

ENDOCARDITES INFECTIEUSES CHEZ LE CANARD MULARD : ETUDE EPIDEMIOCLINIQUE ET ASSOCIATION ETIOLOGIQUE DE *STREPTOCOCCUS* *PLURANIMALIUM*

M. Souvestre¹, L. Robertet¹, S. Castaing², E. Huchin³, L. Deffreix⁴, L. Corrand⁵, D. Dubois⁶, G. Croville¹, M.-N. Lucas¹, M. Delverdier¹, E. Oswald⁶ et J.-L. Guérin¹

¹ENVT, INRA, ENVT 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

²Biovol 47 - Réseau Cristal, Vignes de la justice, 47150 Monflanquin, France

³Abiopole, Cabinet vétérinaire, 19270 Ussac, France

⁴SOCSA Elevage 40, 281 avenue du Béarn, 40330 Amou, France

⁵Anibio, ENVT, ENVT 23, chemin des Capelles, 31076 Toulouse, France

⁶Service de Bactériologie, CHU Toulouse Purpan, 31100 Toulouse, France

jl.guerin@envt.fr

RÉSUMÉ

L'infection à *Streptococcus pluranimalium* associée à des septicémies et des endocardites valvulaires a été décrite chez le poulet de chair (Hedegaard et al., 2009). Elle n'a toutefois jamais été rapportée chez le canard. Entre Janvier et Mars 2018, quatorze élevages de canards mulards prêts à gaver de divers départements du Sud-Ouest ont présenté de la mortalité soudaine sur des sujets de 15 à 58 jours. L'étude a été menée sur onze de ces élevages. A l'autopsie, un tableau lésionnel identique a été observé sur les animaux présentant une nécrose de la rate et une endocardite végétante sévère touchant la valve mitrale. A l'histologie, le tableau incluait une endocardite végétante septique, une congestion hépatique et/ou pulmonaire passive ainsi que des infarcti myocardiques et spléniques. Des examens bactériologiques complétés par des analyses moléculaires ont été réalisés sur les végétations présentes sur les valves mitrales et ont mis en évidence *Streptococcus pluranimalium*. Des analyses PCR complémentaires recherchant la présence d'éventuels agents viraux (parvovirus de la maladie de Derzsy, circovirus, polyomavirus) ont été également réalisées et ont révélées 7 élevages positifs pour le virus de la maladie de Derzsy. A plus long terme, l'inclusion de nouveaux cas spontanés et éventuellement la reproduction expérimentale de l'infection permettra de mieux comprendre le rôle étiologique propre de *S. pluranimalium* et la pathogénèse.

ABSTRACT

Infectious endocarditis in the mule duck: clinical epidemiology and etiological association of *Streptococcus pluranimalium*

Streptococcus pluranimalium infection associated with septicemia and valvular endocarditis has been reported in broiler chickens (Hedegaard et al. 2009). However, it has never been reported in ducks. Between January and March 2018, fourteen farms breeding mule duck in several departments of South West of France showed sudden mortality between 15 and 58 days of age. The study was conducted on eleven of these farms. At necropsy were observed a splenomegaly with a usually associated spleen necrosis, severe vegetative endocarditis affecting the mitral valve. Histological exams were in line with macroscopic observations and illustrated the vegetative septicemic endocarditis, passive hepatic and / or pulmonary congestion, and myocardial and splenic infarction. Bacteriological exams supplemented by molecular analyzes were carried out on vegetative lesions observed on the mitral valves and *Streptococcus pluranimalium* was identified. Additional PCR assays for the presence of other viral agents of interest (parvovirus of Derzsy's disease, circovirus, polyomavirus) were also performed and 7 farms were positive for the Derzsy's parvovirus. Looking further ahead, including new field cases and possible experimental reproduction of the infection will give the opportunity to more precisely assess the pathogenesis and etiological role of *Streptococcus pluranimalium*.

INTRODUCTION

Au début de l'année 2018, le Sud-ouest de la France a connu une forte incidence de cas de mortalité anormale dans certains élevages de canards mulards prêts à gaver (PAG). Les principales lésions observées étaient une splénomégalie sévère associée à des lésions d'endocardites végétantes et d'infarcti spléniques.

Chez les galliformes, les septicémies bactériennes conduisant à des lésions d'endocardite sont très souvent associées aux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* (Hedegaard et al., 2009; Bisgaard et al., 2010). Ainsi, une infection expérimentale sur des poulets reproducteurs de chair a démontré le rôle de *Streptococcus pluranimalium* dans la survenue des lésions d'endocardites (Hedegaard et al., 2009). L'absence de cas d'endocardites rapportées chez le canard dans la littérature et la survenue antérieure d'épisodes sporadiques similaires en France ont justifié la mise en place d'une collaboration entre l'ENVT et les vétérinaires praticiens.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Description de l'étude clinique

Sur la période de janvier à mars 2018, une mortalité anormale associée à un isolement et une identification Maldi-Tof par les laboratoires vétérinaires partenaires de *Streptococcus pluranimalium* a été rapportée dans quatorze élevages de canards mulards prêt-à-gaver, dans divers départements du Sud-Ouest (Corrèze, Aveyron, Landes, Lot). Il a été demandé aux vétérinaires des élevages concernés d'envoyer les colonies isolées des élevages touchés ou d'effectuer un suivi d'élevage en collaboration avec l'ENVT. 7 souches issues de 7 élevages différents ont été envoyées à l'ENVT et quatre élevages ont été directement audités par l'ENVT permettant l'autopsie d'animaux, la collection de prélèvements ainsi que la réalisation d'examens complémentaires sur organes. Ainsi, 11 souches de 11 élevages différents ont été collectées. Sur deux des quatre élevages audités, il a été réalisé, en plus des analyses bactériologiques et histologiques sur lésions, une approche moléculaire.

1.2. Histopathologie

Dans deux élevages investigués, les cœurs présentant des endocardites ont été fixés dans du formol à 10% et une analyse histologique a été réalisée par le laboratoire d'histologie de l'ENVT.

1.3. Examen bactériologique

Sur les quatorze élevages répertoriés, 7 souches identifiées comme étant du *Streptococcus pluranimalium* nous ont été envoyées par les laboratoires partenaires. Leur isolement a été réalisé

par ensemencement sur gélose au sang à 5% sang de mouton (Biorad - ref 63784) puis incubé pendant 16h à 37°C en aérobie et/ou atmosphère enrichie en CO₂. Une lecture culturale suivi d'un repiquage, une coloration de Gram, un test catalase et une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF ont été réalisés avant le transfert des isolats à l'ENVT envoyés en gélose de conservation (Biorad – ref 63683).

Dans les 4 élevages suivis par l'ENVT, les animaux ont été autopsiés et les organes prélevés entiers le plus stérilement possible. Les cœurs, foie et rate ont été cautérisés en surface avant d'être ouverts sous hotte à flux laminaire. Lors de la dissection du cœur gauche, des fragments de bourgeonnements anormaux situés sur la valve mitrale ont été prélevés et étalés sur gélose Columbia + 5% sang de mouton (COS) (Biomerieux - ref 43041). Après lecture, les colonies présentant une hémolyse partielle (alpha) ont été repiquées sur gélose Acide Nalidixique Colistine + 5% sang de mouton (CNA) (Biomerieux – ref. 43071) puis incubés 24h à 48h sous cloche, en atmosphère enrichie en CO₂ à 37°C avant d'être déposées sur plaque afin d'être identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-Bio Typer, Bruker ©, Billerica, Etats-Unis).

1.3. Biologie moléculaire

Il a été découpé 3mm³ de valve mitrale présentant des lésions puis il a été réalisé deux lyses chimiques sur tissu à l'aide du kit DNeasy blood and Tissue Kits (Qiagen ©). L'ADN a été extrait à l'aide du Nucleospin RNA virus kit (Macherey-Nagel ©, Düren, Allemagne) à partir de végétations prélevées stérilement sur les valves mitrales. Une PCR classique a été réalisée à l'aide du couple d'amorces 534R-27F ciblant la région d'intérêt V1-V3 de l'ARN 16S. Les mélanges PCR ont été réalisés à l'aide du KAPA Taq PCR kit (Sigma-Aldrich©, St. Louis, USA) et contenait 16,9 µL d'eau distillée, 2,5µL of 10x KAPA Taq buffer, 0,5µL of 10mmol/litre KAPA dNTP mix, 1µL of 10 µmol/litre d'amorce 27F (Jiang et al., 2006) et 1µL de 10 µmol/litre d'amorce 534R (Muyzer, et al., 1993), 0,1 µL of KAPA Taq polymérase et 3 µL d'ADN. Le programme d'amplification a débuté par une étape de 3 minutes à 95°C suivie de 40 cycles aux conditions suivantes : 30 s à 95°C, 30 s à 50°C et 60 s à 72°C. La fin du programme s'est terminée par 3 min à 72°C. La taille du fragment d'ADN amplifié était de 490 pb.

Les produits d'amplification ont été purifiés après une migration sur gel d'agarose à 1,5% de 40 minutes à l'aide du kit Nucleospin Gel and PCR Clean up (Macherey-Nagel ©, Düren, Allemagne). Le séquençage du fragment d'ADN a été réalisé par GATC (Eurofins Genomics Compagny, Allemagne) par la méthode Sanger. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel BioEdit © afin de réaliser un blast

des séquences (Altschul et al., 1990)) pour confirmer l'identification.

2. RESULTATS

2.1. Autopsies et analyse histologique

Les 11 élevages de canards présentant des signes cliniques étaient âgés de 15 à 58 jours. Ils présentaient une forte hétérogénéité associée à une mortalité brutale comprise entre 1.1 et 30% du lot indépendamment de l'état des canards (petits sujets ou sujets en très bon état corporel). Il a aussi été constaté dans deux élevages la présence assez importante de becs courts et de canards ayant des « profils d'oies » au sein du lot, pouvant faire suspecter une atteinte par la maladie de Derzsy. A l'autopsie des cas suivis par l'ENVT, une cardiomégalie et une splénomégalie sévères avec présence de foyers nécrotiques allant jusqu'à 5 mm de diamètre étaient présentes (Figure 1a)). De même, à l'ouverture des cœurs présentant une cardiomégalie, les valves mitrales étaient dans la très grande majorité touchées par des lésions d'endocardites végétantes (Figure 1b).

Les animaux autopsiés par les différents laboratoires vétérinaires présentaient également systématiquement ces deux observations : splénomégalie avec foyers nécrotiques (Figure 1c) et endocardites végétantes comme lésions principales.

L'analyse histologique a mis en évidence :

- Un thrombus volumineux, fibrino-leucocytaire et adhérent en surface de la valve mitrale avec de très nombreuses colonies bactériennes, des infarcti myocardiques (Figure 2a) évocateur d'une endocardite végétante septique.
- Un large foyer fibrino-nécrotique et hémorragique au sein de la pulpe splénique cerné d'une réaction macrophagique avec cellules géantes multinucléées (Figure 2b), des infarcti spléniques.
- Une congestion hépatique et/ou pulmonaire passives

2.2. Analyses microbiologiques et virologiques

Dans les 4 élevages étudiés, les examens bactériologiques à partir des végétations ont mis en évidence des cultures pures de colonies bactériennes d'aspect lisse blanchâtre de petite taille présentant une hémolyse partielle (Figure 3a). Les colonies à partir de chacun des élevages ont été identifiées par spectrométrie de masse comme étant du *Streptococcus pluranimalium*. Dans le cadre de l'approche moléculaire, le séquençage a montré que les deux séquences d'ADN correspondaient bien à l'espèce *Streptococcus pluranimalium* et que celles-ci possédaient un pourcentage d'homologie similaire (isolat 13 et 14). De plus, les 7 isolats provenant des

isolements de terrain ont également été reconfirmées par MALDI-TOF à l'ENVT. Dans un des élevages présentant deux bâtiments, il a été isolé deux souches. Il a ensuite été réalisé un dendrogramme de 12 souches provenant des 11 élevages étudiés afin d'évaluer leur degré de similitudes (Figure 3b). Les vétérinaires associés ont également transmis les résultats complémentaires d'analyses PCR réalisés par Scanelis© (9 Allée Charles Cros, 31771 Colomiers Cedex, France) sur écouvillon cloacal, rate et bourse de Fabricius prélevés dans les différents élevages. Ainsi, sur les onze élevages répertoriés, 7 étaient positifs pour la PCR ciblant le parvovirus de la maladie de Derzsy (GPV) avec des charges variables. Un seul lot était également positif pour la PCR circovirus du canard (DuCV).

2.3. Pathogénie de l'infection

En médecine humaine, l'endocardite infectieuse est très bien décrite avec notamment une forte proportion d'endocardites à streptocoques et à staphylocoques. L'association des lésions d'endocardites et des foyers nécrotiques observée sur la rate s'explique par un mécanisme très bien décrit en médecine humaine. Dans le cas précis des streptocoques causant des endocardites, une septicémie sévère entraîne la formation de nombreux thrombi végétants à la surface de la valve. L'infection devient alors chronique et des embolies bactériennes sont relâchées à intervalles réguliers dans la circulation générale. Ceux-ci peuvent notamment atteindre la rate et former des abcès spléniques (McDonald et al., 2009). Les lésions observées sur les valves et endocarde peuvent rapidement conduire à une insuffisance cardiaque et peuvent expliquer la mort subite observée chez ces canards. On peut supposer dans notre cas que *Streptococcus pluranimalium* est ici la cause des lésions d'endocardites et d'infarcti spléniques. Cependant, l'origine de cette septicémie sévère reste à éclaircir. En effet, elle peut être le résultat du pouvoir pathogène primaire de *Streptococcus pluranimalium*, ou être secondaire à l'action d'un facteur immunosuppresseur, comme par exemple le virus de la maladie de Derzsy. En effet, celui-ci est souvent présent en élevage car sa circulation dépend de la biosécurité existante sur l'élevage et de la protection vaccinale des reproducteurs. De la même façon, un stress environnemental ou une erreur technique peuvent également être à l'origine d'une baisse immunitaire favorisant les infections bactériennes.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a permis de mettre en lumière plusieurs cas d'infection à *Streptococcus pluranimalium* dans des élevages de canards mulards PAG du Sud-Ouest. Le tableau lésionnel associé a présenté des lésions d'endocardites végétantes septiques encore jamais observées à ce jour chez le canard. L'analyse en cours

du génome complet de 2 souches permettra de documenter le contenu génétique dont les facteurs de virulence ainsi que la variabilité. Une amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD), une approche multi-locus (MLST) et des comparaisons de génomes

permettront également de mieux apprécier la proximité des souches identifiées. En complément, une infection expérimentale permettra de mieux comprendre la pathogénie du processus infectieux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bisgaard M, Bojesen AM, 2010. Avian Pathology., (39), 3.
 Hedegaard L., Christensen H., 2009. Avian Pathology, (38), 155–160.
 McDonald, Jay R., 2009. Infectious Disease Clinics of North America. (23), 643–664.
 Altschul SF1, Gish W., 1990. Basic local alignment search tool., Oct 5; 215(3) : 403-10.
 Muyzer, G.A, de Waal E.C, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol. 59 (3) : 695-700.
 Jiang H., Dong, H., 2006. Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. Appl Environl Microbiol. 72 (6).

REMERCIEMENTS

La docteure Sonia Chesnier (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal), les vétérinaires praticiens, les éleveurs et les étudiants en clinique aviaire à l'ENVT ont contribué aux résultats de cette étude.

Figure 1 : Tableau lésionnel macroscopique de canards infectés à *Streptococcus pluranimalium*. a) La flèche indique les foyers nécrotiques sur l'épicaarde. b) Le cœur ouvert présente des végétations sur la valve mitrale. c) Illustration d'un foyer nécrotique sur une rate hypertrophiée.

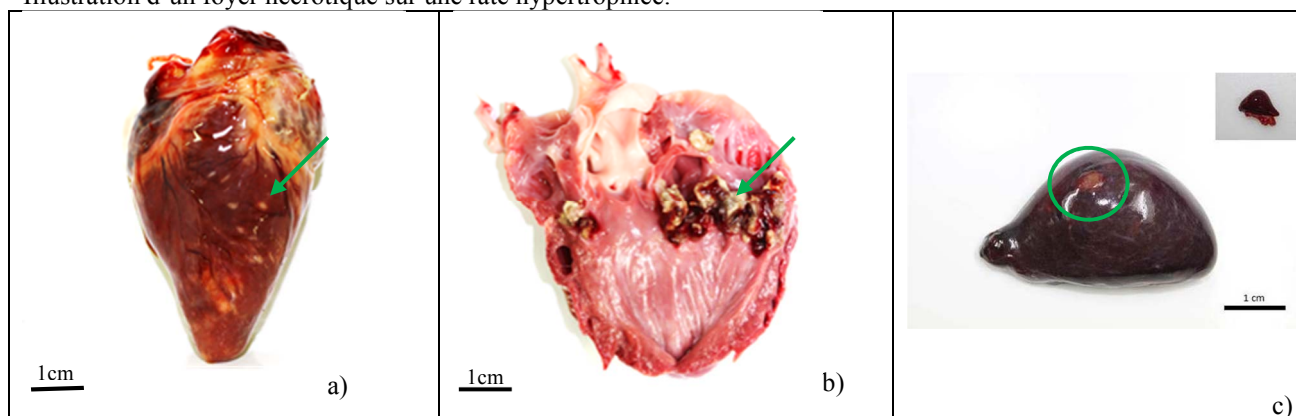


Figure 2 : Tableau lésionnel microscopique des lésions végétantes prélevées sur les valves mitrales

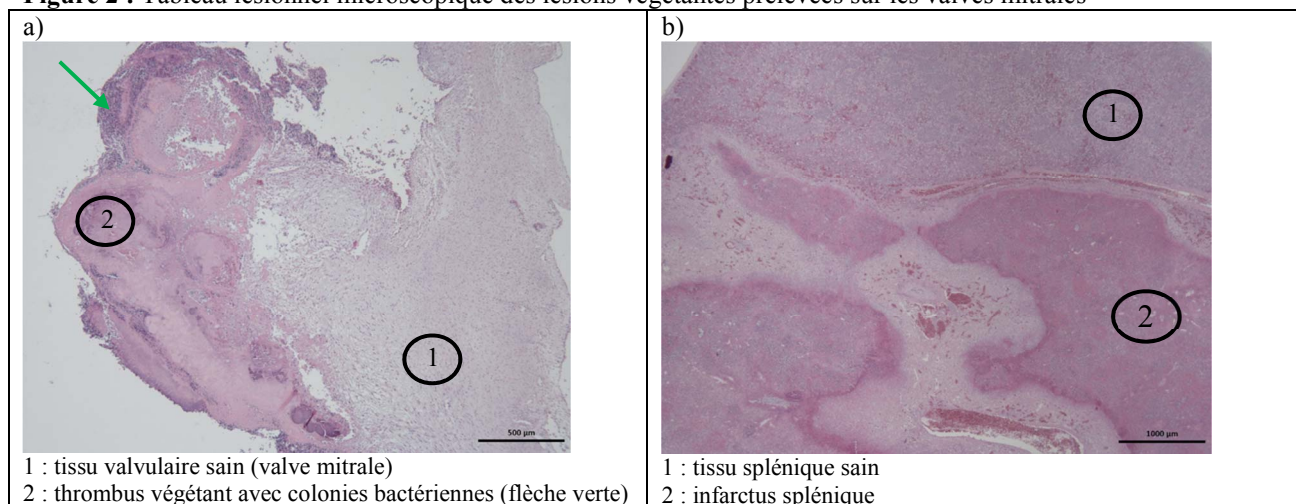


Figure 3. a) Aspect des colonies sur gélose au sang et identification par MALDI-TOF des isolats. La figure a) illustre l'aspect des colonies *Streptococcus pluranimalium* présentes sur gélose COS. **b)** Dendrogramme de 12 souches isolées (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12) ainsi que des souches de la base de donnée commerciale Bruker souche de *Streptococcus pluranimalium* (15636 DSM) ainsi qu'un « outgroup », ici des isolats des deux espèces les plus proches de *Streptococcus pluranimalium* (*Streptococcus hyovaginalis* (12 221, 12222 DSM) et *Streptococcus thoraltensis* (12 219, 12220 DSM).

