

L'électrophorèse en champ pulsé démontre la clonalité des souches de *Staphylococcus aureus* cunicoles de haute-virulence

D. VANCRAEYNES¹, K. HERMANS¹, A. DEPLANO²,
O. DENIS², L. MEULEMANS¹, F. HAESEBROUCK¹

¹Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgique

²Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Erasme, Lenniksebaan 808, B-1070 Bruxelles, Belgique

Résumé. Les souches *Staphylococcus aureus* de lapins de haute virulence classiques appartiennent à la combinaison biotype-lysotype "mixed CV-C" – 3A/3C/55/71. Les années passées, certaines souches, isolées d'élevages cunicoles avec des problèmes chroniques de staphylococcose, appartenaient à un lysotype légèrement différent. Cela suggérait une évolution des souches de haute virulence classiques. Récemment l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) a démontré que les "nouvelles" souches et les souches classiques de haute virulence sont clonales. Ceci indique que la PFGE est une méthode de typage plus fiable que la lysotypie concernant les souches *S. aureus* cunicoles. Cependant elle reste un outil coûteux et difficile et pour cette raison le développement d'un nouveau test diagnostique moins cher et pratique en usage, s'impose.

Abstract- Clonality of high-virulence rabbit *S. aureus* strains as demonstrated by pulsed field gel electrophoresis. High-virulence *S. aureus* strains from rabbits typically belong to the biotype-phagetype combination "mixed CV-C" - 3A/3C/55/71. In recent years however, some strains, isolated from rabbitries with chronic problems of staphylococcosis, showed a slightly different phagetype. This suggested an evolution of the classic high virulence strains. Yet, recent pulsed field gel electrophoresis (PFGE) showed that the "new" and the classic high virulence strains are clonal. This reassuring news indicates that PFGE is a more reliable typing tool for rabbit *S. aureus* strains than phagetyping. It is however a difficult and expensive tool and therefore, a new and cheaper diagnostic test for use in practice is in development.

Introduction

Staphylococcus aureus peut pénétrer la barrière sous-cutanée du lapin après avoir infecté de petites lésions de la peau. Au niveau individuel chez l'animal, les bactéries causent des lésions comme la pododermatite, les abcès sous-cutanés et les mammites (Hermans *et al.*, 2003). Les lapereaux peuvent souffrir d'une dermatite pustuleuse et souvent meurent à cause d'une mammite agalactique de la lapine. Au niveau de l'élevage, deux types d'infections à *S. aureus* se distinguent. Le premier type est causé par des souches de basse virulence (BV) et se limite à quelques cas individuels, les pertes économiques restant minimales. Le second type d'infection est issu de souches de haute virulence (HV), se propage dans tout l'élevage et conduit à des problèmes chroniques.

Jusqu'à présent, la détermination de la virulence des souches de *S. aureus* cunicoles se fait par une combinaison du biotypage, selon la méthode de Devriese (1984), et la lysotypie (LT). Les souches HV appartiennent typiquement au biotype « mixed CV-C » et sont sensibles aux phages du groupe II (phages 3A/3C/55/71) (Hermans *et al.*, 1999). Récemment, un changement a été remarqué au niveau des élevages cunicoles avec des problèmes chroniques: à côté des souches classiques HV, le nombre de souches ayant des propriétés atypiques augmentait. Ces souches appartenaient au biotype « mixed CV-C » et étaient sensibles aux phages du groupe II, mais étaient également sensibles aux phages d'autres groupes

(Vancraeynest *et al.*, 2004). A une seule occasion, une combinaison de biotype – lysotype "mixed CV-C" - 29/79/42E/92/D11/HK2, n'appartenant pas aux phages du groupe II, a aussi été la cause d'une infection répandue (Devriese *et al.*, 1996).

La LT a été utilisée pendant 40 ans pour différencier les souches *S. aureus*. Malheureusement cette technique comporte deux faiblesses importantes: (i) elle caractérise les isolats basés sur un marqueur phénotypique peu reproductible; (ii) elle ne fait pas le typage de tous les isolats (Bannerman *et al.*, 1995). Le biotypage des isolats de *S. aureus* connaît aussi ses mauvais points: souvent une discordance apparaît au niveau des résultats due à des différences dans les conditions de test, un manque de réactifs standardisés et des problèmes dans l'interprétation des tests sur milieu cristal violet (Hennekinne *et al.*, 2003). Néanmoins, jusqu'à présent, cette combinaison du biotypage et de la LT avait prouvé son utilité dans la caractérisation d'isolats de *S. aureus* cunicoles. Or, les changements actuels dans le lysotype des souches HV, comme décrits ci-dessus, ont modifié la situation.

Lors de la dernière décennie, des infections à *S. aureus* d'origine humaine ont surgi comme cause d'infections nosocomiales et communautaires (Lowy, 1998). Les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) ont abouti à un intérêt considérable dans l'analyse épidémiologique. A ce jour, l'identification et le monitoring épidémiologique local et international de souches de *S. aureus* ont fait des progrès en utilisant les méthodes "d'empreintes

Tableau 1. Souches de *Staphylococcus aureus* incorporées dans cette étude

Souche	Virulence	Combinaison biotype - lysotype	Pays d'origine	Année d'isolation
KH 454	haute	Mixed CV-C 3A/3C/55/71	Belgique	1998
Ref 49	haute	Mixed CV-C 29/52+/52A±/80/3A+/3C/55/71/6/42E/47/54/75/83A/84/81/94/+	France	2003
Ref 42	haute	Mixed CV-C 3A/3C/55/71	France	2003
KH 522	haute	Mixed CV-C 29/52/52A/80/3A/3C/55/71/6/42E/47/53/54/75/84	Belgique	1998
KH 119	haute	Mixed CV-C 29/3A/3C/55/71/6/42E/47/54/75/84/94	Belgique	1997
VL 1	haute	Mixed CV-C 3A/3C/55/71	Belgique	1998
DV 18	haute	Mixed CV-C 29/80/3A+/3C/55/71/6/42E/47/54/75/83A/84/81/94/+	France	2002
DV 42	haute	Mixed CV-C 3A/3C/55/71	Espagne	2004
DV 64	haute	Mixed CV-C 29/3C/71/6±/42E/47/54/83A/94	Italie	2004
DV 91	haute	Mixed CV-C 3A/3C/55/71	Grèce	2004
Calde R MAM	haute	Mixed CV-C 29/52/52A/80/3C/55/71/6/42E/47/54/75/83A/84/81/94/95	France	2002
DV 58	haute	Mixed CV-C 3C/55/71	Belgique	2004
266/3572	haute	Mixed CV-C 3A/3C/55/71	Belgique	1983
PI 41/95	haute	Mixed CV-C 29/79/42E/92/D11/HK2	Belgique	1995
KH 202	basse	Volaille 3A/3C/55/71	Belgique	1997
PI 270/96	basse	Humain 3A/3C/55/71	Belgique	1996
KH 28	basse	Mixed CV-A 29/79/85/95	Belgique	1997

génétiques" (DNA fingerprinting) (Struelens *et al.*, 1992; Bannerman *et al.*, 1995; Enright *et al.*, 2000). Maintenant, l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est considérée comme l'outil moléculaire de choix pour le typage des souches de *S. aureus*. Le but de cette étude était de démontrer les liens génétiques des souches de *S. aureus* cunicoles, provenant de différents pays Européens, en les caractérisant au niveau moléculaire par PFGE.

1. Matériel et méthodes

1.1 Souches bactériennes

La présente étude a concerné 17 isolats de *S. aureus* cunicoles (tableau 1). Quatorze de ces isolats représentaient des souches HV sélectionnées sur l'origine géographique, le lysotype et l'année d'isolement. Toutes les souches HV provenaient d'élevages cunicoles avec des problèmes chroniques de staphylococcose; les autres souches incluses dans l'étude étant des souches issus d'élevages sans problème et appartenant à d'autres combinaisons de biotype – lysotype. Les souches provenaient de la Belgique (10), la France (4), la Grèce (1), l'Italie (1) et l'Espagne (1).

La classification des souches de *S. aureus* isolées dans différents biotypes a été fait comme le décrit par Devriese (1984). La LT a été réalisé à l'Institut Pasteur (Bruxelles, Belgique), utilisant des bactériophages du kit de typage international des souches de *S. aureus* d'origine humaine. Les réactions lytiques étaient examinées dans un test de dilution (Parker, 1962).

1.2 PFGE

L'électrophorèse en champ pulsé a été effectuée comme le décrit Struelens *et al.* (1992).

2. Résultats

Les profils des différents isolats de *S. aureus* déterminés par la PFGE ont mis en évidence un profil identique (nommée « N2 ») pour chacune des 13 souches HV isolées entre 1983 et 2004 (Figure 1). La souche PI 41/95 montrait le profil "N3", qui différait au niveau de 4 fragments du profil N2.

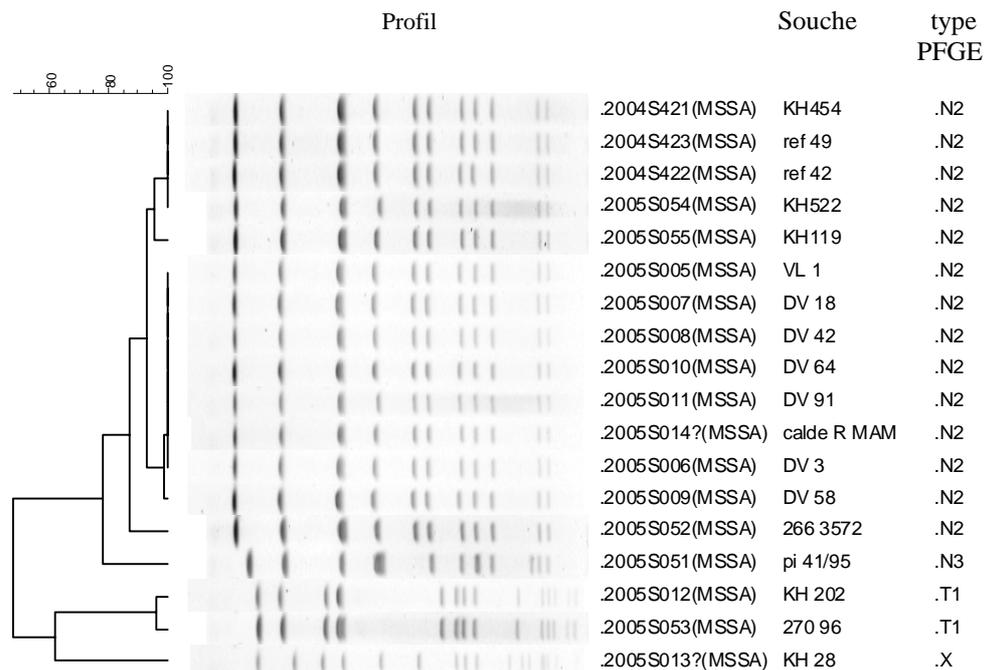
Les profils générés avec les souches BV (KH 202, PI 270/96 et KH 28) se sont montrés nettement différents de ceux de N2 et N3.

3. Discussion

Sur la base de l'identité des profils concernant les souches HV, les résultats de la présente étude indiquent la diffusion internationale d'un clone de *S. aureus* HV de lapins dans la CE. Ce clone est la cause de problèmes chroniques de staphylococcose chez les lapins depuis au moins 1983 (cet isolat étant la plus ancienne souche présente dans le département des auteurs). La souche HV décrite par Devriese *et al.* (1996), qui n'a été isolée qu'une seule fois, montrait un profil apparenté au profil des souches HV classiques.

Dans le passé, la LT était la méthode de typage de *S. aureus* la plus importante. Néanmoins, récemment la LT a perdu de son intérêt en raison d'un nombre d'isolats non-typables dans certains pays, le coût des contrôles de qualité et un manque de reproductibilité

Figure 1. Profils de PFGE des souches de *S. aureus* cunicoles HV et BV



dans certains laboratoires (Bannerman *et al.*, 1995). En 1995, Bannerman et ses collègues ont trouvé deux grands avantages dans l'utilisation de PFGE par rapport à la LT : (i) la typabilité (ou capacité de typage) de 100% des souches de *S. aureus*, et (ii) le fait que l'analyse par PFGE était plus discriminante pour distinguer les souches épidémiologiquement liées des souches non-liées. Ils ont trouvé que la PFGE avait la capacité d'identifier des sous-groupes dans chaque groupe de phages, donc était plus discriminant comme test que la LT.

Néanmoins, dans la présente étude le contraire était valable : des souches appartenant à différents groupes de phages appartenaient au même type de PFGE. Une explication possible est que la LT se base sur des marqueurs de protéines phénotypiques qui ne sont pas aussi stables que le génome.

La PFGE n'est pas la technique la plus performante dans l'étude de l'évolution des lignées de *S. aureus* à long terme puisque c'est une technique qui indexe rapidement l'accumulation des variations génétiques (Enright *et al.*, 2000). Le fait que des isolats pris avec 21 ans de différence appartiennent toujours au même type PFGE est donc un phénomène remarquable.

La donnée qu'un seul clone puisse être le responsable des problèmes chroniques de staphylococcose des lapins correspond aux observations faites par Fitzgerald *et al.* (1997), qui a montré que quelques clones spécialisés de *S. aureus* causent la majorité des mammites bovines, et que ces mêmes clones ont une distribution géographique étendue. Des résultats similaires ont été rapportés pour les isolats de *S. aureus* humains où on ne retrouve souvent qu'un

nombre limité de clones MRSA qui circulent dans un pays.

La LT récente sur des isolats de *S. aureus* HV cunicoles suggérait une évolution des souches HV classiques dans de nouveaux types. Néanmoins, la PFGE démontre que cette évolution est inexistante et qu'elle résulte du fait que les souches classiques et nouvelles sont clonales. Cette nouvelle rassurante indique que la PFGE est un outil de typage beaucoup plus fiable que la LT en ce qui concerne les souches de *S. aureus* cunicoles. Cependant cette méthode reste difficile et coûteuse pour une utilisation quotidienne et pour cette raison un test diagnostique bon-marché et nouveau est en développement.

Références

- BANNERMAN T.L., HANCOCK G.A., TENOVER F.C., MILLER J.M. 1995. Pulsed-field electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 33, 551-555.
- DEVRIESE L.A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl. Bact.* 56, 215-220.
- DEVRIESE L.A., HENDRICKX W., GODARD. C., OKERMAN. L., HAESBROUCK. F. 1996. A new pathogenic *Staphylococcus aureus* type in commercial rabbits. *J. Vet. Med. B.* 43, 313-315.
- ENRIGHT M.C., DAY N.P., DAVIES C.E., PEACOCK S.J., SPRATT B.G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1008-1015.
- FITZGERALD J.R., MEANEY W.J., HARTIGAN P.J., SMYTH C.J., KAPUR V. 1997. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* 119, 261-269.

- HENNEKINNE J.A., KEROUANTON A., BRISABOIS A., DE BUYSER M.L. 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J. Appl. Microbiol.* 94, 321-329.
- HERMANS K., DE HERDT P., DEVRIESE L.A., HENDRICKX W., GODARD C., HAESBROUCK F. 1999. Colonisation of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Vet. Microbiol.* 67, 37-46.
- HERMANS K., DEVRIESE L.A., HAESBROUCK, F. 2003. Rabbit staphylococcosis: difficult solutions for serious problems. *Vet. Microbiol.* 91, 57-64.
- LOWY F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520-532.
- PARKER M.T. 1962. Phage typing and the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection. *J. Appl. Bact.* 25, 389-402
- STRUELENS M.J., DEPLANO A., GODARD C., MAES N., SERRUYS E. 1992. Epidemiologic typing and delineation of genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis of genomic DNA by using pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2599-2605.
- VANCRAEYNEST D., HERMANS K., HAESBROUCK F. 2004. Chronic problems of staphylococcosis in rabbits can be caused by strains not belonging to the classic biotype-phagetype combination "mixed CV-C" - 3A/3C/55/71. *Proceedings of the Cost Action 848, June 24-26, Madrid, Spain, 28.*