

# JOURNÉES SCIENCES & INNOVATIONS ÉQUINES

20 ET 21 MAI 2021



www.ifce.fr



INRAE

RESPE

idèle

hippola

VEF

IFCE

INSEP

SFET

LeTROT

FCF

FRANCE GALOP

FRANCE GALOP

FRANCE GALOP

FRANCE GALOP



Léon Albertine

Titulaire d'un PhD-HDR et cheffe de l'unité Prévention et Stratégies thérapeutiques dans le Pôle recherche de LABÉO, je suis en charge de la R&D et de l'innovation pour comprendre les maladies infectieuses équinnes. Je mène notamment des projets de recherche sur les infections respiratoires et l'antibiorésistance grâce à mes compétences en bactériologie moléculaire.

[albertine.leon@laboratoire-labeo.fr](mailto:albertine.leon@laboratoire-labeo.fr)

## Partenaire(s)



## Financier(s)



## Fonds Éperon



## Enjeux de la Gourme en France : dépistage et prévention

Albertine Léon<sup>1,2</sup>, Sophie Castagnet<sup>1</sup>, Sophie Pradier<sup>3</sup>, Romain Paillot<sup>4</sup>, Jean-Christophe Giard<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> LABÉO Frank Duncombe

<sup>2</sup> Normandie Univ, UNICAEN, U2RM

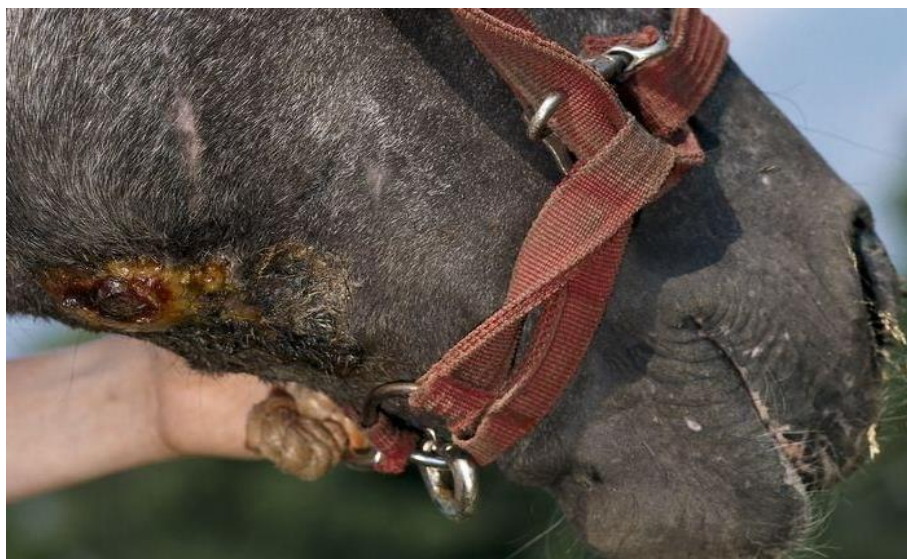
<sup>3</sup> Vétérinaire indépendant

<sup>4</sup> Writtle University College, Chelmsford, UK

## Type de présentation : oral – Projet de recherche

### Ce qu'il faut retenir

Souvent considérée comme banale et associée à un tableau clinique respiratoire, les professionnels de la filière équine oublient parfois que la Gourme, hautement contagieuse, peut provoquer des abcès purulents et que, dans les formes les plus graves, elle peut être mortelle. La bactérie responsable de cette infection est *Streptococcus equi* subsp *equi* (*S. equi*), elle se transmet par contact direct ou indirect. LABÉO a mené, entre 2016 et 2019, une étude de terrain afin de déterminer, pour cette infection, le test diagnostique le plus performant (bactériologie, sérologie et/ou amplification génique par PCR) à associer au bon prélèvement (écouvillon nasopharyngé ou lavage des poches gutturales). Les résultats montrent que le lavage est le meilleur prélèvement pour isoler des souches de chevaux malades (M) ou porteurs asymptomatiques (PA), et que la PCR est le test diagnostique à réaliser en première intention. La caractérisation plus fine des souches isolées n'a pas mis en évidence de nouveau variant circulant en France. Toutefois, une différence de profil entre souches isolées de M et PA dans leur capacité à produire du biofilm a été observée tendant à démontrer que la formation de chondroïdes dans les poches gutturales de PA pourrait ne pas être la seule forme de persistance de *S. equi*.



© intervet Un cheval gourmeux

## 1 Contexte et objectifs

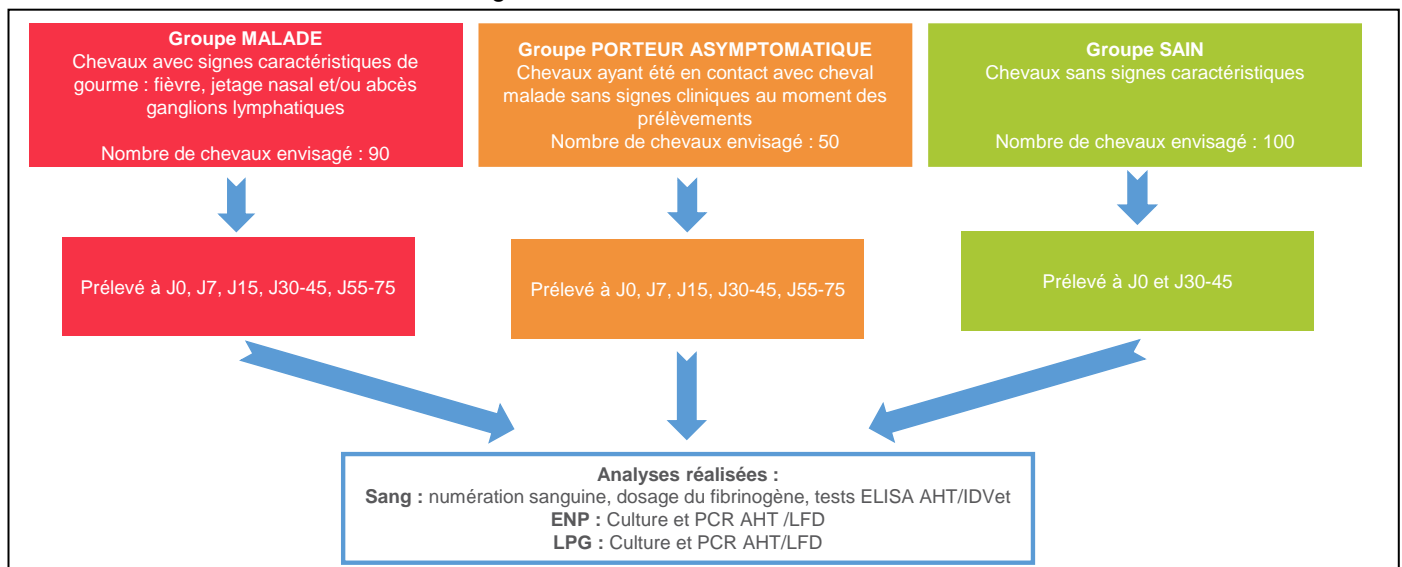
La densification du nombre de chevaux dans les élevages et l'internationalisation des compétitions et du commerce des équidés ont contribué au brassage d'agents pathogènes, tels que *Streptococcus equi* sbsp *equi* (*S. equi*), bactérie responsable de la gourme. L'apparition de cette maladie, hautement contagieuse, à très grande morbidité (40 à 80%) et faible mortalité (3%), entraîne des pertes économiques non négligeables à travers le monde. La gourme se caractérise par de l'abattement, de l'inappétence et un état fébrile ( $T^{\circ}C > 39$ ), une hypertrophie des nœuds lymphatiques de la tête ou du poitrail, évoluant vers l'abcédation, suivi par un jetage nasal muco-purulent. Généralement, l'évolution de ces abcès est favorable ; ils s'ouvrent et le pus est drainé vers l'extérieur. Même si la majorité des chevaux guérit spontanément sans séquelle en 2 à 4 semaines, certains développent des formes plus graves (purpura hémorragique) engageant parfois le pronostic vital.

En France, la prise en charge et la détection de cette maladie sont souvent négligées. Ses impacts sanitaire et économique sont largement sous-estimés. Les deux objectifs de l'étude présentée ici sont donc : 1) Déterminer la meilleure combinaison entre les différents tests diagnostiques disponibles (ELISA AHT vs IDVet, PCR AHT vs LABÉO, culture) et les prélèvements (écouvillon naso-pharyngé [ENP], lavage de poches gutturales [LPG], sang) afin d'identifier le statut (malade, sain, porteur asymptomatique) d'un cheval vis-à-vis de la gourme à travers une étude terrain ; 2) Caractériser les souches circulantes sur notre territoire et comparer les données ainsi obtenues à celles mondiales déjà disponibles.

## 2 Méthode

LABÉO a mené entre 2016 et 2019 une étude de terrain comprenant des animaux sains (groupe S), porteurs asymptomatiques (groupe PAS) et malades (groupe M) afin de déterminer le test diagnostique le plus performant (Bactériologie, ELISA AHT<sup>1</sup> vs IDVet, et/ou PCR AHT<sup>2</sup> vs LFD<sup>3,4</sup>) associé à la nature du prélèvement [Ecouvillon Naso-Pharyngé (ENP) versus Lavage de Poche Gutturale (LPG)]. L'étude a été réalisée en France, avec la collaboration de vétérinaires volontaires parmi les vétérinaires sentinelles du RESPE (Réseau d'Epidémiologie et de Surveillance des Pathologies Equines) et l'implication de centres d'élevage et de recherche (INRA Centre Val de Loire, Jumenterie du Pin, station expérimentale de Chamberet, Pôle hippique de St Lo et Garde Républicaine) selon le protocole de la figure 1.

Figure 1 : Protocole de l'étude terrain



J : Jour, ENP : Ecouvillon Naso-Pharyngé, LPG : Lavage de Poche Gutturale, PCR : Polymerase Chain Reaction, AHT : Animal Health Trust, LFD : LABÉO Frank Duncombe.

Afin de comprendre les particularités des souches de *S. equi* isolées de l'étude de terrain, elles ont été analysées au niveau phénotypique et moléculaire respectivement par détermination des profils de résistance aux antibiotiques et par le séquençage complet des génomes. De plus, leur capacité à former du biofilm a également été étudiée en condition statique et dynamique par des technologies innovantes (mesure d'impédance et microfluidique) disponibles au laboratoire.

### 3 Résultats

De Novembre 2016 à Mars 2019, 25 vétérinaires ont adressé les prélèvements de 203 chevaux (soit 84,6% de l'effectif initial attendu). Selon le contexte épidémiologique de l'écurie par rapport à la gourme et le premier examen clinique du cheval suivi, 38 animaux sont classés dans le groupe M, 82 dans le groupe PAS et 83 dans le groupe S.

#### 3.1 Comparaison des tests diagnostiques

##### 3.1.1 Marqueurs de l'inflammation

- La distribution des cellules neutrophiles du groupe M est significativement plus élevée que celle des groupes PAS ou S ( $p < 0.0001$ ).
- Pour le dosage du fibrinogène, la distribution du groupe M est aussi significativement plus élevée que celle du groupe PAS ( $p < 0.0001$ ) et du groupe S ( $p < 0.05$ ). Sa distribution en fonction des jours de prélèvement (J0 à J55-75) est aussi significativement plus élevée à J0 et J7 en comparaison des autres jours de prélèvements (J15, J30-45 ou J55-75) avec  $p < 0.05$ .

##### 3.1.2 Tests ELISA

- Avec le test ELISA AHT, 28% (129/459) des sérums analysés sont positifs, 62% (285/459) sont négatifs et 10% (45/459) sont douteux.
- Avec le test ELISA commercialisé par la société IDVet, 19% (88/459) des sérums analysés sont positifs, 32% (147/459) sont négatifs et 49% (224/459) sont douteux. Ce nombre trop important d'échantillons douteux montrent que le seuil de positivité de test doit être revu avant d'être utilisé.

##### 3.1.3 Culture bactérienne

- A partir des ENP, 15 souches de *S. equi* ont pu être isolées uniquement du groupe M soit 3% des échantillons analysés.
- A partir des LPG, 40 souches de *S. equi* ont pu être isolées dont 29 du groupe M et 11 du groupe PAS, soit 8,5% des échantillons testés.

Ces résultats montrent que le LPG est le meilleur prélèvement pour isoler des souches de chevaux malades et porteurs asymptomatiques. Au final, les 55 souches de *S. equi* isolées dans cette étude proviennent de 23 chevaux et de 13 foyers différents.

##### 3.1.4 PCR

- A partir des ENP, la PCR développée et validée à LABÉO permet de détecter 6,5% (30/461) d'échantillons positifs contre seulement 4% (18/461) avec la PCR AHT.
- A partir des LPG, la PCR LABÉO permet de détecter 22% (102/462) d'échantillons positifs contre seulement 18,5% (186/462) avec la PCR AHT.

Lorsque ces résultats de biologie moléculaire sont comparés à ceux de la bactériologie, les deux PCR comparées ici et sans distinction d'échantillon (ENP et LPG) sont plus sensibles que la culture.

#### 3.2 Caractérisation des souches isolées

L'étude de terrain a permis d'isoler au total 55 souches dont 15 à partir d'ENP et 40 à partir des LPG analysés. Leur caractérisation phénotypique n'a pas montré de phénomène de résistance aux antibiotiques. La caractérisation moléculaire par séquençage complet du génome de 18 de ces souches a été réalisée en collaboration avec le service de microbiologie du CHU de Caen, la plateforme P2M de l'Institut Pasteur et l'expertise d'Andrew Waller (Spécialiste mondial de la gourme). Les analyses de première intention n'ont pas mis en évidence de nouveau clone de *S. equi* par rapport à ceux circulant habituellement en France. Des analyses plus fines sont en cours avec l'Université de Cambridge. Par contre, la comparaison des biofilms produits (en statique et dynamique) montre une adhésion caractéristique de la souche issue d'un porteur asymptomatique qui n'est pas retrouvée chez celle isolée d'un cheval malade. Il s'agira de confirmer cette nouvelle forme de persistance de *S. equi* dans les poches gutturales du cheval sur un plus grand nombre de souches analysées.

### 4 Conclusions et applications pratiques

L'étude terrain présentée ici est la première de cette envergure réalisée en France sur la Gourme. Elle permet d'ores et déjà des applications pratiques.

Le comptage des neutrophiles et le dosage du fibrinogène discriminent statistiquement le groupe malade des deux autres groupes et restent de bons marqueurs pour mettre en évidence une inflammation. Celle-ci peut être provoquée

par *S. equi* mais aussi par d'autres pathogènes ou autres affections (problème dentaire, chute...). Ces résultats seront donc à interpréter en fonction de l'examen clinique global de l'animal.

Les tests sérologiques, en permettant la détection des anticorps produits, donne la possibilité de dire si le cheval testé a été en contact avec la bactérie *S. equi*. C'est alors un bon outil pour tester des élevages entiers. Notre étude montre que le test ELISA développé et validé par l'AHT est plus discriminant que celui proposé par la société IDVet. L'isolement des souches responsables de la gourme est facilité s'il est réalisé à partir du LPG, par rapport à l'ENP, et cela aussi bien pour les animaux malades que les porteurs asymptomatiques. Il permet aussi d'envisager des études plus approfondies d'épidémiologie moléculaire.

La PCR, qu'elle cible un ou plusieurs gènes de *S. equi*, permet de détecter le plus grand nombre de positif aussi bien dans le groupe M que le groupe PAS. La PCR LABÉO est légèrement plus sensible que la PCR AHT.

Ainsi, le LPG est le meilleur échantillon pour détecter les chevaux malades et porteurs asymptomatiques de la gourme. Il nécessite toutefois une légère tranquillisation du cheval et la disponibilité d'un endoscope selon les praticiens.

La meilleure combinaison pour déceler une majorité de chevaux malades et porteurs de la gourme est donc d'associer le LPG à la PCR LABÉO.

Une analyse approfondie des résultats obtenus au niveau de l'animal et en fonction des jours de prélèvement est en cours et devra affiner ces premières conclusions.

Aucun phénomène de résistance aux antibiotiques n'a été mis en évidence sur les souches isolées. Il s'agira de continuer à suivre les recommandations internationales quant à l'usage des antibiotiques vis-à-vis de la gourme<sup>5</sup>. Celles-ci préconisent l'utilisation de pénicilline seulement dans le cas où *S. equi* persiste dans les poches gutturales. Si cette persistance est sous forme de chondroïdes, il s'agira de retirer ces amas de pus guidé par un endoscope et d'appliquer un mélange associant pénicilline et gélatine.

La production de biofilm semble être une nouvelle forme de persistance de *S. equi* dans les poches gutturales. Si cette voie est confirmée, il s'agira alors de préconiser un lavage associant liquide physiologique habituel et pénicilline.

Même si les premières analyses des résultats obtenus du séquençage complet des souches isolées dans cette étude ne montrent pas de nouveau clone circulant en France, une analyse plus fine devra apporter des données moléculaires inédites concernant les gènes de virulence, résistance, persistance, ceux impliqués dans stratégie d'évitement du système immunitaire ou la formation de biofilms. Cela pour tenter de comprendre pourquoi certains chevaux deviennent des porteurs asymptomatiques et d'autres pas.

Il existe à l'échelle internationale une réelle volonté de faire reconnaître la gourme comme maladie à déclaration obligatoire par l'organisation internationale des épizooties. Si tel est le cas, les résultats de notre étude permettront de proposer de nouveaux protocoles afin d'aider la gestion sanitaire des foyers et contribueront ainsi au changements d'attitude des professionnels vis-à-vis de cette maladie qui est souvent considérée comme inéluctable donc sous-estimée en France.

## 5 Pour en savoir plus

Robinson, C., Steward, K.F., Potts, N., Barker, C., Hammond, T.A., Pierce, K., Gunnarsson, E., Svansson, V., Slater, J., Newton, J.R., Waller, A.S. Combining two serological assays optimises sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure. *Vet J.* 2013, 197, 188-191. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.01.033.

Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K.F., Robinson, C., Newton, J.R., Waller, A.S. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *Vet J.* 2013, 195, 300-304. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.07.007.

Alber, J., El-Sayed, A., Lämmler, C., Hassan, A.A., Weiss, R., Zschöck, M. Multiplex polymerase chain reaction for identification and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004, 51, 455-458.

Timoney, J.F., Artiushin, S.C. Detection of *Streptococcus equi* in equine nasal swabs and washes by DNA amplification. *Vet. Rec.* 1997, 141, 446-447.

Boyle, A.G., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., Waller, A.S., Buchanan, B.R. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med.* 2018, 32, 633-647. DOI: 10.1111/jvim.15043.

Léon, A., Pradier, S., Waller, A. Le point sur la gourme du cheval. *Prat. Vét. Equine.* 2016, 190, 15-20.

Fiche technique Gourme du RESPE : <https://respe.net/maladie-equine/respiratoire/gourme/>

D'Ablon X. La vaccination contre la Gourme. *Bulletin des GTV.* 2012, 67, 53-57.

D'Ablon X. La gestion sanitaire d'un foyer de gourme. *Prat. Vét. Equine.* 2013, 178, 29-33.