

SELECTION PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE DE SOUCHES D'*E. COLI* O78 POUR LA PRODUCTION D'AUTOVACCINS CHEZ LE CANARD DE BARBARIE

M. Mellal¹, 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 souches APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) sont responsables de la colibacillose qui est l'une des infections bactériennes les plus fréquentes en filière canard de Barbarie en France et qui cause des pertes économiques sévères.

L'objectif de ce travail a été de caractériser des souches d'*E. coli* du sérotype O78 avec une méthode innovante, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), pour choisir les souches à incorporer dans les autovaccins. Dans le passé, il avait été mis en place, dans un élevage breton de canards, un autovaccin trivalent différent adapté à chacun des deux bâtiments. Cette solution autovaccinale complexe n'avait pas pu empêcher l'élevage d'être confronté à des épisodes cliniques sévères durant l'été 2023 avec un recours à plusieurs traitements antibiotiques. Les souches d'*E. coli* isolées lors de ces épisodes cliniques sont exclusivement du sérotype O78. D'autres souches plus anciennes également du sérotype O78 (isolées en 2017 et 2021) incorporées en partie dans l'autovaccin trivalent ont été aussi caractérisées par infrarouge. Les résultats obtenus montrent que les souches isolées en 2023 sont différentes en fonction des bâtiments. Sur la base de ce résultat, il a été décidé de mettre en place un autovaccin monovalent différent par bâtiment pour les nouvelles bandes de canards.

ABSTRACT

SELECTION BY INFRARED SPECTROSCOPY OF *E. COLI* O78 STRAINS FOR THE PRODUCTION OF AUTOVACCINES IN MUSCOVY DUCKS

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) are responsible for colibacillosis and is one of the most frequent bacterial infections responsible for significant economic losses in the French Muscovy duck industry.

The objective of this work was to characterize strains of the *E. coli* O78 serogroup with an innovative method: Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy was utilized to select the optimal strains to incorporate into autogenous vaccines.

Retrospectively two different trivalent autovaccines were formulated for two separate buildings on a Breton duck farm. This complex autovaccine solution could not prevent the farm from being confronted with severe clinical colibacillosis episodes during the summer of 2023 requiring the use of several antibiotic treatments. Strains of *E. coli* isolated during these clinical episodes belonged exclusively to the O78 serogroup. Older strains also of O78 serogroup (isolated in 2017 and 2021) partly incorporated into these trivalent autovaccines were also characterized by infrared.

The results obtained show that the O78 strains isolated in 2023 were different depending on the buildings. Based on this result, it was decided to implement a different monovalent autovaccine per building for the new flocks of ducks.

INTRODUCTION

Les souches APEC (avian pathogenic *Escherichia coli*) sont des bactéries pathogènes des volailles à l'origine d'infections localisées ou systémiques (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

Dans la filière de canard de Barbarie chair, les infections colibacillaires représentent 35% des infections respiratoires et septicémiques (Réseau Cristal – Statistiques 2021-2022) et 41,5% des pathologies signalées par les laboratoires en 2022 au RNOEA (27,2% de colibacillose respiratoire, 14,3% en septicémie - Bulletin Annuel RNOEA 2023).

Le sérotypage des souches d'*E. coli* repose sur l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes de la paroi (antigènes O). Chez les volailles, les sérogroupes dominants impliqués dans la clinique sont O1, O2 et O78. Ce dernier est considéré comme le plus pathogène des trois.

De nouvelles méthodes de caractérisation des souches bactériennes sont désormais disponibles comme la spectroscopie infrarouge (IR) à transformée de Fourier. Cette approche est 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 travail a été de caractériser des isolats d'*E. coli* O78 issus de plusieurs épisodes cliniques dans un même élevage par IR pour sélectionner les souches à incorporer dans l'autovaccin.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Origine des souches

Toutes les souches proviennent d'un élevage breton de canard de Barbarie d'une capacité de 33000 oiseaux par bande repartis sur deux bâtiments. Dans cette exploitation, il avait été mis en place dans le passé un autovaccin colibacillaire trivalent différent mais contenant au moins une valence O78 dans chacun des bâtiments. Dans le courant de l'été 2023, malgré cette solution vaccinale complexe, l'élevage avait été confronté à des épisodes de colibacillose qui ont nécessité deux traitements antibiotiques sur le bâtiment 2 et un traitement antibiotique sur le bâtiment 1 avec, à chaque fois, un impact économique négatif considérable. Trois souches d'*E. coli* exclusivement du séro groupe O78, déterminé par agglutination, ont été mises en évidence lors de ces trois épisodes cliniques.

En plus de ces trois nouvelles souches, nous nous sommes intéressés aux anciennes, isolées en 2017 et 2021, dont certaines avaient été incorporées dans l'autovaccin déjà utilisé. Au total, neuf souches du

sérogroupe O78 ont été retenues pour une comparaison par spectroscopie infrarouge.

1.2. 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 données ont été ajoutées (numéros d'isolats, sérotype et date d'isolat).

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 cultivé sur gélose TSA à 37°C pendant 18 heures selon le protocole recommandé par Bruker Daltonics.

2. RESULTATS

La comparaison par IR des souches est représentée à l'aide du dendrogramme de la figure 1 dont le seuil de coupure fixé à 0,200 permet de mettre en évidence 3 clusters différents.

Le cluster majoritaire regroupe 5 souches dont une des souches isolées en 2023 (39820) et quatre autres souches de 2021. Les deux autres souches de 2023 se regroupent dans un autre cluster (39821 et 39819). Un dernier cluster est dessiné avec une souche de 2017 et une souche de 2021.

Les souches isolées en 2023 sont différentes selon le bâtiment : la souche du bâtiment 1 (39820) est différente des deux souches du bâtiment 2 (39821 et 39819).

3. DISCUSSION

Les spectres IR qui couvrent la région polysaccharidique sont particulièrement intéressants chez les bactéries telles que les colibacilles car les glucides sont présents dans plusieurs molécules comme les capsules et surtout les lipopolysaccharides (LPS) qui sont à la base de la classification somatique « O ». 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 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 utilisé 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 les colibacilles. La caractérisation IR des 9 isolats a permis de révéler 3 clusters dont un majoritaire avec 5 souches et notamment la souche 39820 de l'épisode clinique de l'été 2023 (souche du bâtiment 1), un second cluster avec des souches anciennes et un troisième cluster plus éloigné des deux autres avec 2 souches isolées des cas cliniques de l'été 2023 dans le bâtiment 2. Les résultats du sous-typage par FT-IR au sein du sérotype O78, obtenus en un temps record, ont abouti à la mise en place d'un autovaccin monovalent spécifique de chaque bâtiment pour les bandes de canards à venir dès l'automne 2023.

CONCLUSION

Pour le vétérinaire praticien sur le terrain le recours à la spectroscopie infrarouge rend possible le sous-typage du sérotype O78 afin de choisir les souches à incorporer dans les autovaccins avec des coûts raisonnables pour l'éleveur. L'IR est un outil innovant d'exploration de la diversité phénotypique utilisable en complément de la sérologie classique pour affiner la stratégie vaccinale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dho-Moulin, M., & Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary research*, 30(2-3), 299–316.
- 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

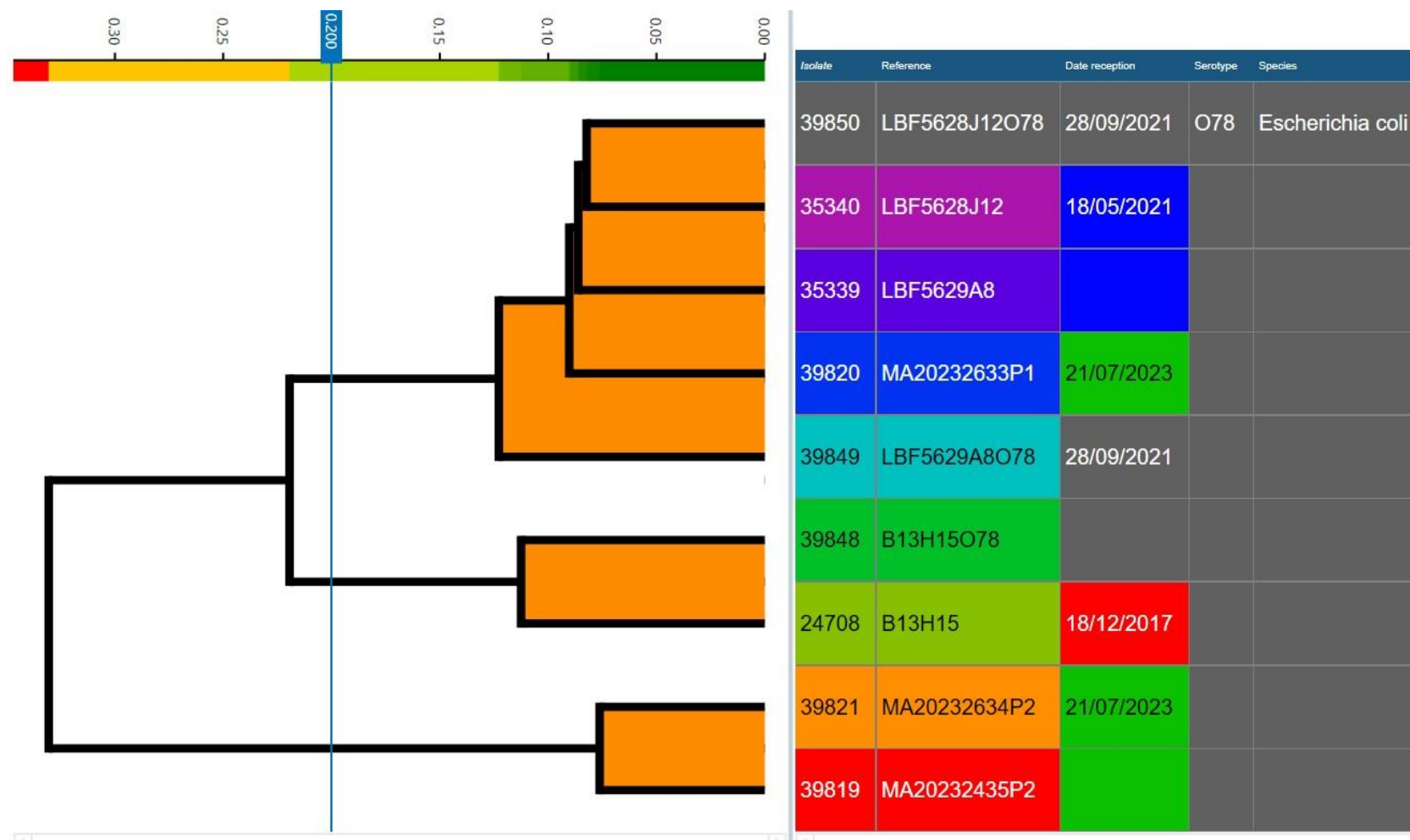


Figure 1 : Dendrogramme des souches d'*E. coli* du sérotype O78 obtenu par spectroscopie infrarouge