

ENTERITE ULCERO-NECROTIQUE CHEZ LA PERDRIX : RESULTATS PRELIMINAIRES DE L'EVALUATION D'UN OUTIL PCR POUR CONFIRMER LE DIAGNOSTIC CLINIQUE

Nicolas Viloux¹, Gauthier Delvallez², Corentin Bourgeois¹, Jean Sautereau², Christelle Mazuet², Rozenn Souillard³, Alexandre Vove⁴, Laure Diancourt², Caroline Le Maréchal³

1 : LABOVET CONSEIL, RESEAU CRISTAL, Les Herbiers et Challans

2 : CNR BACTERIES ANAEROBIES ET BOTULISME, UNIVERSITE PARIS CITE, INSTITUT PASTEUR, 25-28 rue du Dr Roux, 75724 PARIS CEDEX 15

3 : ANSES, LABORATOIRE DE PLOUFRAGAN-PLOUZANE-NIORT, BP 53 22440 PLOUFRAGAN

4 : MC VET CONSEIL, RESEAU CRISTAL, Châteauneuf-sur-Loire

n.viloux@reseaucristal.fr

RÉSUMÉ

L'entérite ulcéro-nécrotique (EU) est une maladie aiguë des volailles due à *Clostridium colinum* (*C. colinum*), bactérie sporulante très difficile à isoler et à cultiver. L'EU entraîne une augmentation soudaine de la mortalité et touche en particulier les élevages de perdrix rouges et grises en France. Le diagnostic est établi sur la base de l'observation des signes cliniques et lésions caractéristiques observées au niveau des caeca, du rectum ou parfois d'autres portions intestinales et du foie. Il n'y a pas actuellement d'outils disponibles en laboratoire en France pour confirmer biologiquement ce diagnostic.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'utilisation d'un outil PCR de détection de *C. colinum* pour confirmer le diagnostic d'EU chez des perdrix. Pour cela, des foies et caeca de sujets présentant des signes cliniques évocateurs d'EU et de sujets provenant de lots témoins, ne présentant pas de signes d'EU, ont été analysés. Les matrices ont été prélevées sur au moins un animal dans chaque lot de perdrix puis mis en culture dans du bouillon FCMM et incubés 48h en conditions anaérobies à 35°C. L'ADN a ensuite été extrait à l'aide d'un kit commercial et *C. colinum* détecté par une PCR ciblant une région spécifique du 16S rARN.

Les résultats préliminaires de cette étude montrent une détection de *C. colinum* dans les caeca de perdrix provenant de 8 élevages cas sur les 9 investigués et dans les caeca d'un élevage témoin sur les 7 élevages témoins inclus dans l'étude. Aucune détection de *C. colinum* n'a été mise en évidence dans les foies. La confirmation en laboratoire de la détection de *C. colinum* dans 8 élevages sur les 9 présentant une suspicion d'EU est très prometteuse. L'élevage témoin (sans tableau clinique évocateur d'EU) pour lequel *C. colinum* a été détecté présente un historique d'EU sur des lots précédents. Ce résultat suggère l'existence potentielle d'un portage sain au niveau du tractus digestif dans les élevages avec historique d'EU et montre l'importance de mener des investigations complémentaires pour mieux comprendre l'épidémiologie et la pathogénie de cette maladie encore méconnue.

ABSTRACT

Diagnosis of ulcerative enteritis in partridges : preliminary results of the evaluation of a PCR-based tool

Ulcerative enteritis (UE) is a poultry severe disease due to *Clostridium colinum* (*C. colinum*), a spore-forming bacteria, really tricky to isolate and cultivate. UE induces a sudden rise in mortality and concerns in particular red and grey partridges. Diagnosis is based on clinical signs and lesions detected in caeca, rectum, sometimes other parts of the intestines or in the liver. There is no available diagnostic tool in France to confirm the diagnosis now.

The objective of this study is to evaluate a PCR tool to detect *C. colinum* to confirm the UE diagnosis in partridges. Livers and caeca from symptomatic partridges and from control animals were analyzed. Matrices were collected from at least one animal per flock and were cultured in FCMM broth before an incubation under anaerobic conditions at 35°C. DNA was extracted using a commercial kit and *C. colinum* was detected using a PCR targeting a specific region of the 16S rARN.

Preliminary results showed a detection of *C. colinum* in the caeca of symptomatic partridges from 8 farms among the 9 tested and in 1 farm out of the 7 ones in the control group. *C. colinum* was not detected in livers. The detection of *C. colinum* in 8 suspicions out of the 9 included in this study is really promising. The control farm (with no clinical sign) for which *C. colinum* was detected has a history of UE on previous flocks. This result suggests a potential asymptomatic carriage of *C. colinum* in the digestive tract of partridges in farms with a history of UE and shows the relevance of implementing investigations to better understand the epidemiology and pathogenesis of this unknown disease.

INTRODUCTION

L'entérite ulcéro-nécrotique (EU) est une maladie sévère des volailles qui se traduit par une augmentation soudaine de la mortalité. Elle est due à la bactérie *Clostridium colinum* (*C. colinum*), qui est une bactérie anaérobie sporulante. Sur la base du séquençage du 16S rRNA, elle est proche de *Clostridium piliforme*, agent responsable de la maladie de Tyzzer (Feldman et al. 2006). En 2013, une étude sur la phylogénie des clostridies a suggéré le changement de nom de *C. colinum* par *Tyzzerella colina* (Yutin et al. 2013). Pour des raisons de facilité de lecture, le terme « *Clostridium colinum* » sera utilisé dans cet article. Outre cette particularité concernant la taxonomie, cette bactérie est difficile à isoler et à cultiver (Kondo, Tottori, and Soki 1988) et peu documentée dans la littérature scientifique. L'EU a été décrite initialement chez le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) mais concerne de nombreuses espèces aviaires comme le poulet, la dinde, le faisan, les cailles, etc (Bano et al. 2008). Des cas ont été rapportés dans plusieurs régions du monde : Japon, Canada, Jordanie, États-Unis (Ononiwu et al. 1978, Roussan et al. 2009, Kondo, Tottori, and Soki 1988). En France, l'EU est actuellement particulièrement problématique dans les élevages de gibiers, notamment de perdrix rouges et grises. Le diagnostic est posé sur la base de l'observation des signes cliniques et des lésions caractéristiques observées au niveau des caeca, du rectum ou parfois d'autres portions intestinales et du foie. Il n'y a pas actuellement d'outils disponibles en laboratoire en France pour confirmer biologiquement ce diagnostic en routine. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'utilisation d'un outil PCR de détection de *C. colinum* pour confirmer le diagnostic d'EU chez des perdrix, établi sur la base des signes cliniques.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Collecte des échantillons

L'étude a été menée entre juin et septembre 2023 et comprend 9 élevages de perdrix présentant des signes cliniques caractéristiques d'EU et 7 élevages témoins sans signes cliniques évocateurs d'EU au moment de la réalisation des prélèvements. Parmi les 7 élevages témoins, un élevage était sain mais avec un historique d'EU, les 6 autres présentaient des signes cliniques non évocateurs d'EU tels qu'amaigrissement, diarrhées, prostration, entérite non spécifique, mortalité. Treize élevages de perdrix grises et 3 élevages de perdrix rouges ont été inclus dans l'étude. Dans chaque élevage, les caeca et foies ont été prélevés sur un sujet puis envoyés au laboratoire pour analyse.

1.2. Conditions d'enrichissement et extraction d'ADN

Les matrices ont été diluées au dixième et cultivées dans du bouillon Fortified Cooked Meat Medium (F-CMM) et incubées 48h en conditions anaérobies à 35°C. L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

1.3. Détection par PCR

La PCR a été réalisée selon une méthode décrite par Bano et al. 2008 (Bano et al. 2008). Les amorces ciblent la région hypervariable du 16S rRNA (amorce sens (5'-GTCGAGCGGAGTTTATGGG-3') et antisens (5'-CATTACACAGATTGTCATCGGG-3')).

1.4. Séquençage des produits PCR

Les produits PCR positifs sont systématiquement séquencés par la société Mycrosynth (France) et les données obtenues ont été analysées via BioNumerics v7.6 (Applied Maths).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le diagnostic de l'EU se fait historiquement sur la base de l'observation des signes cliniques et lésions macroscopiques. Un outil PCR décrit dans la littérature scientifique (Bano et al. 2008) a été testé dans le cadre de cette étude pour confirmer en laboratoire la présence de *C. colinum*. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 1.

2.1. Détection dans les foies

La bactérie n'a été détectée par PCR dans aucun foie au cours de cette étude, que ce soit dans les matrices collectées au niveau d'animaux symptomatiques ou d'animaux en provenance d'élevages témoins. Une étude menée au Japon sur des cas d'EU chez des poulets avait permis de détecter et d'isoler des souches de *C. colinum* à partir de foies de poulets (Kondo, Tottori, and Soki 1988). Il ne s'agissait pas de la même espèce aviaire que dans notre étude, ce qui pourrait expliquer la différence. Par ailleurs, l'étude menée au Japon portait sur des foies avec des nécroses, ce qui n'était pas le cas dans notre étude.

2.2. Détection dans les caeca

C. colinum a été détecté par PCR dans les caeca provenant de 8 élevages sur les 9 élevages testés et présentant des animaux avec des signes cliniques caractéristiques de l'EU.

Le séquençage de l'ensemble des produits de PCR a permis de confirmer l'identification de la bactérie comme *Clostridium colinum* pour l'ensemble des prélèvements positifs.

Le nombre de sujets prélevés dans notre étude était faible, la collecte d'un nombre d'échantillons plus important serait à tester afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaires pour garantir la détection de la bactérie en cas de suspicion d'EU.

Le milieu d'enrichissement utilisé est un milieu non sélectif permettant la croissance des bactéries anaérobies de manière globale. La flore dominante peut épuiser certains nutriments au cours de sa croissance, et ainsi empêcher la flore minoritaire de se développer, ce qui pourrait expliquer la négativité des caeca en provenance d'un animal d'un élevage.

C. colinum n'a été détectée dans les caeca de perdrix que dans un élevage témoin, pour lequel un historique d'EU était connu sur les lots précédents. Ce résultat suggère la possibilité de l'existence d'un portage asymptomatique de *C. colinum* chez les perdrix, notamment dans les élevages avec historique d'EU.

Compte tenu de l'historique d'EU dans cet élevage, il est possible que la bactérie ait persisté dans l'environnement de l'élevage suite au premier épisode clinique et que les animaux soient devenus porteurs sains via l'exposition à l'environnement contaminé. Il n'existe pas à notre connaissance de données sur les mécanismes à l'origine de l'initiation d'un épisode d'EU, sur la prévalence de portage sain de *C. colinum* ou bien sur la persistance de *C. colinum* dans l'environnement. La disponibilité de l'outil PCR présenté ici est précieuse pour investiguer ces différents aspects de l'EU.

Enfin les résultats montrent que *C. colinum* n'a pas été détectée dans les caeca des autres élevages témoins avec des animaux présentant des signes cliniques non évocateurs d'EU, confortant la spécificité de l'approche proposée.

CONCLUSION

Cette étude préliminaire montre que l'outil PCR qui a été testé permet de détecter *C. colinum* dans la plupart des élevages testés et peut donc être utilisé pour confirmer le diagnostic en laboratoire. Cette étude montre par ailleurs que la bactérie peut être détectée sur des sujets sains dans des élevages avec historique d'EU, suggérant une persistance du pathogène dans ces élevages. Des investigations complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de l'EU et sa pathogénèse.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs pour leur participation à l'étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bano, L., I. Drigo, K. S. Macklin, S. W. Martin, R. S. Miller, R. A. Norton, O. A. Oyarzabal, and S. F. Bilgili. 2008. "Development of a polymerase chain reaction assay for specific identification of *Clostridium colinum*." *Avian Pathol* 37 (2):179-81. doi: 10.1080/03079450801918662.
- Feldman, S. H., A. Kiavand, M. Seidelin, and H. R. Reiske. 2006. "Ribosomal RNA sequences of *Clostridium piliforme* isolated from rodent and rabbit: re-examining the phylogeny of the Tyzzer's disease agent and development of a diagnostic polymerase chain reaction assay." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 45 (5):65-73.
- Kondo, F., J. Tottori, and K. Soki. 1988. "Ulcerative enteritis in broiler chickens caused by *Clostridium colinum* and *in vitro* activity of 19 antimicrobial agents in tests on isolates." *Poult Sci* 67 (10):1424-30. doi: 10.3382/ps.0671424.
- Ononiwu, J. C., J. F. Prescott, H. C. Carlson, and R. J. Julian. 1978. "Ulcerative enteritis caused by *Clostridium colinum* in chickens." *Can. Vet. J.* 19:226-229.
- Roussan, D. A., R. H. Al Rifai, G. Y. Khawaldeh, and W. S. Totanji. 2009. "Flock-level prevalence of *Clostridium colinum* in broiler flocks with digestive disease in Jordan by polymerase chain reaction." *Poult. Sci.* 88:1639-1642.
- Yutin N, Galperin MY. A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia. *Environ Microbiol.* 2013 Oct;15(10):2631-41. doi: 10.1111/1462-2920.12173. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23834245; PMCID: PMC4056668.

Figure 1. Résultats préliminaires de la détection de *Clostridium colinum* par PCR dans les caeca et foies prélevés sur des animaux présentant des signes cliniques caractéristiques d'EU et des animaux sans signes cliniques évocateurs d'EU dans des élevages de perdrix rouges et grises

