

6

Séance RIPPA

Malditypage et bactéries : intérêts pratiques pour une meilleure élaboration des autovaccins

INTERVENANT

Dr Frédéric Bourgeon - Bio Chêne Vert - FINALAB

Les infections bactériennes affectent la filière avicole à tous les stades de production, représentent d'importantes causes de pertes économiques et sont des motifs de saisie fréquents à l'abattoir. Les bactéries particulièrement impliquées sont *Escherichia coli* (toutes espèces concernées), *Ornithobacterium rhinotracheale* (dindes), *Staphylococcus aureus* (toutes espèces concernées), *Enterococcus cecorum* (poulets) ou encore *Riemerella anatipestifer* et *Pasteurella multocida* (canards).

Tandis qu'une antibiothérapie peut être mise en place à titre curatif, une prophylaxie vaccinale s'impose le plus souvent dans les élevages, particulièrement chez les reproducteurs. Des autovaccins peuvent avantageusement compléter ou remplacer un vaccin avec AMM (p. ex., Poulvac *E. coli* pour les colibacilles, Cevac Landavax pour *Pasteurella multocida*). Dans un contexte de surveillance accrue des antibiorésistances bactériennes (plan écoantibio 2 – 2017-2021), le recours aux autovaccins peut également participer à limiter l'utilisation des antibiotiques.

Plus de cent millions de doses d'autovaccins sont produites annuellement, principalement à destination des filières avicoles (69%), piscicoles (30%) et porcines (1%) (Anses, 2013) démontrant l'importance de cet outil dans la lutte contre les maladies bactériennes. L'efficacité de la stratégie autovaccinale est peu documentée dans la littérature scientifique et peut être contradictoire

entre par exemple une efficacité avérée sur des poules pondeuses (Landman et al., 2017) ou non significative sur des reproducteurs de la filière chair (Li et al., 2017). L'homologie entre la souche d'épreuve et la souche autovaccinale semble être primordiale ce qui implique la nécessité d'une caractérisation fine des souches d'intérêt. Plusieurs autres facteurs sont déterminants dans la réalisation d'un autovaccin efficace (Ghunnaim et al., 2014) tels que le type d'adjuvant, la méthode d'inactivation de la souche, le mode et la fréquence d'administration et l'âge de l'animal au moment de la vaccination. Il est à noter que l'utilisation de cette stratégie chez des animaux de rente, sur lesquels des données de production très précises sont disponibles, permettent d'évaluer favorablement l'efficacité économique des autovaccins (réduction des lésions à l'abattoir, de l'expression clinique de la maladie, de la mortalité, des traitements antibiotiques).

La caractérisation des souches au laboratoire repose principalement sur le sérotypage. Le sérotypage permet de caractériser les souches sur la base de leurs antigènes de surface (p. ex., déterminants antigéniques somatiques (O), flagellaires (H) et capsulaires (K) pour *Escherichia coli*, déterminants antigéniques somatiques (H, Heddleston ou N, Namioka) pour *Pasteurella multocida*). Dans le cas d'*Escherichia coli*, environ la moitié des souches pathogènes pour la volaille (APEC, Avian Pathogenic *E. coli*) appartiennent aux sérotypes O1, O2, O5, O8, O18 et

O78 (Schouler et al., 2012). Les sérotypes classiquement identifiés par agglutination au laboratoire (Finalab) sont O1, O2 et O78. Il existe donc un certain nombre de souches non sérotypables que l'on peut depuis récemment analyser par gen-O-typage moléculaire (Labofarm-Finalab) afin d'accéder à la détermination d'une vingtaine de sérovars complémentaires (p. ex. O5, O8, O18, O45, O88). Le sérotype à lui seul ne reflète pas obligatoirement le caractère virulent de la souche. Des analyses complémentaires sont le plus souvent réalisées afin de caractériser plus avant les souches supposés pathogènes telles que la réalisation d'antibiogrammes (Finalab) permettant de mettre en évidence des phénotypes de résistance aux antibiotiques (p. ex., présence d'une bêta-lactamase à spectre étendu) et la recherche de gènes exprimant des facteurs de virulence (11 facteurs de virulence, Labofarm-Finalab, Robineau et al., 2010).

Il apparaît à nouveau que toutes les souches pathogènes ne peuvent être caractérisées par ces différentes méthodes. Aussi, le laboratoire Bio Chêne Vert (Finalab) a développé une nouvelle méthode de typage moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight).

La spectrométrie de masse va intervenir dans l'identification de la souche présumée pathogène, responsable de la pathologie (analyse étiologique préalable indispensable) et dans sa caractérisation (typage), afin de participer à la sélection de la (des) souche(s) autovaccinale(s). Brièvement, la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet l'identification des micro-organismes à l'aide d'empreintes moléculaires uniques (Wolk et al., 2018) (Figure 1). Le spectromètre de masse effectue des mesures sur les protéines abondantes qui se trouvent dans chaque micro-organisme (protéines ribosomales, protéines de liaison à l'ADN). Les profils caractéristiques de ces protéines sont utilisés pour identifier de manière fiable et précise un micro-organisme, en comparant son profil à une banque de données contenant des milliers de profils caractéristiques d'espèces bactériennes, fongiques ou encore de levures. Cette comparaison permet de déterminer l'identité du micro-organisme d'intérêt jusqu'au niveau de l'espèce. Le système est précis, reproductible et s'applique à un large éventail de micro-organismes. Il peut donc remplacer avantageusement l'identification traditionnelle notamment pour les germes pathogènes opportunistes émergents qui peuvent se révéler difficiles à identifier sur la

seule base de tests biochimiques. Par ailleurs, ce système d'identification est plus rapide que les méthodes conventionnelles.

C'est à la fin des années 1990 que se développent les technologies de spectrométrie de masse appliquées à la biologie moléculaire. En 1996, une première étude relate la possibilité d'identifier des micro-organismes intacts par spectrométrie de masse MALDI (Holland et al., 1996). Les premiers systèmes sont utilisés à des fins de recherche à partir de 2004 et une solution totalement intégrée est disponible à partir de 2008 pour les laboratoires publics et privés (système MALDI-Biotyper, Bruker Daltonics, Allemagne). Les développements technologiques se sont initialement focalisés vers une amélioration de la couverture d'identification à de nombreux micro-organismes (plus de 2300 espèces à ce jour). La spectrométrie de masse a également été évaluée pour l'identification directe de micro-organismes dans des fluides biologiques complexes tels que l'urine et les hémocultures, réduisant significativement les délais d'identification (Theparee et al., 2018 ; Faron et al., 2017). Depuis ces dernières années, les développements s'orientent vers des applications plus spécifiques telles que le typage, l'épidémiologie et la détection de mécanismes de résistance aux antibiotiques (Sanguinetti et al., 2016).

Le typage des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF (MALDI-typage) représente une alternative aux solutions de typage moléculaire, plus complexes à mettre en œuvre, telles que l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) et l'analyse de séquence multi-locus (MLST). La discrimination des souches par MALDI-typage présente une concordance avec les typages PFGE et MLST (Giacometti et al., 2018).

La caractérisation de bactéries pathogènes par MALDI-typage est encourageante et des résultats intéressants ont pu être obtenus, par exemple pour différencier les souches *Escherichia coli* du phylogroupe B2 regroupant les souches extra-intestinales les plus virulentes (Clark et al., 2013, Sauguet et al., 2014), les isolats pathogènes MLST-CC22/42 de l'espèce *Campylobacter jejuni* (Zautner et al., 2013) ou encore les 5 complexes clonaux majeurs de *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (MRSA) (Wolters, 2011, Josten, 2013, Ostergaard, 2015). La caractérisation des bactéries par spectrométrie de masse MALDI-TOF peut se focaliser également sur la détection précoce de mécanismes d'anti-

biorésistance, telles que l'expression d'enzymes de type β -lactamase par détection de l'hydrolyse de l'antibiotique (Vrioni et al., 2018). Un profil de susceptibilité aux antibiotiques pourrait être obtenu le jour de l'identification.

Le MALDI-typage est utilisé depuis 5 ans au laboratoire Bio Chêne Vert (Finalab) sur de nombreuses bactéries d'intérêt en biologie vétérinaire (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Enterococcus cecorum*, *Escherichia coli*, *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus suis*, *Vibrio harveyi*, etc.) (Photo 1). Les comparaisons des empreintes moléculaires normalisées permettent de déterminer des homologues entre les souches et de mettre en évidence des groupes de proximité moléculaire, les MALDI-types (Figure 2). Il est intéressant de noter que certains sérovars peuvent être distribués sur plusieurs MALDI-types, mettant en évidence l'hétérogénéité des souches. Dans le cadre du choix d'une ou plusieurs souche(s) autovaccinale(s), il est pos-

sible de compiler les informations de sérotype, gen-O-type (si nécessaire), antibiotype, virulotype et MALDI-type afin de se placer dans une sélection de souches autovaccinales couvrant la diversité des souches de l'élevage (approche homologue).

La nécessité de typer les micro-organismes va augmenter dans un futur proche car nous assistons à l'émergence de souches hypervirulentes et/ou multirésistantes qui représentent une problématique majeure de santé publique (humaine comme vétérinaire). Parce que les méthodes conventionnelles de typage restent difficiles de mise en œuvre et coûteuse, le typage est actuellement réservé à une faible cohorte d'isolats. Ces situations cliniques nécessitent un outil de typage rapide pour confirmer la propagation d'un germe ciblé. Le MALDI-typage, s'il n'est pas la solution ultime, permet de discriminer rapidement les sous-groupes majeurs de multiples micro-organismes d'intérêt.

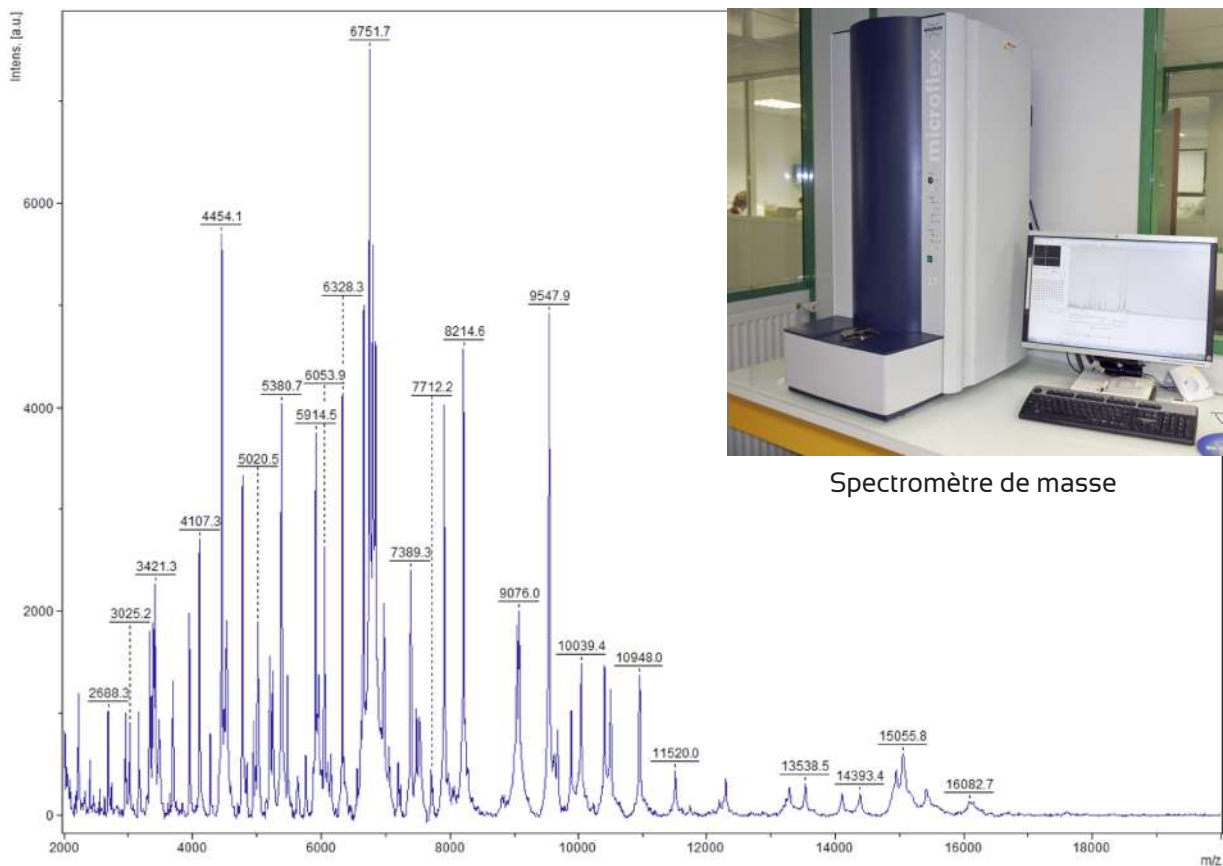


Figure 1 : Spectre de Masse. Source : Laboratoire Bio Chêne Vert

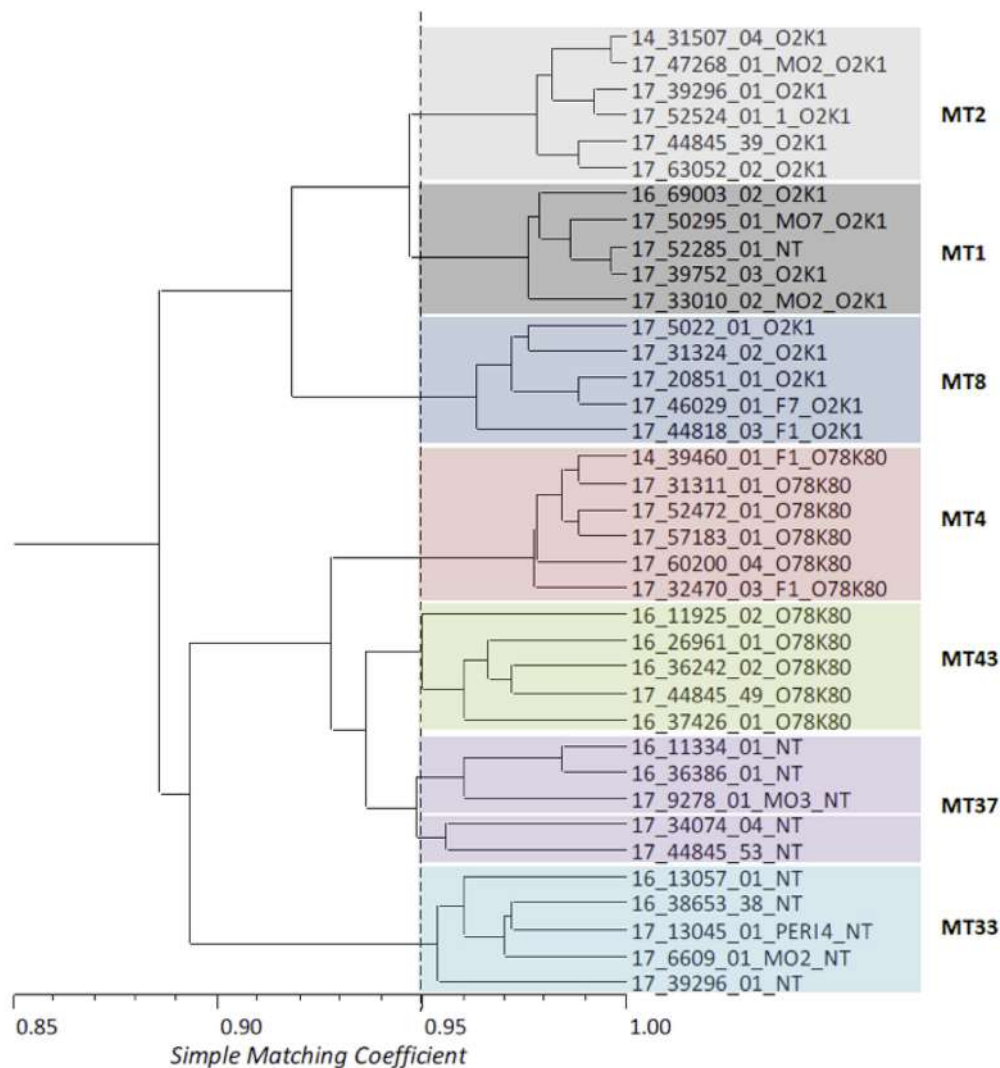


Figure 2 : Dendrogramme de classification (souches *Escherichia coli*, n=37)

Bibliographie

Anses, 2013, Autovaccins à usage vétérinaire, Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective.

Clark CG, Kruczkiewicz P, Guan C, McCorrister SJ, Chong P, Wylie J, van Caesele P, Tabor HA, Snarr P, Gilmour MW, Taboada EN, Westmacott GR. Evaluation of MALDI-TOF mass spectroscopy methods for determination of *Escherichia coli* pathotypes. J Microbiol Methods. 2013 Sep;94(3):180-91.

Faron ML, Buchan BW, Ledebor NA. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Use with Positive Blood Cultures: Methodology, Performance, and Optimization. J Clin Microbiol. 2017 Dec;55(12):3328-3338.

Ghunaim H, Abu-Madi MA, Kariyawasam S. Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. Vet Microbiol. 2014 Aug 6;172(1-2):13-22.

Giacometti F, Piva S, Vranckx K, De Bruyne K, Drigo I, Lucchi A, Manfreda G, Serraino A. Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. Int J Food Microbiol. 2018 Jul 20;277:50-57.

Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO Jr. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1996;10(10):1227-32.

Landman WJM, van Eck JHH. The efficacy of inactivated *Escherichia coli* autogenous vaccines against the *E. coli* peritonitis syndrome in layers. *Avian Pathol*. 2017 Dec;46(6):658-665.

Josten M, Reif M, Szekat C, Al-Sabti N, Roemer T, Sparbier K, Kostrzewa M, Rohde H, Sahl HG, Bierbaum G. Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol*. 2013 Jun;51(6):1809-17.

Li L, Thøfner I, Christensen JP, Ronco T, Pedersen K, Olsen RH. Evaluation of the efficacy of an auto-genous *Escherichia coli* vaccine in broiler breeders. *Avian Pathol*. 2017 Jun;46(3):300-308.

Østergaard C, Hansen SG, Møller JK. Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol*. 2015 Dec;305(8):838-47.

Robineau B, Moalic P-Y. Une maladie d'actualité en production aviaire: la colibacillose. *Bull. Acad. Vét. France*. 2010, 163(3):207-2012

Sanguinetti M, Posteraro B. Mass spectrometry applications in microbiology beyond microbe identification: progress and potential. *Expert Rev Proteomics*. 2016 Sep 14:1-13.

Sauget M, Nicolas-Chanoine MH, Cabrolhier N, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int J Med Microbiol*. 2014 Nov;304(8):977-83.

Schouler C, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F, Oswald E, Mainil J, Blanco J, Moulin-Schouleur M. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1673-8.

Theparee T, Das S, Thomson RB Jr. Total Laboratory Automation and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Improve Turnaround Times in the Clinical Microbiology Laboratory: a Retrospective Analysis. *J Clin Microbiol*. 2017 Dec 26;56(1).

Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med*. 2018 Jun;6(12):240.

Wolk DM, Clark AE. Matrix-Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry. *Clin Lab Med*. 2018 Sep;38(3):471-486.

Wolters M, Rohde H, Maier T, Belmar-Campos C, Franke G, Scherpe S, Aepfelbacher M, Christner M. MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*. 2011 Jan;301(1):64-8.

Zautner AE, Masanta WO, Tareen AM, Weig M, Lugert R, Groß U, Bader O. Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2013 Nov 7;13:247.

Zautner AE, Masanta WO, Weig M, Groß U, Bader O. Mass Spectrometry-based PhyloProteomics (MSPP): A novel microbial typing Method. *Sci Rep*. 2015 Aug 25;5:13431.