

RHODOCOCCHOSE EQUINE : APPROCHE EPIDEMIOLOGIQUE. BILAN DE TROIS ANNEES D'ENQUETES EN NORMANDIE.

G. Fortier¹, S. Pronost¹, M.F. Legendre¹,
V. Lecoutour¹ et S. Takai²

RESUME : Une étude de trois années en Normandie nous a conduit vers divers moyens d'approche de la rhodococcose équine.

Après avoir développé une méthode ELISA pour le diagnostic individuel chez le foal et l'étude de la prévalence globale au sein d'un haras, il semblait intéressant d'aller recueillir des informations sur les sols de haras normands dans la mesure où cette bactérie opportuniste est essentiellement tellurique. Nos observations ont pu confirmer des études précédentes [1,6], nous permettant d'évaluer le risque «rhodococcus» de 1 à 5 et de montrer l'étroite corrélation existant entre la contamination du sol, le surpâturage et le risque de rhodococcose. L'émergence de souches résistantes à l'érythromycine (10%) et de plasmides de virulence différents de ceux décrits antérieurement doit inciter à renforcer les mesures de prophylaxie médicales et zootechniques adaptées.

SUMMARY : A three-years approach of equine rhodococcosis in Normandy brought us to use different methods of diagnosis and prevention of this severe pathology.

Our first work was to use a total antibody's ELISA as a screening method in stud-farms or individual tool for confirmation diagnosis, specially for foals.

Using a selective culture medium to isolate the bacteria on biological samples such as, dungs, soil or respiratory washes, we had the opportunity to survey the antibioticsensitivity of bacterial strains in Normandy. Emergence of erythromycin resistant strains (10%) and of a new type of virulence plasmid could be a future care for prevention and treatment.

The numerous analysis we made in studs with or without cases of rhodococcosis brought us to the same conclusions as describe previously [1,6]. We have evaluated this risk from 1 to 5 and clearly saw that it was linearly correlated with the number of virulent strains of *Rhodococcus equi* on soil.



I - INTRODUCTION

Rhodococcus equi est un germe pathogène majeur du parenchyme pulmonaire du poulain de 1 à 6 mois (figure 1). Pourtant, cette bactérie tellurique est largement dispersée dans la nature et au sein de diverses espèces animales [1]. Elle se trouve présente dans l'environnement normal du poulain et pourra, dans certaines conditions, provoquer des maladies graves et parfois mortelles [2].

Dans le risque de rhodococcose pulmonaire, les facteurs déterminants sont tout d'abord l'inhalation ou l'ingestion accidentelle de la bactérie, conjuguée à un stade

d'immunodéficience physiologique du poulain lors de la chute de sa protection colostrale [3, 12].

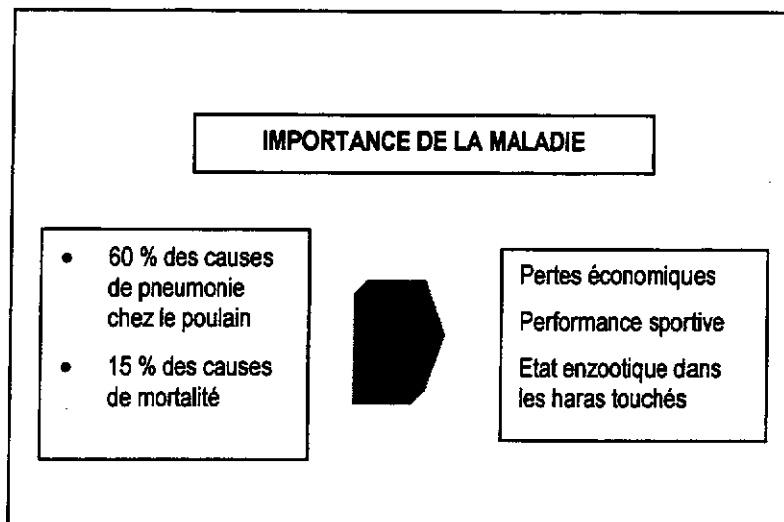
Des données plus récentes sur les facteurs de virulence (plasmide et protéine associée), ont permis de mieux caractériser les souches et d'obtenir de véritables marqueurs moléculaires [6, 7, 9].

La participation de certains types d'Herpès virus équin (EHV2) comme «promoteur» de l'infection pulmonaire chez le poulain a aussi été avancée [5].

¹ Laboratoire Départemental Frank Duncombe, 14053 Caen cedex, France

² Department of Animal Hygiene, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, Towada, Aomori 034, Japon

FIGURE 1
Incidences de la rhodococcose équine



Plusieurs éléments épidémiologiques comme l'aspect enzootique au sein des élevages ou encore l'importance du nombre de bactéries dans le sol, bien décrits à l'extérieur du territoire français [6, 7, 11], nous ont incité à étudier la présence de cette bactérie dans le sol de haras en Basse Normandie dans lesquels des cas cliniques de rhodococcose avaient été mis en évidence.

Au cours de ces travaux, il nous importait de pouvoir déterminer le taux de contamination des haras étudiés, de caractériser la virulence des souches isolées du sol, et de vérifier la sensibilité de ces souches à l'érythromycine et à la rifampicine [2, 8, 9].

Nous présentons ici, après avoir brièvement décrit notre protocole de travail, les premiers résultats de 3 années d'étude en Basse-Normandie.

II - MATERIELS ET METHODES

Les prélèvements sont réalisés par le laboratoire en différents points du haras définis en tenant compte du mode d'élevage (figure 2): Mangeoire sélective, paddock d'attente avant insémination, paddock des juments suitées... Les prélèvements sont effectués en 3 points par zone et ensemenés le jour même au laboratoire.

1 gramme de prélèvement [sol, crottin] est dilué dans un 1 ml de milieu salin, ensemené sur un milieu enrichi sélectif (cycloheximide, acide nalidixique, novobiocine) et incubé à 37°C pendant 2 à 3 jours. Après comptage des colonies suspectes, identification par une coloration de Gram et réalisation des tests sur galeries API-coryne (Biomérieux), un antibiogramme est réalisé de façon systématique sur chaque souche de *Rhodococcus equi* ainsi isolée, grâce à la méthode semi-liquide (ATB-Vet / bioMérieux).

La souche isolée est conservée en souchothèque à - 75°C sur Cryobille (laboratoire AES) et permettra ultérieurement l'élaboration d'autovaccins.

Chaque souche est également caractérisée par la recherche des facteurs de virulence [plasmide et protéine] par les techniques de biologie moléculaire. La recherche du plasmide de virulence est réalisée par amplification du gène vap (virulence associated protein) codant pour la protéine de virulence. Brièvement, après extraction des acides nucléiques, amplification à l'aide d'amorces spécifiques (5'-GACTCTTCACAAGACGGT-3' et 5'-TAGGCGTTGTGCCAGCTA-3') et séparation par électrophorèse des produits amplifiés, le fragment d'ADN de 564 pb (paires de base) caractéristique est visualisé par coloration au bromure d'éthidium (figure 3).

L'extraction plasmidique permettant de déterminer le poids moléculaire du plasmide et les expériences d'immuno-affinité à l'aide de l'anticorps monoclonal 10G5 permettant la détection de la protéine de virulence sont réalisées selon la technique décrite par Takai [9].

FIGURE 2
Principe d'étude des parcelles

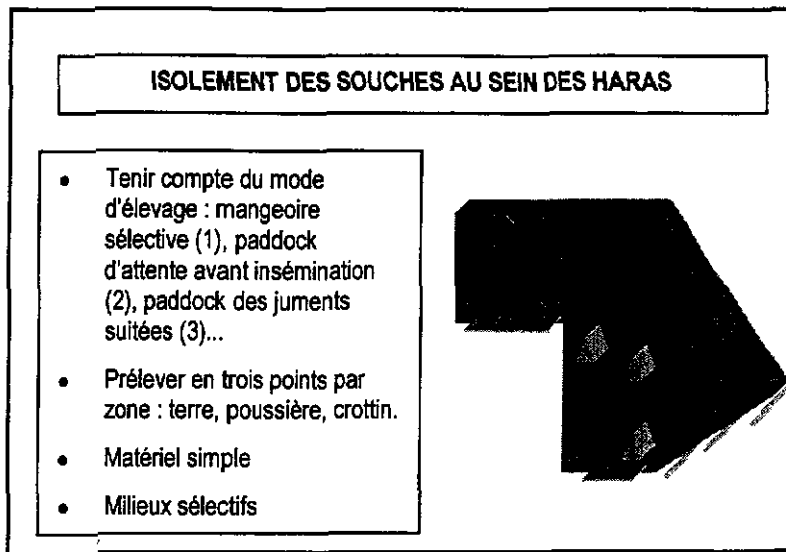


FIGURE 3
Application de l'amplification génique (P.C.R.) à *Rhodococcus equi*

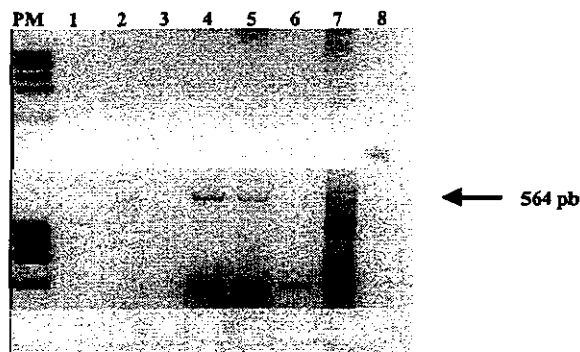


Figure 3: Détection du plasmide de virulence par PCR. L'ADN des colonies de *Rhodococcus equi* est extrait, amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques et visualisé, après séparation par électrophorèse, par coloration au bromure d'éthidium. La flèche indique la bande de 564 paires de base spécifique du gène vap. PM: référence de poids moléculaire, Φ 174 digéré par HindIII . 1 à 5: échantillons analysés. 6: contrôle + de PCR. 7: contrôle d'extraction. 8: contrôle - de PCR.

III - RESULTATS DES ENQUETES DE HARAS

Le tableau I reprend 7 cas distincts parmi les 12 études faites sur cette durée et menées à leur terme dans des conditions idoines.

Le haras n°1 (figure 4, tableau II) a connu de nombreux cas cliniques de rhodococcose par le passé. L'enquête révèle un risque élevé dû à une concentration importante en bactéries dans certaines zones sensibles de l'élevage, en particulier la mangeoire sélective des jeunes poulains. La zone 1, passage obligatoire dans lequel sont effectués les soins, constitue également une zone à risque malgré une concentration moins importante en bactéries. Néanmoins, depuis quelques années, cet élevage ne connaît plus de cas grave de rhodococcose. Le traitement des zones de faible surface (zones 1 et 2) par des produits bactéricides et un protocole de vaccination effectué à partir d'autovaccins élaborés avec les souches du sol de l'exploitation ont entraîné une diminution du nombre de cas au sein du haras. De tels résultats ont été décrits dans d'autres pays et sont admis par la communauté scientifique bien que le mode d'action et l'efficacité réelle des différents protocoles de vaccination restent à démontrer [10]. Toutes les souches isolées sont sensibles aux deux antibiotiques classiquement utilisés, érythromicine et rifampicine.

Le haras n°2 (figure 5, tableau III) a connu des cas cliniques de rhodococcose dont certains ont entraîné la mort de jeunes poulains. Les prélèvements ont été réalisés en tenant compte du mode d'élevage. Les résultats présentés montrent que l'on retrouve la bactérie en quantité plus ou moins importante en fonction des sites de prélèvement. Le paddock n°3 présentant une quantité de bactéries supérieure au seuil de contamination admis est potentiellement plus infectieux que les autres sites étudiés.

La présence du plasmide de virulence dans la plupart des souches isolées augmente le risque de maladie. Les

antibiogrammes ayant montré que toutes les souches isolées étaient sensibles à l'érythromicine et la rifampicine, le praticien pourra engager, s'il le souhaite, ce type de traitement dès l'apparition des signes cliniques.

D'une manière générale, le risque évalué après l'étude est en rapport avec « l'historique rhodococcose du haras ». Ceux ayant connu peu ou pas de cas cliniques de rhodococcose (haras 4, 6 et 7) présentent un risque faible. A l'inverse, les haras qui ont rencontré des problèmes de rhodococcose avec parfois une mortalité importante présentent un risque élevé (1, 3 et 5).

Il y a plusieurs hypothèses possibles pour expliquer cette observation.

En effet, le sol est un lieu très propice à la conservation de la bactérie, mais aussi à sa multiplication dans certaines conditions climatiques [13, 4]. D'autre part, les crottins qui sont une des sources majeures de bactéries, favorisent sa multiplication dans le sol. Il y a donc au sein d'une exploitation un véritable effet conjugué qui aboutit parfois à de véritables « contaminations » de paddock. Un autre facteur encore assez peu étudié, réside dans la nature chimique du terrain. Les conditions de pH et de teneur en certains minéraux ou métaux sont peut-être à l'origine du maintien et de la multiplication anormale de ce germe sur le sol, expliquant ainsi l'existence de « haras à rhodococcose ».

La bactérie est parfois présente à de très fortes concentrations (10^6 bactéries/g) dans les fèces des poulains infectés [6]. Les premiers résultats montrent également que le plasmide de virulence est présent dans de nombreuses souches isolées. Il paraît donc important de prendre des mesures, comme le ramassage des crottins, lorsque cela est possible, afin d'éviter une contamination accrue des sois dans les élevages où la maladie revient épisodiquement.

IV - VARIABILITE DES SOUCHES BACTERIENNES

Avec les données de biologie moléculaire dont nous disposons dès le début de cette étude [7, 9] et les observations de diverses équipes sur l'antibiorésistance [11], nous avons le souhait de travailler sur chaque haras en caractérisant les souches de rhodococcose isolées selon deux critères majeures : leurs antibiogrammes et leurs profils plasmidiques.

Des souches résistant à l'érythromicine et la rifampicine ont été isolées en France [8] et à l'étranger [9] à partir d'isolements cliniques. Les résultats présentés ci-dessus montrent que de mars 1995 à avril 1998 des souches résistantes sont également présentes dans le sol (tableau IV).

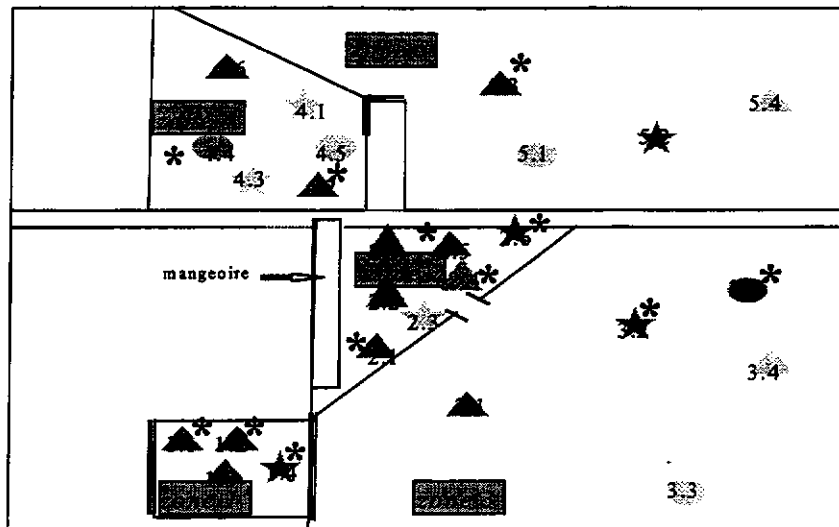
Cependant, à ce jour, aucune souche résistante à la rifampicine n'a pu être isolée du sol.

Ce constat est important car il permet de comprendre comment l'infection des pâtures par la terre peut jouer un rôle dans l'aspect enzootique de cette maladie, mais aussi comment peut s'installer au sein d'une exploitation une population de souches résistantes aux thérapeutiques usuelles. Ceci nous permet de renforcer l'attitude qui tendait à systématiquement effectuer un antibiogramme sur les souches isolées.

TABLEAU I
Présentation de plusieurs résultats d'enquêtes

HARAS	CAS CLINIQUES	MORTALITE	PROPHYLAXIE	RESULTAT DES TESTS DE CONTAMINATION DE PADDOCK	RISQUE EVALUE APRES L'ENQUETE DE HARAS [1 A 5]
N°1	+++	+	autovaccination avec des souches isolées au haras	*nombreuses parcelles avec > de 10.000 bact./g de sol *quelques paddocks réservés aux poulains étant très contaminés	5
N°2	++	++	absence	*quelques parcelles très contaminées	3
N°3	+++	+++	absence	*plusieurs paddocks réservés aux poulains [mangeoires sélectives...] fortement contaminés	4
N°4	0	0	absence	*plusieurs paddocks assez contaminés [1000 à 10000 bact./g de sol] mais uniquement sur des paddocks de passage [juments suitées avant saillie...]	1
N°5	++	++	absence	* de nombreuses parcelles très contaminées *beaucoup de sources de contamination sur des passages obligatoires pour les poulains	4
N°6	+	+	absence	*absence de paddocks très contaminés [- de 1000 bact./g de sol] *faible contamination des zones de passage	1
N°7	+	0	absence	*rares zones faiblement contaminées pas de risque de surpâturage	1

FIGURE 4
 Etude détaillée du Haras n° 1



LEGENDE

- : absence de *Rhodococcus equi*
- : 10^3 à 10^4 bactéries / gramme
- : $< 10^3$ bactéries/gramme
- : $> 10^4$ bactéries / gramme
- * : souche possédant le plasmide de virulence
- △ : terre en surface
- ☆ : terre en profondeur
- : crottin

- zone 1 : passage soins adultes et poulains
- zone 2 : mangeoire sélective des poulains
- zone 3 : paddock adultes et poulains
- zone 4 : paddock adultes et poulains
- zone 5 : paddock adultes
- : barrière

TABEAU II

Résultats des contaminations de paddock du Haras n° 1

SITES DE PRELEVEMENT	NATURE DU PRELEVEMENT	RECHERCHE DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i>	NOMBRE BACTERIES/G ^[1]	PLASMIDE DE VIRULENCE	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ^[2]
zone 1	sol	POSITIVE	500-1000	Présent	Sensible
zone 2	sol, crottin	POSITIVE	$2 \cdot 10^4$	Présent	Sensible
zone 3	sol, crottin	POSITIVE	$2 \cdot 10^4$	Présent	Sensible
zone 4	sol, crottin	POSITIVE	10^4	Présent	Sensible
zone 4	sol, crottin	POSITIVE	500-1000	Présent	Sensible

[1] : Seuil de contamination à risque : $> 10^4$ bactéries/g

[2] : Erythromycine et Rifampicine

FIGURE 5
 Etude détaillée du Haras n° 2

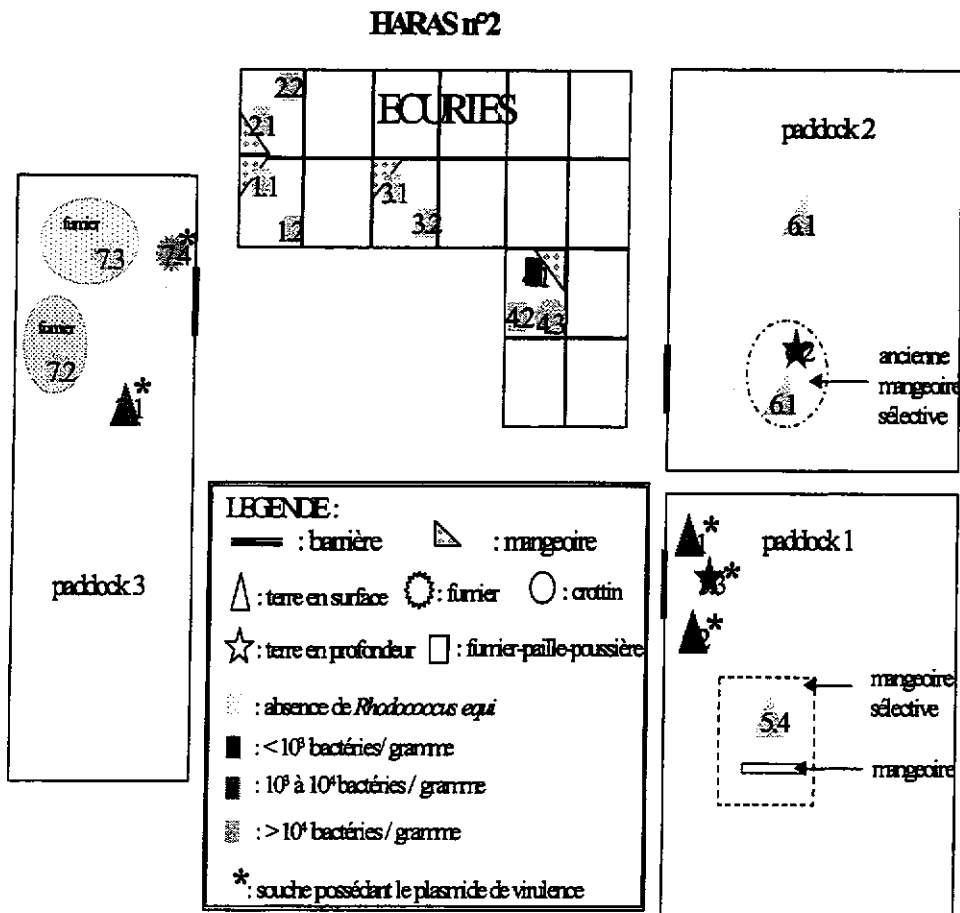


TABLEAU III
 Résultats de contamination des paddocks du Haras n° 2

SITES DE PRELEVEMENT	NATURE DU PRELEVEMENT	RECHERCHE DE <i>RHODOCOCCUS EQUI</i>	NOMBRE BACTERIES/G ^[1]	PLASMIDE DE VIRULENCE	RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES ^[2]
Ecuries	poussières, crottin	POSITIVE	100-500	Absent	Sensible
Paddock 1	sol	POSITIVE	2.10 ³	Présent	Sensible
Paddock 2	sol	POSITIVE	100-500	Présent	Sensible
Paddock 3	sol, crottin fumier	POSITIVE	2.10 ⁴	Présent	Sensible

[1] seuil de contamination à risque: > 10⁴ bactéries/g
 [2] : Erythromycine et Rifampicine

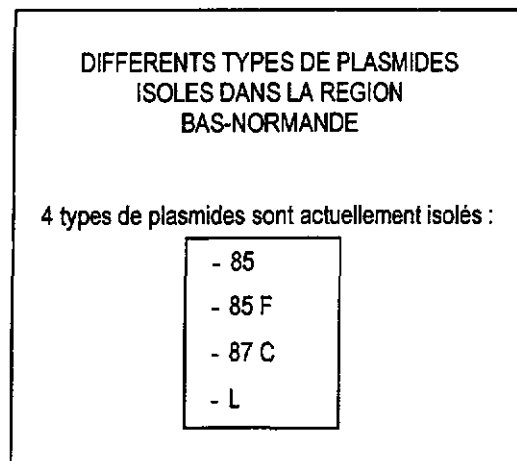
Les profils plasmidiques quant à eux, ont pu donner des enseignements intéressants sur l'épidémiologie « régionale » de la maladie et sur le potentiel d'évolution de cette bactérie.

En effet, trois des quatre plasmides identifiés à partir de nos isolats de terrain sont conformes aux types précédemment décrits. Par contre le type 85F, identifié par S. Takai, est unique et n'avait jamais été caractérisé auparavant (figure 6).

TABLEAU IV
**Antibiorésistance des souches isolées en Normandie à partir du sol
 ou de cas clinique (70 souches)**

ANTIBIOTIQUES	SENSIBILITE (%)
Gentamicine	100
Chloramphénicol	88
Tétracycline	100
Rifampicine	98
Erythromycine	88
Pénicilline	4
Amoxicilline	92
Kanamycine	8

FIGURE 6
Profils plasmidiques en Basse-Normandie



V - DISCUSSION

Le rôle de l'environnement direct du poulain dans le risque de rhodococcose a depuis longtemps été démontré par divers travaux [11, 12] et le bilan de nos trois années d'enquête en Basse-Normandie est conforme à ces derniers.

La rhodococcose du poulain peut être considérée comme **une maladie anazootique favorisée par l'immunodéficience physiologique** de l'animal [3, 13] lors de la disparition des anticorps colostraux et avant l'élaboration de son immunité active.

Sur le plan purement zootechnique, la poussière soulevée par les juments suitées lorsque la saison s'y prête est un des **facteurs de risque prépondérant**. (figures 7 et 8)

La «charge» des paddocks en bactéries par gramme de sol est, elle aussi, déterminante [6].

Plus récemment, la notion de virulence des souches telluriques a pu confirmer le rôle charnière tenu par le sol, d'autant plus que dans certaines conditions favorables, *Rhodococcus equi* s'y multiplie, aggravant encore le risque de maladie [6]. L'aspect enzootique de la maladie, tel que nous avons pu le constater, vient bien valider cette thèse. On parle souvent de «haras à rhodococcose».

L'émergence de souches du sol résistant à l'érythromycine [tableau IV] nous a beaucoup plus étonné, et peut probablement contribuer à ce que les prélèvements au sein des haras soient poursuivis pendant plusieurs années.

FIGURE 7
Identification des facteurs de risque et des outils analytiques à employer

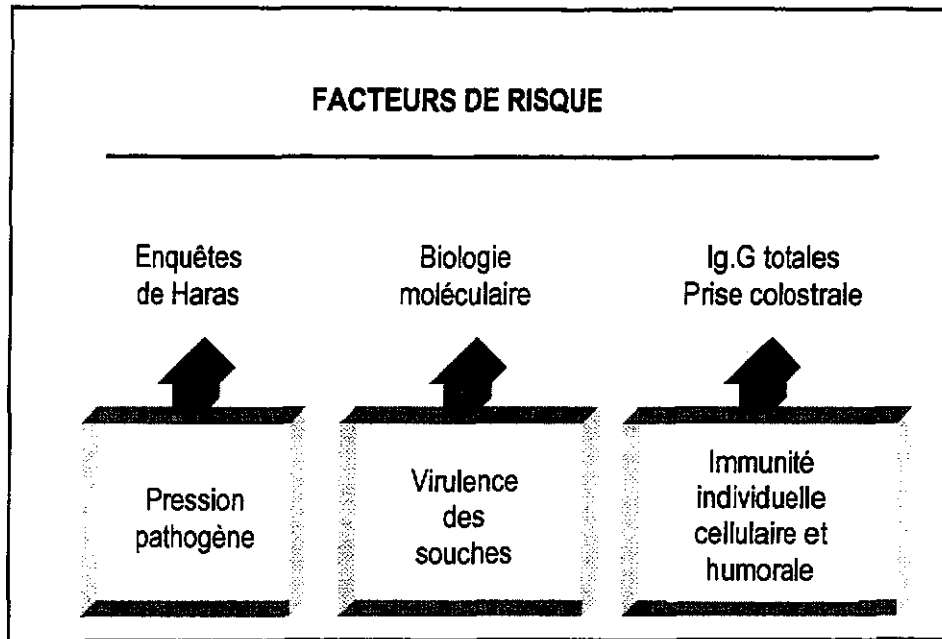
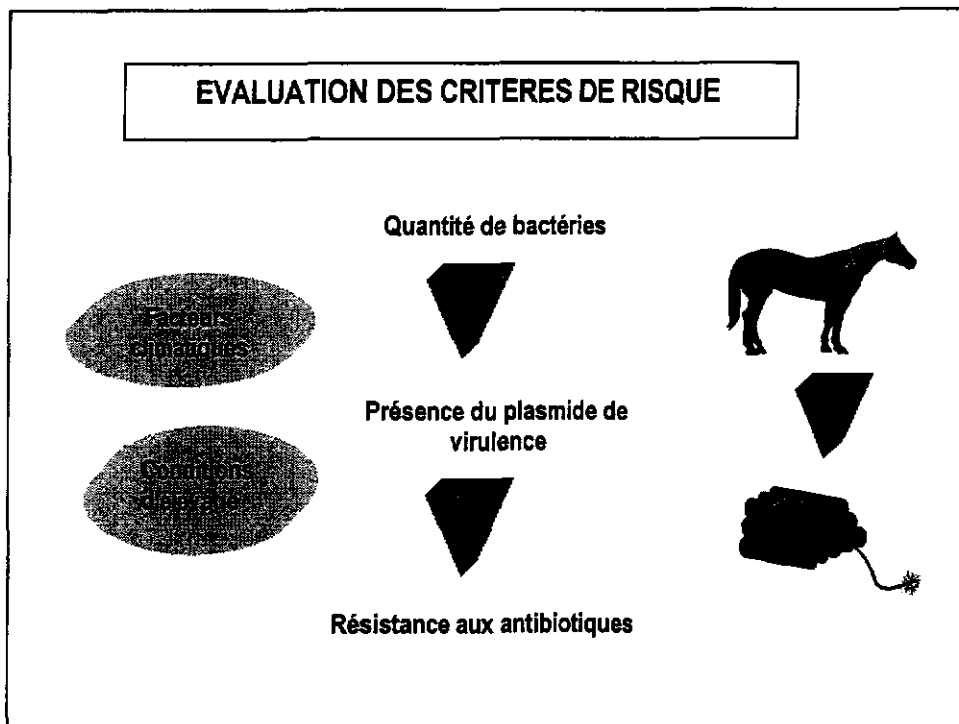


FIGURE 8
Conditions principales de déclenchement de la maladie au sein d'un haras



De plus, l'isolement et la caractérisation plasmidique de ces souches pourra contribuer à mieux comprendre l'épidémiologie et l'évolution de la maladie au sein d'un même élevage, tout en fournissant un outil précieux afin d'élaborer par exemple un autovaccin avec la souche isolée.

L'évaluation du risque de rhodococcose pourra devenir une aide à la décision d'engager une prophylaxie. Si l'efficacité de cette dernière n'est pas totalement élucidée, son incidence sur les cas de mortalité demeure très probable.

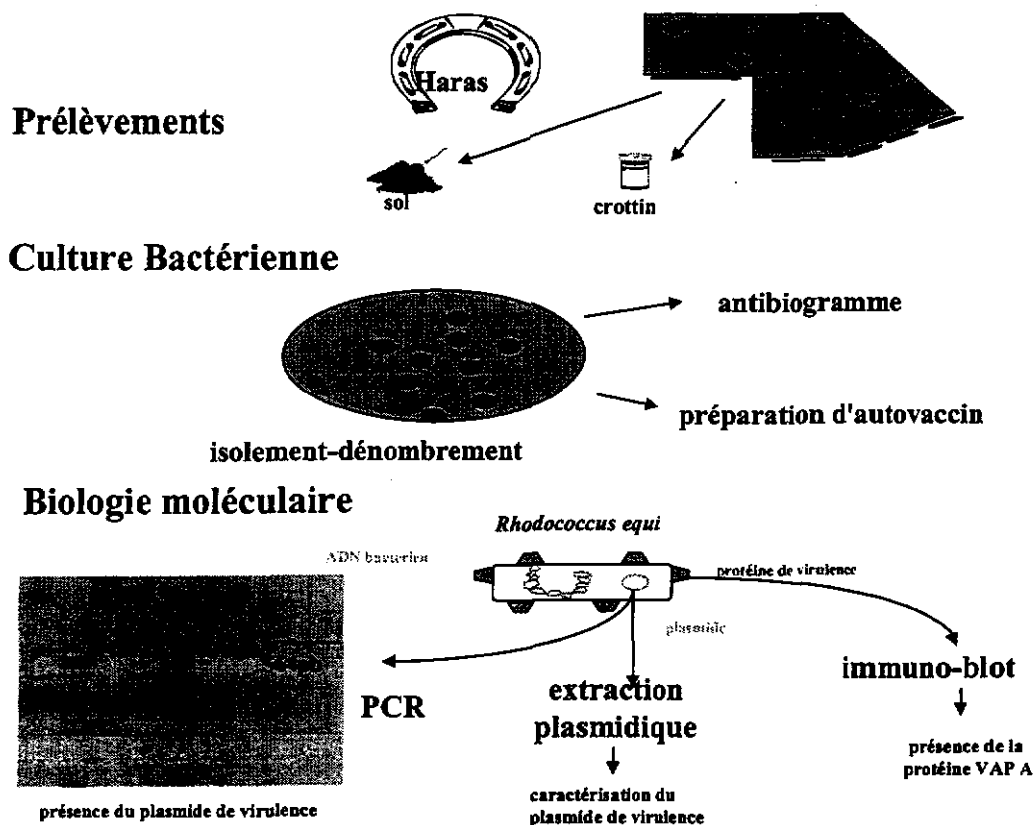
Dans certains cas, nos enquêtes ont débouché sur la prise de mesures de prophylaxie simple, visant à diminuer la

contamination des paddocks [arrosage, aspersion d'antiseptiques, hersage...]. Les résultats de ces mesures ne seront connus que lors des prochaines saisons de poulinage.

Les outils moléculaires utilisés se sont avérés très utiles (figure 9). Ils seront très probablement employés pour mieux explorer les facteurs de virulence de cette bactérie et ses capacités à acquérir des caractères phénotypiques d'antibiorésistance, qui pourraient dans un future proche, poser de graves problèmes thérapeutiques aux praticiens équins.

FIGURE 9

Les différences outils disponibles au sein d'un laboratoire



VI - BIBLIOGRAPHIE

1. Clave D., Archambaud R., Rouquet R., Massip P. et Moatti N. ~ In vitro activity of twenty antibiotics to *Rhodococcus equi* *Pathol. Biol.*, 1991, 39:424-428.
2. Giguère S. et Prescott J.F.~ Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet. Microbiol.*, 1997, 56:313-334.
3. Johnson J.A., Prescott J.F. et Markham R.J. ~ The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foal following intragastric challenge. *Vet. Pathol.*, 1983, 20:440-449.
4. Martens R.J., Fiske R.A. et Renshaw H.W. ~ Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of *Corynebacterium equi*. *Equine Vet. Journal*, 1982, 14:111-116.
5. Nordengrahn A., Rusvai M., Merza M., Eksrom J., Morein B., Belak S. ~ Equine Herpesvirus type 2 (EHV2) as a predisposing factor for rhodococcus equi pneumonia in foals. Prevention of the bifactorial disease with EHV2 immunostimulating complexes-*Veterinary Microbiology*, 1996, 51(1-2) : 55-58.
6. Prescott J. ~ Preface: An overview of the Havemeyer Foundation Workshop on « *Rhodococcus equi* and neonatal immunology of the foal ». *Vet. Microbiol.*, 1997, 56:163-165.
7. Takai S., Koike K., Ohbushi S., Izumi C. et Tsubaki S. ~ Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29:439-443.
8. Takai S., Ohbushi S., Koike K., Tsubaki S., Oishi H. et Kamada M. ~ Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses-breeding farms with and without endemic infections. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29:2887-2889.
9. Takai S., Sekizaki T., Ozawa T., Sugawara T., Watanabe Y. et Tsubaki S. ~ Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.*, 1991, 59:4056-4060.
10. Takai S., Sasaki Y. et Tsubaki S. ~ *Rhodococcus equi* infection in foals -Current concepts and implication for future research- *J. Equine Sci.*, 1995, 6: 105-119.
11. Takai S., akeda K., Nakano Y., Karasawa T., Furugoori J., Sasaki Y., Tsubaki S., Higuchi T., Ansai T., Wada R. et Kamada M. ~ Emergence of rifampicin-resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35:1904-1908
12. Takai S. ~ Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Vet. Microbiol.*, 1997, 56:167-176.
13. Yager J.A. ~ The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Vet. Microbiol.*, 1987, 14:225-232.

