membrane protein gene provides evidence for homogeneous invasive group among ruminant isolates of *Chlamydia psittaci*. *J. gen. Microbiol.*, **137**: 2525-2530.
9. EL IDRISSE A.H., MANYARI A., BENKIRANE A., 1995. Fréquence des avortements infectieux des ovins au Maroc (régions de Zaer et du Moyen Atlas). *Actes. Inst. agron. vét.*, **15** : 11-14.
10. EL JAI S., EL IDRISSE A.H., BOUSLIKHANE M., 2004. Surveillance épidémiologique des avortements en élevage des petits ruminants dans les zones pastorales au Maroc. *Actes. Inst. agron. vét.* (sous presse)
11. EVERETT K.D., BUSH R.M., ANDERSEN A.A., 1999. Proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, **49**: 415-440.
12. FAYE P., CHARTON A., MAGE C., BERNARD C., LELAYEC C., 1972. Propriétés hémagglutinantes du virus de l'avortement enzootic des petits ruminants (souches de Rkeia d'origine ovine, caprine). *Bull. Acad. vet.*, **45** : 169-173.
13. HERRING A.J., 1993. Typing *Chlamydia psittaci*: a review of methods and recent findings. *Br. vet. J.*, **149**: 455-475.
14. HERRING A.J., TAN T.W., BAXTER S., INGLIS N.F., DUNBAR S., 1989. Sequence analysis of the MOMP gene of an ovine abortion isolate of *Chlamydia psittaci*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **65**: 153-158.
15. JACKSON M., WHITE N., GIFFARD P., TIMM P., 1999. Epizootiology of *Chlamydia* infections in two free-range koala populations. *Vet. Microbiol.*, **65**: 255-264.
16. LAROUCAU K., SOURIAU A., RODOLAKIS A., 2001. Improved sensitivity of PCR for *Chlamydia* using *pmp* genes. *Vet. Microbiol.*, **82**: 155-164.
17. PAPP R.J., SHEWEN P.E., GARTLEY C.J., 1994. Abortion and subsequent excretion of *Chlamydia* from the reproductive tract of sheep during estrus. *Infect. Immun.*, **62**: 3786-3792.
18. PICKETT M.A., EVERSON J.S., CLARKE I.N., 1988. *Chlamydia psittaci* ewe abortion agent: complete nucleotide sequence of the MOMP gene. *FEMS. Microbiol. Lett.*, **55**: 229-234.
19. REKIKI A., BOUAKANE A., HAMMAMI S., EL IDRISSE A.H., BERNARD F., RODOLAKIS A., 2004. Efficacy of live *Chlamydia abortus* vaccine 1B in protecting mice placentas and fetuses against strains of *Chlamydia pecorum* isolated from cases of abortion. *Vet. Microbiol.*, **99**: 295-299.
20. RODOLAKIS A., 1983. *In vitro* and *in vivo* properties of chemically induced temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* var *ovis*: screening in murine model. *Infect. Immun.*, **42**: 529-530.
21. RODOLAKIS A., 1997. La chlamydie abortive des petits ruminants. *Point vét.*, **182** : 91-93.
22. RODOLAKIS A., CHANCERELLE L., 1977. Dénombrement direct à l'isolement de *Chlamydia psittaci* au moyen de la technique des plages de lyse. *Ann. Microbiol.*, **128B** : 81-85.
23. RODOLAKIS A., NETTLETON P., 1997. Manuel pratique de diagnostic de laboratoire des avortements infectieux des petits ruminants. Rome, Italie, FAO.
24. RODOLAKIS A., SALINAS J., PAPP J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.*, **29**: 275-288.
25. RODOLAKIS A., SOURIAU A., 1992. Restriction endonuclease analysis of DNA from ruminant *Chlamydia psittaci* and its relation with virulence. *Vet. Microbiol.*, **31**: 263-271.
26. SALIH ALJ DEBBARH H., HASNAOUI H., SOURIAU A., BELHOUARI A., SAILE R., RODOLAKIS A., 2001. Chlamydie abortive des petits ruminants au Maroc : valeur épidémiologique d'un kit Elisar de *Chlamydia abortus* (*Chlamydia psittaci* sérotype 1). *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **54** : 201-205.
27. SHEEHY N., MARKEY B., GLEESON M., QUINN P.J., 1996. Differentiation of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* Strains by species-specific PCR. *J. clin. Microbiol.*, **12**: 3175-3179.
28. SIDI-BOUMEDINE K., SOURIAU A., RODOLAKIS A., 1996. Association of RAPD-PCR and specific DNA probes: a method for detection and typing of ruminants chlamydial strains. In: Stary A. Ed., Proc. 3rd meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Bologna, Italy, Esculapio, p. 314.
29. SOURIAU A., SALINAS J., DE SA C., LAYACHI K., RODOLAKIS A., 1994. Identification of subspecies- and serotype1-specific epitopes on the 80- to 90 kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *Am. J. vet. Res.*, **4**: 510-514.
30. SPENCER W.N., JOHNSON F.W.A., 1983. Simple transport medium for the isolation of *C. psittaci* from clinical material. *Vet. Rec.*, **3**: 535-536.
31. TAINTURIER D., FIENI F., BRUYAS J.F., BATTUT I., 1997. Les avortements chez les petits ruminants. *Point vét.*, **184** : 41-49.
32. TLATLI A., REKIKI A., SOURIAU A., FTOUH T., RODOLAKIS A., HAMMAMI S., 2000. Isolation, identification et typage des souches tunisiennes de *Chlamydia pecorum* d'origine caprine. In: 7th International conference of goats, Tours-Poitiers, France.
33. ZHANG Y.X., MORISSON S.G., CALDWELL H.D., BAEHR W., 1989. Cloning and sequence analysis of the MOMP genes of two *Chlamydia psittaci* strains. *Infect. Immun.*, **57**: 1621-1625.

Reçu le 12.11.2003, accepté le 31.09.2004

Summary

El Jaï S., Remmal A.H., Rodolakis A., Souriau A., El Idrissi A.H. Application of Polymerase Chain Reaction to the Direct Diagnosis of Abortive Chlamydiosis (*Chlamydophila abortus* and *Chlamydophila pecorum*) of Sheep and Goats in Morocco

In order to improve the direct diagnosis of abortive chlamydiosis in small ruminants, 225 vaginal swabs collected from aborting sheep and goats were tested for *Chlamydophila* DNA by two types of polymerase chain reactions (PCR): chlamydial-infection specific PCR (CTU/CTL), and species-specific PCR (CPS/CPC) for *Chlamydophila abortus* and *Cp. pecorum*. The *omp1* gene coding for the major outer membrane protein of Chlamydiales was found in 65 (29%) of the analyzed samples, of which 80% had been collected within four weeks post-abortion. The majority of PCR (CTU/CTL) positive samples (69%) came from herds found positive by the complement fixation test. The species-specific PCR applied to PCR (CTU/CTL) positive samples did not allow detecting the expected fragments of *Cp. abortus* (1800 bp) and *Cp. pecorum* (580 bp), except in four samples out of 65 tested. The remaining samples were either negative (63%) or non conclusive (31%) with non-specific bands of intermediate molecular weights. The enzyme restriction analysis of the *omp1* gene after DNA amplification revealed much genetic diversity among the 65 samples tested. Typical genetic patterns of *Cp. abortus* were found only in 15 samples, but the majority (77%) of the samples showed patterns attributed to *Cp. pecorum* or closely related to it. Culture on McCoy cells of 26 vaginal swabs and abortion products from animals found with chlamydial infection (serology and PCR) revealed the presence of *Chlamydophila* in eight samples: seven were characterized as *Cp. abortus* and one as *Cp. pecorum*. The remaining samples gave no cytopathogenic effect after five serial passages, or they were contaminated. A *Cp. pecorum* strain, designated M14, isolated for the first time in Morocco, was further investigated to test its virulence in mice. These data suggest there is genetic variation in abortive strains and a possible link between *Chlamydophila pecorum* and abortions in sheep and goats in Morocco. This genetic diversity needs to be further investigated in order to gear vaccination strategies for control of abortive chlamydiosis in Morocco.

Key words: Sheep – Goat – *Chlamydophila abortus* – *Chlamydophila pecorum* – Ornithosis – PCR – Morocco.

Resumen

El Jaï S., Remmal A.H., Rodolakis A., Souriau A., El Idrissi A.H. Aplicación de la reacción de la polimerización en cadena al diagnóstico directo de la clamidiosis abortiva (*Chlamydophila abortus* y *Chlamydophila pecorum*) de los pequeños rumiantes en Marruecos

Con el fin de mejorar el diagnóstico directo de la clamidiosis abortiva de los pequeños rumiantes, se obtuvieron 225 frotis vaginales de ovejas y de cabras que habían abortado y se examinaron para la búsqueda de ADN de *Chlamydophila*, utilizando dos tipos de PCR, un PCR (CTU/CTL) específico de Clamidiales y un PCR (CPS/CPC) específico de las especies *Chlamydophila abortus* y *Cp. pecorum*. El gen *omp1* codificante para la proteína mayor de la membrana externa de los Clamidiales fue detectado por la PCR (CTU/CTL) en 65 muestras (29%) de las recolectadas y analizadas, de las cuales 80% fueron realizadas en un lapso inferior a cuatro semanas post aborto. La mayoría de las muestras positivas para PCR (CTU/CTL) (69%) provenían de hatos reconocidos como positivos mediante el test de fijación de complemento. La PCR específica de especie, aplicada a las muestras positivas para PCR (CTU/CTL), no permitió la detección de los fragmentos esperados de *Cp. abortus* (1800 pb) y de *Cp. pecorum* (580 pb), sino en cuatro de las 65 muestras examinadas. Las otras muestras fueron negativas (63%) o no concluyentes (31%) con bandas no específicas de tamaños intermedios. La restricción enzimática de los productos de amplificación (PCR-CTU/CTL) reveló una gran diversidad genética entre las 65 muestras estudiadas. Solo 15 muestras mostraron un perfil de digestión típico de *Cp. abortus*, pero el resto de las muestras (77%) mostró perfiles de *Cp. pecorum* o próximos de esta especie. El cultivo de las células de McCoy de 26 frotis vaginales y productos de abortos provenientes de animales que abortaron y confirmados positivos para la clamidiosis (serología y PCR), reveló la presencia de *Chlamydophila* en ocho muestras, de las cuáles siete fueron caracterizadas como tipo *Cp. abortus* y uno de tipo *Cp. pecorum*. Las muestras restantes no produjeron ningún efecto cito patogénico después de cinco pasajes sucesivos o bien estaban contaminadas. Otros estudios fueron llevados sobre la cepa *Cp. pecorum*, designada M14, aislada por la primera vez en Marruecos, para probar su virulencia en el ratón. Los resultados sugieren una variabilidad genética de las cepas abortivas y una asociación de *Cp. pecorum* a los abortos en los ovinos y los caprinos en Marruecos. Esta diversidad genética amerita ser más estudiada para orientar las estrategias de vacunación contra la clamidiosis abortiva en Marruecos.

Palabras clave: Ovino – Caprino – *Chlamydophila abortus* – *Chlamydophila pecorum* – Ornitosis – PCR – Marruecos.