



26 février 2003

LES HARAS NATIONAUX

Immunisation de juments gravides contre des antigènes de *Rhodococcus equi* : évaluation de la réponse immunitaire et du transfert passif dans différents élevages normands

Par : Julien Cauchard^a, Jean-Jacques Ballet^b, Corinne Sevin^a, Saïd Taouji^a

^a AFSSA, laboratoire d'étude et de recherches
en pathologie équine, IPC

14430 Goustranville, Dozulé, France

^b Laboratoire d'Immunologie et Immunopathologie
UPRES-EA 2128, CHU, 14033 Caen, France

Résumé

La bactérie Gram positive *Rhodococcus equi* est un agent pathogène important des poulains dont l'infection en Normandie, représente 10% des causes de mortalité chez les poulains âgés de 24 heures à six mois. Le traitement est long et coûteux et les résultats sont aléatoires en raison du caractère insidieux de la maladie. De plus, devant l'apparition de souches résistantes, la prévention par l'élaboration d'un vaccin efficace est une priorité dans la lutte contre la pathologie. Le but de cette étude est d'évaluer la réponse immune humorale de juments gravides immunisées par un vaccin mis au point à l'AFSSA-Lerpe, ainsi que l'intérêt de l'immunité passive. Un niveau significativement plus élevé d'anticorps ayant de plus grandes capacités opsonisantes chez les juments vaccinées que chez les témoins a été mis en évidence. Les poulains de juments vaccinées ont également davantage d'anticorps opsonisants que les poulains des autres groupes.

Mots-clés : Immunisation, *Rhodococcus equi*, transfert passif, opsonisation, jument.

Summary

Rhodococcus equi causes a persistent bacterial pneumonia in foals. It may result in considerable losses through costs of diagnosis and treatment, and in some cases, through death. During this studies, the development of immunity to an antigen preparation (AFSSA-Lerpe), was examined in mares and their foals after vaccination. Immunization markedly enhanced antibody titer and opsonic ability in vaccinated mares more than in controlled mares. Passive immunization of foals also resulted in enhanced opsonic ability and antibody titer in the vaccinated group, compared to the controlled group.

Key Words: Immunisation, *Rhodococcus equi*, passive transfer, opsonisation, mare.

INTRODUCTION

La bactérie Gram positive *Rhodococcus equi* est un agent pathogène majeur des poulains âgés de 1 à 6 mois. Cette bactérie provoque des lésions pyogranulomateuses à l'origine de bronchopneumonies, lymphadénites et entérites. La bactérie est aussi capable d'infecter de nombreuses autres espèces dont l'humain avec la recrudescence de cas d'infection chez les personnes immunodéprimées, en particulier chez celles atteintes du SIDA. La maladie évolue de façon sporadique, mais elle peut sévir de manière endémique dans certains haras.

C'est une bactérie ubiquiste présente dans le sol et dans les fèces de nombreuses espèces animales. La densité des équidés joue un rôle important dans la contamination du milieu extérieur.

Un diagnostic précoce de l'infection est difficile à établir en raison de l'apparition tardive des signes cliniques, alors que les lésions pulmonaires sont avancées.

La bactérie est intracellulaire facultative. Son mode de fonctionnement est très proche de celui des mycobactéries, mais ne provoque pas le même type de lésions. La cellule cible est le macrophage au sein duquel elle se multiplie pour tuer celui-ci et infecter les macrophages voisins.

La souche virulente responsable de la pathologie contient un plasmide de virulence qui code notamment des protéines membranaires et secrétées qui facilitent sa survie dans le macrophage.

Traitement médical

Le traitement basé sur l'association d'érythromycine et de rifampicine durant trois semaines au moins est coûteux et les résultats sont aléatoires en raison du caractère insidieux de la maladie dont les premiers signes cliniques apparaissent alors que les lésions sont déjà étendues.

Prophylaxie

Prophylaxie sanitaire

Un effort doit être porté sur la prophylaxie sanitaire qui permet de diminuer l'exposition aux agents pathogènes (isolement, hygiène, densité) et d'éliminer les conditions de stress pouvant être à l'origine de l'affaiblissement du poulain.

Prophylaxie médicale

Le système immunitaire du poulain à la naissance est immature. On peut renforcer celui-ci par deux procédés, l'immunisation active ou passive.

L'immunisation passive consiste à transférer dès les premières heures de la vie des immunoglobulines par voie orale, via le colostrum ou par injection IV.

Pour l'immunisation active, différents vaccins ont été testés, utilisant des cellules entières ou des antigènes semi-purifiés de *R. equi*, des vaccins mixtes *R. equi*/EHV-2 (Varga *et al.*, 1997), mais aucun n'est développé actuellement.

En raison de la demi-vie variable des anticorps maternels transmis par le colostrum et leur effet immunosuppresseur, il est difficile de déterminer la période exacte pour vacciner un poulain.

Diagnostic

Cliniquement, les premiers symptômes (fièvre, abattement, toux, jetage) ne se manifestent que tardivement alors que les lésions pulmonaires sont étendues.

Deux études récentes (Giguère, Martens, *R. equi* workshop 2002) utilisant cinq tests ELISA différents ont montré que la sérologie est un outil diagnostique à utiliser avec beaucoup de précautions. Elle doit être un

complément d'information pour l'observation clinique. On estime à 35% la proportion de faux positifs par ELISA dans les zones endémiques où la séroprévalence est naturellement élevée.

L'analyse bactériologique d'un lavage broncho-alvéolaire est une manipulation délicate sur un poulain malade mais elle permet un diagnostic fiable et définitif.

Enjeux économiques

Le taux de morbidité de la rhodococcose varie de 5 à 17% et le taux de mortalité peut atteindre 80%. En Normandie, l'infection représente 10% des causes de mortalité chez les poulains âgés de 24 heures à 6 mois. Au-delà de 6 mois, les infections sont rares.

La bactérie est un véritable fléau économique du fait de la mortalité qu'elle provoque, mais aussi en raison des conséquences pour la carrière du cheval et du coût élevé du traitement. Le caractère insidieux de la maladie et l'apparition de souches résistantes font de la prévention par l'élaboration d'un vaccin efficace, une priorité dans la lutte contre la pathologie.

Problématique

Pour lutter contre cette bactérie intracellulaire, l'organisme mobilise l'immunité humorale et cellulaire. Le but de cette étude est d'évaluer la réponse immune humorale de juments gravides immunisées par un vaccin mis au point à l'AFSSA-Lerpe, ainsi que l'intérêt de l'immunité passive.

Il s'agit de déterminer si le transfert de colostrum d'une jument immunisée à son poulain permet de diminuer la prévalence et l'incidence de la maladie. De plus, cette étude menée au sein de trois élevages, permet de tenir compte des différentes pratiques d'élevage.

MATERIEL ET METHODES

Choix des élevages

Trois haras endémiques, deux situés dans le Calvados et un situé dans l'Orne, régulièrement confrontés à la pathologie ont été inclus dans l'étude.

Les races étaient réparties de la façon suivante :

- haras 1 : trotteur
- haras 2 : trotteur, pur-sang et poney
- haras 3 : pur-sang

Les juments ont été appariées par terme, témoin/vacciné et témoin/autovacciné.

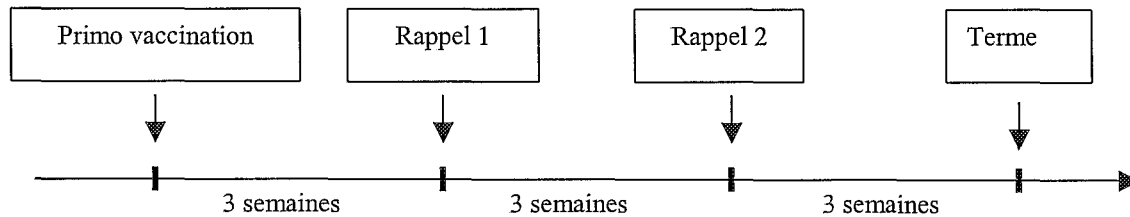
Dans chaque haras sélectionné, la totalité des juments séjournait dans l'exploitation depuis au moins six mois avant le terme et y demeuraient au minimum trois mois après le poulinage.

Répartition des effectifs dans les lots

Injection	Autovaccin	Vaccin	Témoin
Haras 1	8	9	0
Haras 2	0	8	8
Haras 3	0	7	8
Effectif total (48)	8	24	16

Rythme de vaccination des juments

La stimulation du système immunitaire des juments s'est faite par trois injections successives à trois semaines d'intervalle, soit neuf semaines avant la date théorique du poulinage.



Prélèvement des échantillons

La fenêtre des termes s'étendait de janvier à juin 2002.

La sérologie des juments a été suivie de façon hebdomadaire jusqu'au terme. Le colostrum a été prélevé à la naissance.

Les poulains ont été prélevés pour une sérologie à la naissance avant la prise de colostrum et 24 heures après la prise de colostrum. Ils ont été suivis sérologiquement et cliniquement jusqu'à l'âge de 2 mois, et cliniquement jusqu'à 6 mois.

En cas de suspicion clinique de rhodococcose, un lavage broncho-alvéolaire et une sérologie étaient pratiqués pour confirmer le diagnostic.

Formulation des vaccins

Le choix de l'adjuvant a été déterminé par une étude préalable de stimulation du système immunitaire et de tolérance. Trois adjuvants différents contenant la préparation antigénique ont été testés par notre service sur 12 juments (collaboration de la Jumenterie du Pin). L'adjuvant choisi ne provoquait pas de réaction locale.

L'autovaccin est composé de souches locales inactivées.

Le vaccin est composé d'extraits antigéniques (1ml d'une solution à 1mg/ml) d'une souche virulente de *R. equi* (85Fp⁺) associés à un adjuvant à base de nanoparticules (Montanide IMS 3012, laboratoires Seppic). Les témoins ont reçu l'adjuvant seul avec la même solution contenant les antigènes.

Test ELISA

Le test a été réalisé selon la méthode décrite par Taouji *et al* (2002)

Test d'opsonisation

Nous avons évalué les capacités opsonisantes des sérums en comptant le nombre de *Rhodococcus equi* phagocytées par les phagocytes d'une jument témoin.

Après prélèvement du sang du témoin, les globules rouges ont été lysés et les cellules phagocytaires récupérées dans de la solution de Hanks. 400µl de cette solution ont été incubés pendant 20 mn avec 50µl d'une culture bactérienne en phase exponentielle et 50µl de sérum.

Après fixation, les cellules étaient colorées par la technique de Giemsa, et par observation au microscope à immersion, le nombre de bactéries phagocytées sur 200 cellules a été déterminé.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de Student (test t) et l'analyse de variance (ANOVA). Les différences sont calculées par rapport au témoin.

RESULTATS

Réponse des juments à la vaccination

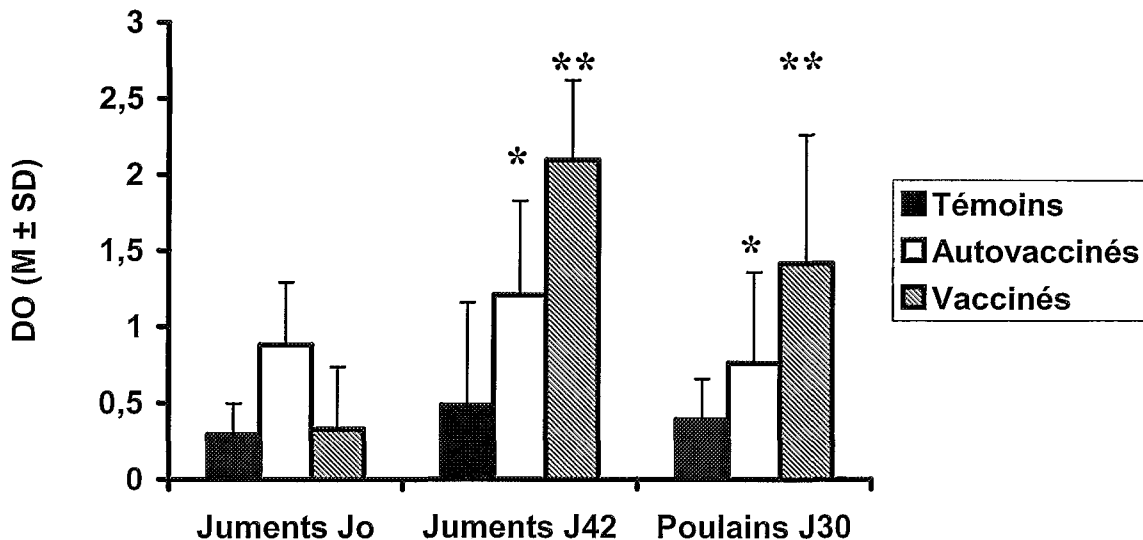
L'autovaccin étant déjà pratiqué les années précédentes dans l'élevage, les sérums des juments du lot autovacciné présentent avant la première injection un niveau d'anticorps plus élevé mais des capacités opsonisantes égales, comme le montrent les graphiques 1 et 2. Après l'injection du vaccin, des effets secondaires locaux ont été observés chez trois juments vaccinées, soit 12,5% des cas (inflammation au niveau du site de l'injection). Ces réactions locales ont disparues dans les 24 à 48 heures suivantes.

Quarante deux jours après la primovaccination, on observe un niveau d'anticorps significativement plus élevé chez les juments vaccinées par rapport aux juments des autres lots. On retrouve de façon hautement significative cette différence dans l'évaluation des capacités opsonisantes des sérums.

Entre les lots témoins et autovaccinés, les sérums des juments autovaccinées présentent un niveau d'anticorps plus élevé et des capacités opsonisantes égales.

Graphique 1

Titre en anticorps des juments mesuré par ELISA (avant et 42 jours après vaccination) et des poulains (30 jours après la naissance) pour les différents lots (témoins, autovaccinés et vaccinés).

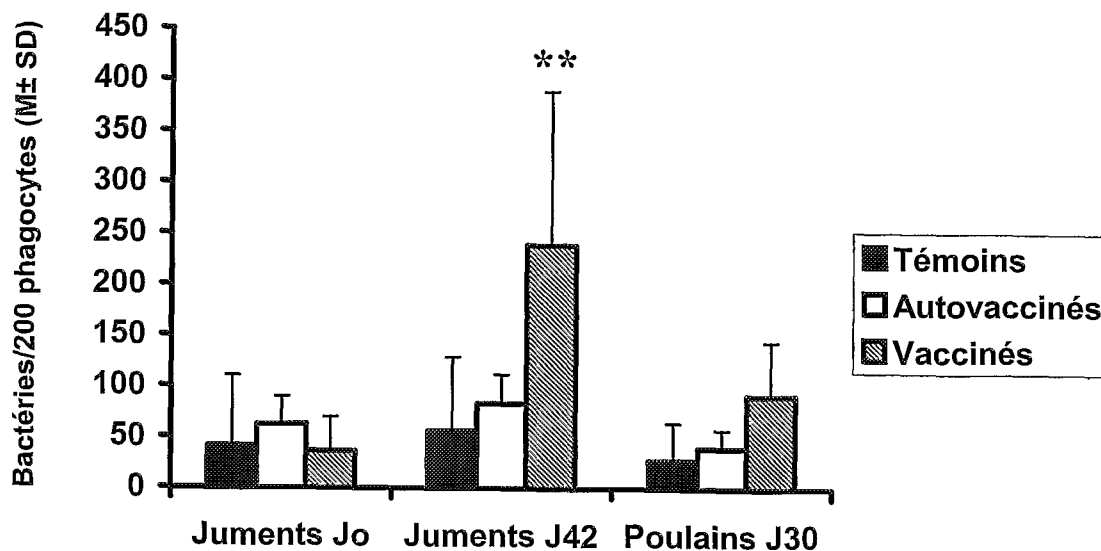


*différence significative, **

**différence très significative

Graphique 2

Expression de la capacité opsonisante des sérums en nombre de bactéries par macrophages (moyenne sur 200 phagocytes) pour les juments (avant et 42 jours après vaccination) et des poulains (30 jours après la naissance) des différents lots (témoins, autovaccinés et vaccinés).



*différence significative, **

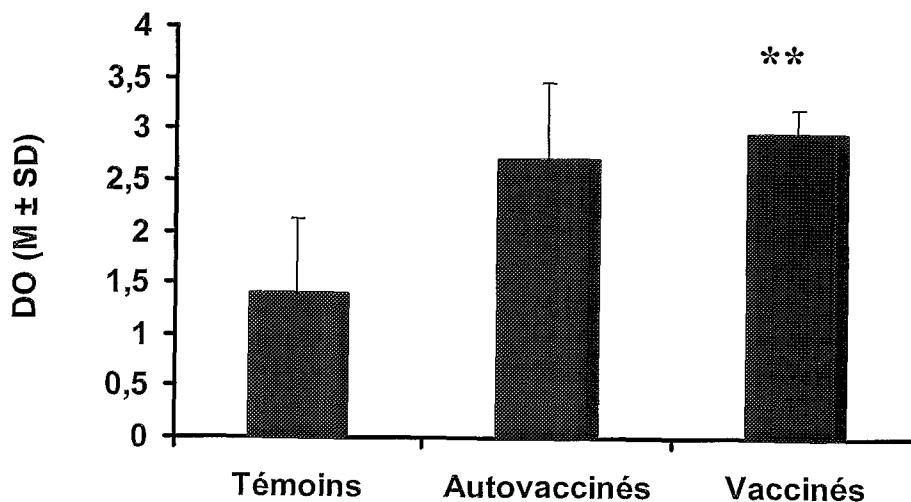
**différence très significative

Transmission de l'immunité

Le dosage des anticorps contenus dans le colostrum par ELISA met en évidence un niveau significativement plus élevé pour les juments autovaccinés et vaccinés (graphique 3).

Graphique 3

Dosage des anticorps contenus dans le colostrum par test



*différence significative, **

**différence très significative

Vingt-quatre heures après la prise de colostrum, on observe une bonne corrélation entre les titres des mères et leur poulain.

Le niveau d'anticorps décroît progressivement de la naissance à J₃₀ pour les poulains de chaque lot et reste cependant plus élevé pour les poulains issus de mère vaccinées et autovaccinées.

L'observation des capacités opsonisantes montre un niveau significativement plus élevé pour le lot vacciné par rapport aux deux autres, 30 jours après la naissance.

Durant l'étude, 4 cas de rhodococcose ont été observés chez les poulains du lot témoin, et aucun chez les autres lots. Les effectifs réduits ne permettent pas de déterminer si le résultat observé est attribuable à la vaccination.

DISCUSSION

Cette étude de terrain est une première étape qui démontre que la vaccination a pu stimuler le système immunitaire de juments gravides. La formulation vaccinale utilisant un adjuvant est bien tolérée par les juments.

L'étude a mis en évidence chez les juments vaccinées, une valeur significativement plus élevée des capacités opsonisantes des sérums et du niveau d'anticorps transmis aux poulains via le colostrum par rapport aux témoins et aux juments autovaccinées.

Bien que n'observant aucun cas de rhodococcose dans le groupe vacciné et 4 dans le groupe témoin, les effectifs trop réduits n'ont pas permis de démontrer significativement l'efficacité du vaccin. Il faudrait pour cela, lors d'essais pour un vaccin amélioré, tester celui-ci sur des lots contenant des effectifs plus importants.

Il s'agirait notamment d'améliorer la formulation du vaccin pour éviter l'apparition d'effets secondaires en modifiant le mode de préparation de la solution antigénique.

Ces résultats montrent que le vaccin testé pourrait offrir une meilleure protection du poulain pendant la phase extracellulaire de *Rhodococcus equi*.

Afin d'en tester l'efficacité contre la bactérie durant la phase intracellulaire, nous allons étudier dans la suite de nos travaux la capacité de ce vaccin à stimuler les lymphocytes T qui pourront activer les macrophages.

La vaccination pose cependant quelques problèmes. Elle augmenterait la séropositivité à *R. equi* dans les élevages. Cela rendrait plus difficile la distinction parmi les vaccinés entre les poulains seulement positifs et ceux réellement malades. De plus, nous ne savons pas pour l'instant si le niveau d'anticorps maternel élevé risque de retarder la maturité du système immunitaire du poulain, comme cela a été montré lors d'une étude (Taouji *et al*, soumis) sur des poulains dont la mère a reçu l'autovaccin.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Cohen N.D., Chaffin M.K., and R. J. Martens.** 2000. Control and Prevention of *Rhodococcus equi* Pneumonia in foals. *Compendium* **22**:1062-1070.
2. **Giguere, S. and J. F. Prescott.** 1997. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet Microbiol* **56**:313-334.
3. **Giguere, S. and J. F. Prescott.** 2000. Equine immunity to bacteria. *Vet Clin North Am Equine Pract* **16**:29-iv.

4. **Lunn, D. P. and H. G. Townsend.** 2000. Equine vaccination. *Vet Clin North Am Equine Pract* **16**:199-226, viii.
5. **Varga, J., L. Fodor, M. Rusvai, I. Soos, and L. Makrai.** 1997. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. *Vet Microbiol* **56**:205-212.