

CARACTÉRISATION DES SOUCHES D'ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE PAR SÉROTYPAGE ET SPECTROSCOPIE INFRAROUGE

M. Mellal¹, A. Mercier¹, D. Rubeaux¹, H. Gantelet² et S. Castagnos²

¹VET&SPHERE – Réseau Cristal, ZI de Tirpen, 56140 Malestroit, France

²Ceva Biovac, 6 Rue Olivier de Serres, 49070 Beaucozéz, France

m.mellal@reseau cristal.fr

RÉSUMÉ

Les infections à *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) sont fréquentes en dindes de chair et causent des troubles respiratoires ou articulaires. L'objectif de l'étude est de caractériser des isolats d'ORT par sérotypage et par une méthode innovante, la spectroscopie infrarouge (IR), afin de déterminer des liens épidémiologiques éventuels et montrer une possible discrimination en fonction de l'organe d'isolement. L'IR permet d'étudier phénotypiquement des bactéries, contrairement aux outils qui s'intéressent à la génétique.

Un échantillon de 41 isolats issus de 21 élevages de dindes élevées en Bretagne de janvier 2020 à avril 2021 a été analysé. Les isolats proviennent de différents organes de sujets présentant des signes cliniques. Sur un plan épidémiologique, l'IR regroupe dans un cluster plusieurs isolats issus de lots non contemporains d'un élevage. A contrario, 3 isolats d'un même lot de dindes se retrouvent séparés les uns des autres dans le dendrogramme. 88% des isolats appartiennent au sérotype 1 et sont sous-typés par IR. Parmi les 5 clusters distingués, l'un d'entre eux est dominant avec 23 isolats (56%) provenant de 15 élevages différents. Au sein de ce cluster, l'origine tissulaire des isolats est indifféremment respiratoire ou articulaire.

L'IR apparaît intéressante en montrant soit la résidence d'une même bactérie au sein d'un élevage, soit une diversité d'isolats pouvant circuler dans un même lot. Des disparités sont observées par IR sur des isolats appartenant au sérotype 1 sans relation avec le tropisme d'isolement.

ABSTRACT

Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates by serotyping and infrared spectroscopy

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) infections are common in turkey broilers production. The objective of this study is to characterize ORT isolates by serotyping and by an innovative method, infrared spectroscopy (IR) in order to determine epidemiological links and relations with isolation tissues. IR method allows phenotypic characterization which is impossible with genetic tools.

A sample of 41 isolates from 21 broiler turkey farms located in Brittany from January 2020 to April 2021 has been analyzed. Isolates come from different organs: trachea (16 isolates), lungs (9 isolates), air sacs (2 isolates) and joints (14 isolates) in birds with respiratory clinical signs and / or tenosynovitis.

Epidemiologically, several isolates from flocks raised in the same farm at different times are clustered. By contrast, 3 isolates from a same flock are separated from each other in the dendrogram. In this current case, 88% of isolates belong to serotype 1 and are IR subtyped in various clusters or singles. There are 5 separate clusters, including a dominant group with 23 isolates (56%) coming from 15 different farms. Within this main cluster, the sampling is either respiratory or articular.

In conclusion, IR appears to be an interesting method beyond serotyping, by showing either the residence of the same bacterium in a farm, or a diversity of isolates circulating in the same flock. Differences are observed by IR within a group of isolates largely belonging to serotype 1 unrelated to tropisms.

INTRODUCTION

La première description d'un cas clinique à *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) date de 1993 (Charlton *et al.*). Une bactérie à Gram négatif alors non identifiée avait été isolée de volaille domestique atteinte d'une maladie respiratoire (dinde et poulet). Depuis lors, de nombreux cas ont été rapportés dans d'autres pays sur différentes espèces de volailles. En France, la pathologie se présente majoritairement sous la forme de troubles respiratoires ou articulaires sur les dindes.

Les souches d'ORT peuvent être classées selon leur sérotype, via l'immunodiffusion en gel (Van Empel *et al.*) et aujourd'hui 18 sérotypes (A-R) sont décrits (Hafez et Sting 1999). Toutefois la disponibilité limitée des antisera et l'existence de réactions croisées entre sérotypes restreignent le sérotypage.

De nouvelles méthodes de caractérisation des souches bactériennes sont désormais disponibles comme la spectroscopie infrarouge (IR) à transformée de Fourier. Cette approche est particulièrement séduisante car en lien direct avec la recherche de l'expression phénotypique de molécules à la surface des bactéries et par conséquent un complément idéal au sérotypage classique.

L'objectif de notre étude de notre étude est de caractériser des isolats d'ORT issus de plusieurs cas cliniques en élevage par sérotypage et IR.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collection des isolats

Une collection de 41 isolats provenant de 21 élevages différents a été étudiée. Tous ces isolats sont issus de dindes de chair avec signes cliniques d'ornithobactériose à partir d'organes de l'appareil respiratoire (27/41) dont le poumon (9 isolats), les sacs aériens (2 isolats), la trachée (16 isolats) ou de l'appareil locomoteur (14 isolats).

Les élevages sont situés dans le Morbihan avec des récurrences d'infection à ORT plus ou moins importantes entre janvier 2020 et avril 2021. Pour les élevages avec plusieurs isolats, il peut s'agir soit du même lot de dindes avec plusieurs mises en culture lors de la même séance d'autopsie, soit d'animaux présentés au laboratoire à des périodes différentes.

1.2. Sérotypage par IDG

Les antisera ont été préparés à Ceva Biovac par immunisation de lapins et permettent de distinguer 5 sérotypes, appelés de sérotype 1 à sérotype 5. Cette classification est interne à Ceva Biovac.

Les antigènes sont extraits à partir d'une culture de la bactérie traitée au bain-marie bouillant puis analysés

par immunodiffusion en gel (IDG) selon la technique d'Ouchterlony (Van Empel *et al.*).

1.3. Spectroscopie infrarouge

L'appareil utilisé est un IR Biotyper de la société Bruker Daltonics. Les analyses ont été réalisées à RESALAB Ouest (Les Herbiers).

Les empreintes spectrales générées ont concerné la région des polysaccharides. Les résultats sont visualisés à l'aide d'un dendrogramme pour lequel des métadonnées ont été ajoutées (organe d'isolement, élevage, sérotype).

La standardisation de la culture et aussi de l'analyse IR sont des points critiques de la méthode.

L'analyse IR est réalisée sur une suspension bactérienne préparée à partir de colonies pures de chaque isolat selon le protocole recommandé par Bruker Daltonics.

2. RESULTATS

2.1. Sérotypage

Sur 41 isolats, 36 appartiennent au sérotype 1 soit 88%. Les autres isolats appartiennent soit au sérotype 4 (1/41) soit à aucun des 5 sérotypes définis (4/41). Le sérotype 1 est retrouvé quel que soit l'organe d'isolement contrairement aux isolats de sérotype 4 et "non sérotypable" qui proviennent de la trachée.

2.2. Spectroscopie infrarouge

La comparaison des isolats via un dendrogramme avec un seuil de coupure fixé à 0,200 met en évidence 5 clusters différents (surlignés en orange dans la Figure 1) dont le principal regroupe 23 isolats. Celui-ci est constitué des isolats provenant de 14 élevages. Les isolats au sein de ce cluster principal proviennent à 78% (18/23) de l'appareil respiratoire et certains isolats "respiratoires" ont une proximité très importante avec des isolats "articulaires" issus d'un même élevage ou d'élevages différents.

Les 4 autres clusters comprennent beaucoup moins d'isolats, entre 2 et 5.

Enfin certains isolats de sérotype 1 et un isolat "non sérotypable" apparaissent unitairement.

2.3. Description de quelques cas cliniques

Cas N°1

Dans l'élevage N, 3 isolats ont été mis en évidence sur 3 organes différents lors d'une même autopsie : poumon (isolat 34443), sac aérien (isolat 34445) et articulaire (isolat 34444). Malgré un traitement de première intention à base de Doxycycline, les symptômes de boiterie et les lésions de ténosynovite se sont aggravés. Les 3 isolats appartiennent au sérotype 1 et sont sous-typés en IR dans 3 clusters

différents (clusters 22, 70 et 62, (positionnement des isolats dans le dendrogramme Figure1). Différents isolats semblent ainsi infecter de façon contemporaine des dindes d'un même lot. L'antibiotypie de l'isolat articulaire, obtenue postérieurement à la mise en place du premier antibiotique, est différente de celle des isolats respiratoires expliquant l'échec du premier traitement.

Cas N° 2

Dans l'élevage A, comme pour le N°1 précédent, 3 isolats prélevés sur 3 organes différents lors d'une même autopsie ont été comparés : poumon (isolat 33991), trachée (isolat 33990) et articulation (isolat 33992). Ces 3 isolats appartiennent au sérotype 1 et sont regroupés en IR au sein du cluster 70 (positionnement des isolats dans le dendrogramme Figure1), ce qui laisse penser que des isolats semblables peuvent avoir plusieurs tropismes. Face à la gravité de la clinique le jour de l'analyse, un traitement à base de la Tylosine a été mis en place en première intention. Mais contrairement au N°1 (élevage N), le profil des antibiogrammes des isolats respiratoires et articulaires obtenus ultérieurement sont identiques avec une sensibilité intermédiaire à la Tylosine, ce qui explique une nécessité d'un recours à un second traitement avec une autre molécule.

Cas N° 3

Dans l'élevage C, 3 isolats ont été obtenus à la suite de prélèvements sur des lots de dinde non contemporains (espacés de 8 mois). L'isolat 33103 provient de la trachée (août 2020), l'isolat 35068 d'une articulation (avril 2021) et l'isolat 35069 de sacs aériens (avril 2021). Ces 3 isolats appartiennent au sérotype 1 et sont regroupés en IR au sein du cluster 70 (positionnement des isolats dans le dendrogramme Figure1).

3. DISCUSSION

Les spectres IR qui couvrent la région polysaccharidique sont particulièrement intéressants chez les bactéries car les glucides sont présents dans de nombreuses molécules comme les capsules, glycoprotéines et lipopolysaccharides (LPS). Cette technique peut discriminer les isolats en explorant les différences des polysaccharides de surface, constitutifs du phénotype des bactéries, ce que ne savent faire d'autres techniques notamment basées sur l'analyse génétique qui ne concerne jamais les molécules exprimées.

Concernant l'interprétation des données de l'IR, il n'existe pas de seuil de coupure (cut-off) unique et approprié pour toutes les espèces bactériennes. Des travaux récents de 2019 et 2021 (Martak *et al.*, Hu *et al.*) conviennent qu'il est difficile de fixer un cut-off. Cependant ces études avec des bacilles à Gram négatif

ont montré que la spectroscopie IR regroupait avec précision des isolats de plusieurs espèces - en considérant des cut-off respectifs de 0,221 ; 0,220 et 0,159 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae*) - appartenant au même ST (Sequence Type) défini par MLST (MultiLocus Sequence Typing) qui est aujourd'hui utilisé pour comparer des souches bactériennes extrêmement proches. Hu *et al.* précisent que l'IR présente un pouvoir de discrimination supérieur à la MLST et comparable avec le Whole-Genome Sequencing (*Klebsiella pneumoniae*), ce qui constitue un outil puissant de sous-typage des isolats d'une même espèce.

Le cut-off retenu dans notre étude (0,200) se situe dans la gamme des seuils appliqués pour des bactéries à Gram négatif et doit par conséquent permettre aussi une comparaison pertinente chez ORT. La caractérisation IR des 41 isolats a fait émerger une communauté provenant de différents élevages et de différents organes - respiratoires ou articulaires - et appartenant à plusieurs sérotypes (1, 4 et "non sérotypable"). La spectroscopie IR réalise un sous-typage au sein du sérotype 1 qui représente la majorité des bactéries rencontrées en France dans les cas cliniques. Ce sous-typage du sérotype 1 pouvant s'expliquer par l'utilisation d'un antisérum polyclonal capable de reconnaître des motifs antigéniques très variés. Une telle distinction intra-sérotype peut aider à la compréhension des cas cliniques rencontrés sur le terrain.

L'IR a ainsi permis de montrer, dans le cas N°1, une diversité d'isolats infectant les dindes d'un même lot en corrélation avec différents profils de sensibilité aux antibiotiques. Dans le cas N°2, les 3 isolats issus de différents organes ne sont pas discriminables par l'IR ce qui suggère qu'un unique isolat est capable de provoquer à la fois des lésions respiratoires et articulaires. Pour le cas N°3, l'IR ne révèle pas de différences et soutient l'hypothèse de la récurrence d'un isolat au sein d'un élevage, démontrant l'importance d'une gestion globale des infections respiratoires (biosécurité, ventilation, vaccination contre l'ensemble des pathogènes respiratoires).

La facilité d'utilisation et le délai de réalisation très court rendent la spectroscopie IR adaptée à la routine du laboratoire en comparaison de techniques beaucoup plus lourdes et coûteuses comme la MLST.

CONCLUSION

Pour le vétérinaire praticien, le recours à la comparaison des isolats cliniques d'ORT par

sérotypage et spectroscopie infrarouge, permet de comprendre les problématiques du terrain et la pathologie à ORT. L'IR est un outil innovant d'exploration de la diversité phénotypique, pouvant expliquer certains échecs thérapeutiques et aider le vétérinaire à prendre les mesures nécessaires de gestion préventive des infections.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Charlton BR, Channing-Santiago SE, Bickford AA, Cardona CJ, Chin RP, Cooper GL, Droual R, Jeffrey JS, Meteyer CU, Shivaprasad HL, Walker RL (1993). Preliminary characterization of a pleomorphic Gram-negative rod associated with avian respiratory disease. J Vet Diagn Invest. Jan;5(1):47-51
- Van Empel P, van den Bosch H, Loeffen P and Storm P (1997). Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J Clin Microbiol. Feb;35(2):418-421
- Hafez HM, Sting R (1999). Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. Avian Dis. Jan-Mar;43(1):1-7
- Hu Y, Zhou H, Lu J, Sun Q, Liu C, Zeng Y and Zhang R (2021). Evaluation of the IR Biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. Microbial biotechnology, 14(4), 134
- Martak D, Valot B, Sauget M, Cholley P, Thouverez M, Bertrand X and Hocquet D (2019). Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy Can Quickly Type Gram-Negative Bacilli Responsible for Hospital Outbreaks. Front. Microbiol. 10:1440

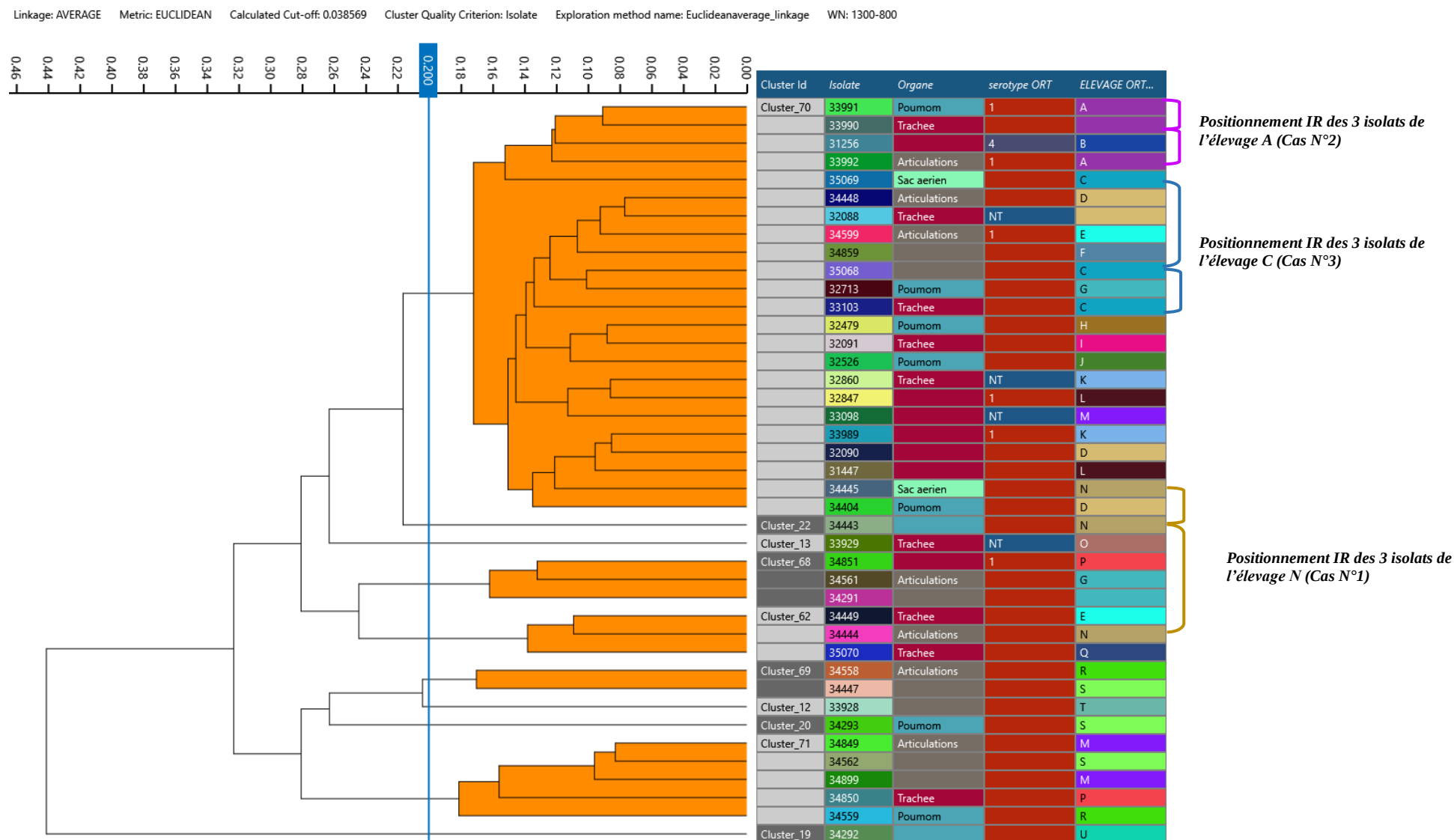


Figure 1 : Dendrogramme des 41 isolats d'*Ornithobacterium rhinotracheale* obtenu par spectroscopie infrarouge