

N° d'ordre : 3478

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Biotechnologie végétale et microbienne, biodiversité et Environnement

Structure de Recherche : Équipe de microbiologie et biologie moléculaire

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie moléculaire et appliquée

Présentée et soutenue le : 21/06/2021 par :

Ghizlane SEBBAR

Caractérisation moléculaire, pathogénicité et antibiorésistance de *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* et contribution au développement d'un vaccin contre *Mannheimia haemolytica* chez les ruminants au Maroc

JURY

Abdelkarim FILALI-MALTOUF	PES, Membre correspondant à l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques, Rabat.	Président
Leila MEDRAOUI	PH à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat.	Rapporteur/examineur
Faouzi KICHOU	PES à Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.	Rapporteur/examineur
Siham FELLAHI	PH à Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat.	Rapporteur/examineur
Khalil ZRO	Dr, Expert Biopharma Av. Hassan II, Rabat.	Co-encadrant
Bouchra BELKADI	PES à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat.	Directrice de thèse

Année Universitaire :2020-2021

Dédicaces

A mes très chers parents,

Pour leurs encouragements, leur soutien et leur patience tout au long de ma scolarité que l'aboutissement de ce travail soit la récompense de leur bienveillance et leurs sacrifices et qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amour et ma profonde reconnaissance.

A mes chères frères Ahmed et Anass, ma sœur Nada et ma nièce Nouhayla,

Nulle dédicace ne pourrait vous exprimer toute ma reconnaissance et tout mon amour. Vous avez remarquablement gâté et encouragé mes ambitions et vous avez veillé à mon succès et à mon bonheur. En témoignage de mon grand amour fraternel qui nous unit, Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien m'ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A ma belle-sœur Ghizlane,

Merci pour ton encouragement et pour ton soutien moral, vous trouvez dans ce travail l'expression de mon profond respect et de ma sincère estime.

A la mémoire de mon grand frère Karim,

J'aurais tant aimé que tu sois présent, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

A toute la famille

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond amour et respect.

A la mémoire des grands parents

A mes amis (es),

Hanane, Nadia, Chafiq, Amina, Fatima, Safae, Hajar, Siham, Khadija, Maryame, Ikrame, Sara, Bouchra, Salah, Abdellah, Adil, Brahim, Hassan, khalil, Mustapha, Said, Hicham, Mohssine, avec qui j'ai passé des moments exceptionnels. Merci à vous tous pour votre bonne humeur, et votre gentillesse.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

A tous ceux qui me sont chers

Ghizlane SEBBAR.

Remerciements

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent

Du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers

Par qui nos âmes sont fleuries.

Marcel Proust.

Ce rapport présenté par **Ghizlane SEBBAR** est réalisé dans le cadre de la préparation du Doctorat National en Sciences et Technologies sous la direction de **Madame Bouchra BELKADI**, PES, de l'Équipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire (EMBM) et le Co-encadrement du Monsieur **Khalil ZRO**, Docteur, Chef du Service Diagnostic Recherche et développement (DRD) à la Société Biopharma-Rabat.

Le travail de recherche a été effectué dans le cadre d'une étroite collaboration scientifique à travers une convention cadre et spécifique entre l'EMBM de la Faculté des Sciences Rabat et le laboratoire DRD de Biopharma-Rabat.

Au terme de ces années de doctorat, je tiens à exprimer ici toute ma gratitude envers les personnes qui ont contribué de près comme de loin à la réalisation de cette thèse. Pour moi, ces années de doctorat ont été avant tout une aventure humaine et scientifique, et je profite de ce moment pour en remercier les principaux acteurs.

*J'adresse mes profonds remerciements à Madame **Bouchra BELKADI**, PES à la faculté des sciences de Rabat, pour la direction de ma thèse. Elle m'a fait découvrir l'exemple de l'encadrant compétent, sérieux et serviable. Vous avez été le soutien parfait qui m'a permis de surmonter toutes les difficultés tout au long de cette épreuve.*

*J'adresse mes profonds remerciements à Docteur **Khalil ZRO**, Co-encadrant de ma thèse et chef de service du LDRD à Biopharma, je le remercie pour son implication dans mon travail, je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie, il a su me donner la confiance nécessaire à l'aboutissement de ce travail.*

*J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, PES, membre à l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques de Rabat qui m'a honorée par sa présidence du jury.*

Mes sincères remerciements sont adressés aux :

*Madame **Leila MEDRAOUI**, PH à la Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat. qui m'a honoré en acceptant d'être rapporteurs/examineurs de ce travail et de siéger au jury de cette thèse.*

Monsieur **Faouzi KICHOU**, PES à l'Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, qui m'a honoré en acceptant d'être rapporteurs/examineurs de ce travail et de siéger au jury de cette thèse.

Madame **Siham FELLAHI**, PH à l'Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat, qui m'a honoré en acceptant d'être rapporteurs/examineurs de ce travail et de siéger au jury de cette thèse.

Qu'ils me permettent de leur exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères aussi bien par leur présence que pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail. Mes hommages respectueux.

En guise de conclusion, ce travail a pu être mené à terme grâce aux nombreuses personnes, collègues et amis qui m'ont prodigué leurs aides, leurs soutiens, leurs conseils et leurs amitiés. Je tiens aujourd'hui à les remercier vivement.

Résumé

Pasteurella est considérée comme le principal pathogène des voies respiratoires chez les ruminants. *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* ont été étudiées et typées à partir d'écouvillons nasaux et de tissus prélevés sur des moutons, des chèvres et des bovins. En effet, 41 échantillons de poumons et 121 écouvillons nasaux ont été collectés sur des animaux suspects de la pasteurellose entre janvier 2015 et décembre 2017 dans six régions différentes du Maroc.

Les échantillons ont été soumis à un test de criblage par PCR en temps dont les positifs ont fait l'objet d'une culture sur gélose au sang. Les isolats identifiés ont été confirmés par PCR conventionnelle. Le pouvoir pathogène des isolats a été évalué chez la souris et un examen histopathologique a été réalisé sur certains tissus pulmonaires. Ensuite, un test de sensibilité antimicrobienne (AST) a été réalisé pour 41 isolats sur un panel de 13 antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire.

Une multirésistance aux antibiotiques a été observé même pour la colistine préservée comme antibiotique de dernier recours. Pour confirmer ces résultats, nous avons déterminé le profil de la colistine par la recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et nous avons procédé à la détection du gène *mcr-1* par PCR en temps réel.

A notre connaissance, la présente étude est la première étude au Maroc qui rapporte des infections par *Pasteurella* (*M. haemolytica* & *P. multocida*) chez les ruminants. Pour les deux espèces de *Pasteurella*, l'Amoxicilline/Acide Clavulanique était l'agent antimicrobien le plus efficace, la résistance à la colistine a été confirmée. Aussi, nos résultats suggèrent la nécessité et l'urgence d'établir un programme national de surveillance pour déterminer l'antibiotique approprié pour le traitement de la pasteurellose. Par conséquent, la production de vaccin inactivé à partir des souches autochtones, est hautement nécessaire pour atténuer l'impact de la bactérie chez les animaux. Pour cela un lot expérimental de vaccin inactivé a été produit à partir d'une souche sélectionnée dont sa protection a été évalué sur le plan sérologique.

Mots clés : *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, PCR, histopathologie, pathogénicité, antibiorésistance, vaccin, Maroc

Abstract

Pasteurella is considered the major pathogen of the respiratory tract in ruminants. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* were studied and typed from nasal swabs and tissues collected from sheep, goats and cattle. Indeed, 41 lung samples and 121 nasal swabs were collected from suspected animals with pasteurellosis between January 2015 and December 2017 in six different regions of Morocco.

The samples were submitted under a screening test by real time PCR, then the samples coming out positive were subject to culture on blood agar, after which the identified isolates were confirmed by PCR gel based. The pathogenicity of the isolates was evaluated in mice and histopathological examination was performed on selected lung tissues. Then, an antimicrobial susceptibility test (AST) was performed for forty-one isolates on a panel of 13 antibiotics most commonly used in veterinary medicine.

A multiresistance to antibiotics was observed even for colistin preserved as an antibiotic of last resort. To confirm that we used different tools such as minimum inhibitory concentration (MIC) to determine the profile of colistin, in addition, we studied real-time PCR to detect the *mcr-1* gene.

To our knowledge, the present study is the first study in Morocco reporting *Pasteurella* (*M. haemolytica* & *P. multocida*) infections in ruminants. For both *Pasteurella* species, Amoxicillin/Acid clavulanic was the most effective antimicrobial agent, colistin resistance was confirmed. Thus, our results suggest the need and urgency to establish a national surveillance program to determine the appropriate antibiotic for the treatment of pasteurellosis. Therefore, the production of inactivated vaccine from indigenous strains is highly necessary to mitigate the impact of the bacteria in animals. For this purpose, an experimental batch of inactivated vaccine was produced from a selected strain whose protection was evaluated serologically.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, PCR, histopathology, pathogenicity, antibiotic resistance, vaccine, Morocco.

Table des matières

Production scientifique	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Introduction générale	1
Chapitre I- Revue bibliographique	
I-I. La pasteurellose	3
I-II. Historique	3
I-III. Répartition géographique	4
I-III.1. Répartition mondiale	4
I-III.2. Pasteurellose au Maroc	4
I-IV. Étude de l'agent causal	5
I-IV.1. Classification	5
I-IV.2. Culture et identification	5
I-IV.3. Propriétés	5
I-IV.4. Typages de la bactérie	6
I-IV.5. Facteurs de virulence	6
I-IV.5.1. Endotoxine	6
I-IV.5.2. Exotoxine ou leucotoxine	7
I-IV.5.2.1. Particularités génétiques et moléculaires	7
I-IV.5.2.2. Production et cellules cibles	7
I-IV.5.2.3- Mécanismes d'action	7
I-IV.5.3- Autres facteurs	8
I-IV.6. Propriétés antigéniques et Immunigènes	8

I-IV-6.1. Pouvoir antigénique	8
I-IV.6.2. Immunité	10
I-IV.6.2.1. Système de défense non spécifique	10
I-IV.6.2.1. Système de défense spécifique	11
I-IV.6.3. Pouvoir Immunigène	11
I-V. Physiopathologie de la pasteurellose	12
I-V.1. Symptômes cliniques	12
I-V.2. Lésions	13
I-V.2.1. Lésions macroscopiques	13
I-V.2.2. Lésions microscopiques	13
I-V.3. Pathogénie	14
I-V.4. Épidémiologie	15
I-V.4.1. Facteurs de risque	15
I-V.4.2. Les voies d'entrées de la bactérie	15
I-V.4.3. Les espèces hôtes de la pasteurellose	16
I.V.4.4. Mode de transmission	18
I-V.4.5. Conditions écologiques de la circulation de la pasteurellose	19
I-V.4.6. Autres facteurs	19
I-V.5. Diagnostic	20
I-V-5.1. Diagnostic épidémio-Clinique	20
I-V-5.2. Diagnostic biologique	20
I-V.5. 3. Diagnostic différentiel	23
I-V.6. Traitement	23
I-V.7. Prévention	24
I-V.7.1. Conduite d'élevage	24
I-V.7.2. Médicale	24

I-VI. Généralités sur les antibactériens	24
I-VI.1. Résistance des pasteurelles aux antimicrobiens	25
I-VI.2. Antibio-résistance	25
I-VI.3. Familles des antibiotiques et résistances	25
I-VI.3.1. Pénicillines	25
I-VI.3.2. Céphalosporines	26
I-VI.3.3. Aminoglycosides	26
I-VI.3.4. Tétracyclines	27
I-VI.3.5. Lincosamides et macrolides	27
I-VI.4. Antimicrobiens de synthèse	27
I-VI.4.1. Quinolones	27
I-VI.4.2. Sulfamides et triméthoprim	28
I-VI.4.3. Nitrofuranes et dérivés	28
I-VII- Colistine et le gène mcr-1	28
I-VIII- Principes de Production et contrôles des vaccins bactériens inactivés	29
I- IX- Exigences réglementaires	29
I-X- Validation des méthodes de contrôle des vaccins	30
I-XI- Vaccination et vaccins disponibles	30
I-XII- Nouvelle technologie de production de vaccin contre la pasteurellose à partir des OMV	31
Chapitre II- Matériel & méthodes	
II-I. Échantillons étudiés	32
II-II. Test de dépistage par PCR en temps réel	32
II-II.1. Préparation des échantillons	32

II-II.2. Extraction de l'acide nucléique	33
II-II.3. Amplification	33
II-III. Isolement et identification bactérienne	34
II-III.1. Culture sur gélose au sang et MacConkey	34
II-III.2. Coloration gram	34
II-III.3. Test de catalase	35
II-III.4. Test d'oxydase	36
II-IV. Étude Histologique des poumons issus d'animaux malades	36
II-V. Test de confirmation des isolats par PCR conventionnelle	36
II-V.1. Confirmation <i>Mannheimia haemolytica</i>	36
II-V.2. Confirmation <i>Pasteurella multocida</i>	37
II-VI. Étude du pouvoir pathogène sur souris	37
II-VI.1. Dénombrement	37
II-VI.2. Test sur souris	39
II-VI.3. Ré-isollement à partir des organes des souris mortes	39
II-VII. Antibiogramme	40
II-VII.1. Test de diffusion sur disque	40
II-VII.2. Test de CMI vis à vis de la colistine	42
II-VII.3. Détection du gène mcr-1	42
II-VII.3.1. Sybr Green PCR	42
II-VII.3.2. Confirmation par migration sur gel	44
II-VIII. Production d'un vaccin inactivé	44
II-VIII.1. Étapes de production	44
II-VIII.2. Vaccination et suivi sérologique	49

Chapitre III- Résultats

III-I. Test de dépistage par PCR en temps réel	50
III-II. Isolement et étude bactérienne	50
III-III. Étude Histologique	51
III-IV. Test de confirmation des isolats PCR conventionnelle	53
III-IV.1. Confirmation de <i>Mannheimia haemolytica</i>	53
III-IV.2. Confirmation de <i>Pasteurella multocida</i>	54
III-V. Étude du pouvoir pathogène sur souris	56
III-V.1. Dénombrement	56
III-V.2. Pouvoir pathogène sur souris	56
III-V.3. Ré-isolément à partir des poumons de souris mortes	56
III-VI. Antibiogramme	57
III-VI.1. Test de diffusion sur disque	57
III-VI.2. Test CMI vis-à-vis de la colistine	61
III-VI.3. Détection du gène mcr-1	61
III-VI.3.1. Sybr Green PCR	61
III-VI.3.2. Confirmation par migration sur gel	62
III-VII. Suivi sérologique de la vaccination	62
Chapitre IV-Discussion	
Discussion	66
Conclusion générale & Perspectives	73
Références bibliographiques	75
Annexes	86
Articles joints	

Productions scientifiques

Articles scientifiques en relation avec les travaux de thèse (03)

***Detection of Colistin Resistance in *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* Isolates from Ruminants in Morocco. (2021).** G Sebbar, S Fellahi, A Filali-Maltouf and B Belkadi. Pakistan Veterinary Journal, 41(1), pp. 127–131.

***Antimicrobial susceptibility screening test of *Mannheimia Haemolytica* and *Pasteurella Multocida* (serogroup A) Moroccan strains isolated from ruminants (2019).** G. Sebbar, K. Zro, K. Id Sidi Yahia, M. Elouennass, A. Filali-Maltouf, B. Belkadi. *Bulgarian Journal of veterinary medicine*. DOI: 10.15547/bjvm.2019-0109.

***Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* species from ruminants in six different regions in Morocco (2018).** Ghizlane Sebbar, Khalil Zro, Faouzi Kichou, Abdelkarim Fillali-Maltouf and Bouchra Belkadi. Journal of Agricultural Science and Technology A, 8 387-394.

Articles scientifiques en parallèle avec les travaux de thèse (08)

***Isolation, Molecular, and Pathological Characterization of Infectious Bursitis Virus among Broiler Chickens in Morocco (2020).** Maryame Cheggag, Khalil Zro, Mariem Terta, Siham Fellahi, Mohamed Mouahid, Mohammed El Houadfi, Ghizlane Sebbar, and Faouzi Kichou. journal of World's Poultry Research, 10(3), pp. 493–506.

***Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and interaction energy, DFT and antibacterial activity studies of (Z)-4-hexyl-2-(4-methylbenzylidene)-2H-benzo[b][1,4] thiazin-3(4H)-one.** G. Sebbar, B. Hni, T. Hökelek, J. T. Mague, N. K. Sebbar, B. Belkadi and E. M. Essassi. Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications, 76, pp. 889–895.

***Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and interaction energy, DFT and antibacterial activity studies of ethyl 2-[(2Z)-2-(2-chlorobenzylidene)-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-4-yl] acetate.** G. Sebbar, E. Mohamed, T. Hökelek, J. T. Mague, N. K. Sebbar, E. M. Essassi and B. Belkadi. Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications, 76, pp. 629–636.

***Diagnosis of clinical cases of infectious bursal disease using a modified rapid Taq Man-MGB real-time RT-PCR Assay. (2018).** Maryame Cheggag, Khalil Zro, Ghizlane Sebbar,

Naoufal Rahmatallah, Mohamed Mouahid, Mohammed EL Houadfi¹ and Faouzi Kichou. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 8 230-238.

***Isolation and identification of group A Rotaviruses among neonatal diarrheic calves, Morocco.** (2016). Imane Ennima; Ghizlane Sebbar; Bachir Harif; Saaid Amzazi; Chafiq Loutfi; Nadia Touil. *BMC Research Notes*, 9(1), 261.

***Comparison of Sybr Green real time RT-PCR with conventional agarose gel-based RT-PCR for the diagnosis of infectious bronchitis virus infection in chickens in Morocco.** (2016). Siham Fellahi, Mehdi El Harrak, Jens H. Kuhn, Ghizlane Sebbar, El Arbi Bouaiti, Khadija Khataby, Ouafae Fassi Fihri, Mohammed El Houadfi, My Mustapha Ennaji. *BMC Research Notes*, 9(1), 231

***Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco.** (2016). Nadia Amrani, Costantina Desario, Ahlam Kadiri, Alessandra Cavalli, Jaouad Berrada, Khalil Zro, Ghizlane Sebbar, Maria Loredana Colaiani, Antonio Parisi, Gabriella Elia, Canio Buonavoglia, Jamal Malik, Nicola Decaro. *Infection, Genetics and Evolution*. (41) 201-206.

***Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in Africa.** (2015).

Fellahi S, Ducatez M, Harrak ME, Guerin JL, Touil N, Sebbar G, Bouaiti EA, Khataby K, Ennaji MM, El-Houadfi M. *Avian Pathology*, 44(4), pp. 287–295.

Communications Orales (02)

1***Ghizlane SEBBAR**, Khalil ZRO, Bouchra BELKADI, Abdelkarim FILLALI-MALTOUF. Isolation and identification of Pasteurella Respiratory infected ruminants, Morocco, The 3rd International Conference “Microbial for Development” «MICROBIOD 3»; Mohammedia. Du 24 au 26 octobre 2016.

2*Maryame CHEGGAG, Khalil ZRO, **Ghizlane SEBBAR**, Mohamed MOUAHID, Mohammed ELHOUADFI & Faouzi KICHOU. Development and validation of one step TaqMan-MGB Real-Time RT-PCR assay for rapid Detection and discrimination of infectious bursal disease virus, The 3rd International Conference “Microbial for Development” «MICROBIOD 3»; Mohammedia. Du 24 au 26 octobre 2016.

Communications par affichage (04)

1*Maryame CHEGGAG, Khalil ZRO, **Ghizlane SEBBAR**, Mohamed MOUAHID, Mohammed EL HOUADFI & Faouzi KICHOU. Diagnosis of clinical cases of infectious bursal disease using a developed rapid Taq Man-MGB real-time RT-PCR assay. Du 9 au 11 mai 2018 à Meknès, Maroc.

2*Maryame CHEGGAG, Khalil ZRO, **Ghizlane SEBBAR**, Naoufal RAHMATAALLAH, Mohamed MOUAHID, Mohammed ELHOUADFI & Faouzi KICHOU. Isolation, pathological and molecular characterization of infectious bursal disease virus among broiler chickens in morocco, “ World Veterinary Poultry Association Congress 2017”. DU 4 au 8 septembre 2017 à Edinburgh, Nations Uni.

3*Maryame CHEGGAG, Khalil ZRO, **Ghizlane SEBBAR**, Mohamed MOUAHID, Mohammed ELHOUADFI & Faouzi KICHOU. Caractérisation moléculaire et pathologique des cas de bursite infectieuse chez le poulet de chair au Maroc, 7ème Colloque International francophone de microbiologie animale « CIFMA 2017 » ; Du 26 au 27 mars 2017 à Liège, Belgique.

4***Ghizlane SEBBAR**, Khalil ZRO, Bouchra BELKADI, Abdelkrim FILLALI-MALTOUF. Contribution au développement d'un vaccin contre la pasteurellose chez les ruminants au Maroc. 7èmes Journées scientifiques du CeDoc SVS et Les 4èmes Journées scientifiques d'AMaDoc-svs, à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat sous le thème : « RECHERCHE BIOMÉDICALE ET MÉDECINE DU FUTUR ». Du 16 au 19 Mars 2016, Rabat, Maroc.

Liste des abréviations

A	Amoxicilline	IBR	Rhinotrachéite infectieuse bovine
ADN	Acide Désoxyribonucléique	IgG	Immunoglobulines de type G
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire	IgA	Immunoglobulines de type A
AMC	Amoxicilline/Acide Clavulanique	IROMP	Iron regulated outer membrane proteins
ARN	Acide Ribonucléique	K ⁺	Potassium
ATT	Aspirateur Trans-Trachéale	LBA	Liquide Broncho-Alvéolaire
B	Beta	LPS	Lipopolysaccharides
BCC	Bouillon Cœur Cervele	mcr	Mediated colistin resistant
BVD	Diarrhée virale bovine	NA	Acide Nalidixique
°C	Degré Celsius	Na ⁺	Sodium
CMI	Concentration minimale inhibitrice	NH ₃	Ammoniac
CN	Gentamicine	mcr-1	Mobilized colistin resistance-1
CT	Colistine	OMV	Outer membrane Vesicles
CO ₂	Gaz carbonique	OMS	Organisation mondiale de la santé
DO	Densité optique	OIE	Office international des épizooties
DO	Doxycycline	PEtN	phosphoethanolamine
dNTP	Désoxyribonucléotides	PCR	Polymorphisme chaine réaction
E	Erythromycine	PDA	Paraphénylène diamine
ENF	Enrofloxacin	RSV	Virus Respiratoire Syncytial
FAO	Food and Agriculture Organisation	SP	Spiramycine
FFC	Florfenicol	STR	Streptomycine
Gcp	Scialoglycoprotéase	TMB	Tétraméthylbenzidine
H	Heure	UFC	Unités formant colonies

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Interprétation de la taille du Diamètre des Antibiotiques	41
Tableau 2 :	Mix Sybr Green	42
Tableau 3 :	Screening par PCR en temps réel	50
Tableau 4 :	Résultats du test de confirmation de <i>Mannheimia Haemolytica</i> par PCR conventionnelle	54
Tableau 5 :	Résultats test de confirmation de <i>Pasteurella Multocida</i> par PCR conventionnelle	55
Tableau 6 :	Pourcentage de mortalité des souris inoculées par les souches isolées par voie intrapéritonéale	56
Tableau 7 :	Réponse de sensibilité des différentes souches aux différentes familles antibiotiques	58
Tableau 8 :	Analyse statistique de la résistance d'un des antimicrobiens vis-à-vis de la famille des antibiotiques	59
Tableau 9 :	Résultats des pourcentages d'inhibition des sérums ovins analysés par ELISA <i>Mannheimia haemolytica</i> (BioX)	64

Liste des figures

Figure 1 :	Carte de répartition géographique des pasteurelles dans le monde	4
Figure 2 :	Étapes de l'infection pulmonaire par les pasteurelles	15
Figure 3 :	Distribution géographique des échantillons prélevés lors de l'étude	32
Figure 4 :	Croissance des colonies sur gélose au sang et identification par coloration gram	35
Figure 5 :	Réaction de catalase	35
Figure 6 :	Réaction d'oxydase	36
Figure 7 :	Méthode de préparation des dilutions successives pour dénombrement en masse	38
Figure 8 :	Comptage des colonies	38
Figure 9 :	Étude de pouvoir pathogène et inoculation par voie intrapéritonéale sur souris	39
Figure 10 :	Autopsie des souris mortes	40
Figure 11 :	Cycle d'amplification du gène mcr-1pqr Sybr®Green	44
Figure 12 :	Culture bactérienne sur gélose au sang et conservation sur cryoperles	51
Figure 13 :	Lésions microscopiques pulmonaires	52
Figure 14 :	Amplification de fragments spécifiques de <i>Mannheimia haemolytica</i>	53
Figure 15 :	Amplification de fragments spécifiques de <i>Pasteurella multocida</i>	54
Figure 16 :	Amplification de fragments spécifiques du sérotype A de <i>Pasteurella multocida</i>	55

Figure 17 :	Amplification de fragments spécifiques de <i>Mannheimia haemolytica</i> à partir des organes des souris inoculées	57
Figure 18 :	Profil de resistance aux différentes famille des antibiotiques	60
Figure 19 :	Courbe amplification par Sybr Green et température de fusion correspondante	61
Figure 20 :	Confirmation du gène mcr-1 par migration sur gel	62
Figure 21 :	Cinétique de la séroconversion après vaccination des ovins	65

Liste des annexes

Annexe 1 : Fiche de prélèvement	86
Annexe 2 : Extraction de l'ADN	87
Annexe 3 : Résultats étude moléculaire par PCR en temps réel (test de dépistage)	88
Annexe 4 : Résultats isolement bactériologique et identification	96
Annexe 5 : Préparation du gel d'agarose	99
Annexe 6 : Résultats de confirmation par PCR conventionnelle	100
Annexe 7 : Étude du pouvoir pathogène	104
Annexe 8 : Résultats dénombrement et test pouvoir pathogène sur souris	105
Annexe 9 : Résultats de l'antibiogramme	108
Annexe 10 : Test de CMI	110
Annexe 11 : Résultats Gene mcr-1 par Sybr®Green	112
Annexe 12 : Expérimentation de vaccination et suivi sérologique	114
Annexe 13 : Mode opératoire Elisa	115

Introduction générale

Introduction générale

La pasteurellose ou septicémie hémorragique est une maladie cosmopolite contagieuse affectant plusieurs espèces animales notamment les ruminants. Cette maladie est déclarée dans la plupart des pays en voie de développement. Au Maroc, la pasteurellose est connue depuis longtemps et continue à provoquer des dégâts considérables dans les élevages des bovins. Malgré la vaccination par des souches exogènes utilisées depuis plusieurs années, la protection n'est que partielle.

Cette pathologie qui affecte le secteur de l'élevage des ruminants, qui constitue l'une des activités agricoles les plus dynamiques au Maroc, présente un danger dont l'incidence économique est certainement la plus lourde en élevage. Par ailleurs, la moindre atteinte de l'intégrité pulmonaire a immédiatement des répercussions sur la capacité d'ingestion et la valorisation alimentaire, provoquant un retard de croissance dont les effets économiques sont très importants.

En effet, cette maladie est responsable de fortes pertes économiques, tant directes (mortalité, chute de production de lait), qu'indirectes (ralentissement de la croissance, diminution de l'efficacité alimentaire). Les signes cliniques de la maladie peuvent être variables, en fonction de la souche en cause, du statut physiologique et immunitaire des animaux touchés et de l'existence ou non de surinfections bactériennes (Zecchinon et *al.*, 2005).

Au Maroc, les données relatives à la pasteurellose chez les ruminants sont éparpillées et les espèces de bactéries incriminées ne sont pas étudiées. Cependant, la lutte contre la maladie est basée essentiellement sur l'usage des antibiotiques et la vaccination dont les vaccins disponibles sont à base des souches exogènes utilisés soit sous forme de vaccins inactivés à base de corps bactériens entiers, soit de vaccins anti-leucotoxine et vaccins de nouvelle génération IRP.

Les souches pathogènes responsables de cette maladie sont en évolution et continuent de causer des dégâts au niveau des élevages marocains, et c'est dans ce contexte que notre travail avait comme objectifs l'identification des principales espèces de pasteurelles incriminées, la caractérisation des souches isolées sur le plan biologique afin de les utiliser pour développer un vaccin comme moyen de contrôle, pour une meilleure maîtrise et une contribution à la lutte contre la pasteurellose chez les ruminants au Maroc.

Afin de répondre à la problématique évoquée, plusieurs questions sont émises :

1. Quelles sont les souches pasteurelles qui circulent dans l'élevage des ruminants ?
2. Quelle est la pathogénicité et immunogénicité de ces souches ?
3. Peut-on produire un vaccin adapté au contexte Marocain ?

Plusieurs approches ont été utilisées pour répondre aux questions émises, à savoir, une identification bactérienne (coloration gram, test catalase, test d'oxydase), identification moléculaire par PCR en temps réel et PCR conventionnelle, étude du profil antimicrobien des souches isolées et une étude expérimentale vaccinale.

Dans cette optique des objectifs ont été fixés :

Le principal objectif de cette thèse est la production d'un vaccin adapté au contexte Marocain ; et cet objectif est abordé à travers des objectifs spécifiques qui sont résumés comme suit tout d'abord isoler et identifier les souches *pasteurella* responsables des cas de maladies cliniques chez les ruminants, étudier le pouvoir pathogène des souches sélectionnées sur souris, réaliser un antibiogramme en testant des antibiotiques usuellement utilisés en médecine vétérinaire pour aboutir à la production d'un lot de vaccin expérimental à partir d'une souche sélectionnée dont la protection est à évaluer.

Chapitre I-
Revue bibliographique

I-I. La pasteurellose

La Pasteurellose est une affection fébrile, contagieuse, corrosive et inoculable commune aux grands ruminants. Elle est due soit à l'action primaire de *Pasteurella multocida* responsable d'une forme septicémique suraiguë et de plusieurs formes aiguës, soit à l'action jointe de *Pasteurella multocida* & *Mannheimia haemolytica* profitant d'un état souffreteux pour provoquer une atteinte respiratoire non minime. Elle est cliniquement caractérisée par des symptômes généraux (Zecchinon et *al.*, 2005), suivis de la mort en quelques heures, ou le plus fréquemment de localisations respiratoires, digestives ou ganglionnaires et des lésions inflammatoires hémorragiques ou œdémateuses et de pleuropneumonie.

Elle a connu plusieurs nomenclatures dont les plus connues on cite : la pneumonie enzootique, la broncho-pneumonie enzootique, la septicémie hémorragique (chez les jeunes).

I-II. Historique

Cette maladie a été signalée en 1761 au début chez le bœuf par Trutta. Dans son "Nouveau Jardin de la Pratique et de l'Expérience", la première description fut faite chez le buffle par Metaxa en 1817, dans son traité des maladies contagieuses et épizootiques ensuite en 1853, Fauv et la différence du charbon (selon Rapports d'activités. Maisons-Alfort - I.E.M.V.T. - 1976).

En 1878, Bollinger en Allemagne décrit pour la première fois la pasteurellose des bovins, et c'est en 1880, Pasteur isole l'agent bactérien du "Choléra des poules". En 1881, Gaffky découvre l'agent de la septicémie des lapins.

En 1884, Raynaud et Lame Longue, rapportent les premiers cas sporadiques de pasteurellose chez l'homme. En 1887, Orestre et Armani décrivent l'affection du buffle ou "Barbone" en Italie. Toni et Trevisan donnent le nom générique de *Pasteurella* à l'agent causal pour rendre hommage à Pasteur et cette pathologie est nommée la Pasteurellose.

En 1901, Lignieres décrit toutes les affections dues à ce germe et les appelle Pasteurelloses. C'est en 1935 que Topley et Wilson confirment l'unicité des pasteurelles et les groupent sous le nom de *Pasteurella septica*. En 1938, Basset appelle l'agent causal de la Pasteurellose : *Pasteurella veterinaria* 1939, Rosenbush et Merchant proposent la désignation *Pasteurella multocida* qui sera la plus couramment utilisée.

Depuis cette date, plusieurs conférences internationales sur la Septicémie hémorragique ont eu lieu avec pour but de préciser les caractéristiques de cette maladie dans le monde et de dégager

les voies et systèmes de lutte contre cette pathologie. Les recherches continuent sur les caractères antigéniques et immunogéniques des Pasteurelles responsables en vue de la préparation et de la mise au point d'un vaccin fort et confirmé. Cet historique laisse donc aisément percevoir l'intérêt que chercheurs et vétérinaires n'ont cessé de porter à ce mal depuis plus de deux siècles. L'agent étiologique a été recherché chez plusieurs espèces et dans plusieurs régions. Les espèces affectées sont nombreuses et la maladie recouvre la majeure partie du globe.

I-III. Répartition géographique

I-III.1. Répartition mondiale

C'est une maladie cosmopolite retrouvée dans le monde entier (Figure 1), Asie (Asie du sud et sud-est, Proche orient-Turquie, Malaisie, Indonésie et Thaïlande), Afrique (Egypte, Sénégal, guinée, Niger, somalie, Ethiopie, Kenya et Ouganda et Cameroun), Europe (Grande Bretagne et Amérique du Nord) et Amérique (centrale et latine) mais il y'a des zones indemnes comme l'Australie, l'Océanie, le Japon et l'Afrique du Sud.



Figure 1 : Carte de répartition géographique des pasteurelles dans le monde

(D'après les Annuaire de la Santé Animale FAO, OMS et OIE jusqu'en 1981).

I-III.2. Pasteurellose au Maroc

Malgré la présence de la maladie au niveau du Maroc, aucune donnée officielle n'est disponible comme si le pays est indemne de cette pathologie.

I-IV. Etude de l'agent causal

I-IV.1. Classification

Pasteurella est une bactérie dont la taxonomie est comme suit, elle appartient au super-royaume des bactéries ; phylum des protéobactéries ; classe des gammaprotéobactéries ; ordre des pasteurellales ; famille des pasteurellaceae et le genre *Pasteurella* (Trevisan, 1887).

I-IV.2. Culture et identification

La méthode de culture standard implique l'utilisation d'une gélose au sang sur laquelle on étale le prélèvement, et qu'on maintient ensuite à 37°C pendant 24h à 48h. En effet, les colonies sont très petites, blanchâtres après seulement 24h d'incubation.

L'identification est établie sur les résultats au test de Gram, sur l'observation de la morphologie des colonies et sur des tests faisant appel aux propriétés biochimiques en mettant l'accent en particulier sur le caractère catalase et oxydase de la bactérie.

Au laboratoire, on utilise le plus souvent des tests rapides permettant d'identifier la bactérie. On peut citer l'exemple du kit API 20NE (bioMérieux). Le temps nécessaire à l'identification est alors assez court, variant de quelques heures à deux jours selon le test utilisé.

Il faut cependant garder en mémoire que ces tests peuvent manquer de précision, et doivent parfois être couplés à d'autres tests, mettant en évidence d'autres propriétés de la bactérie.

I-IV.3. Propriétés

Les bactéries du genre *Pasteurella* sont des coccobacilles, gram négatif, bipolaire, ovoïdes de 0,2-0,5 µm de largeur sur 0,3-1,4 µm de longueur. Ils sont dépourvus de cils, immobiles et parfois capsulés, non sporulés (Carter, 1967; Martel et Michel, 1985). Ce sont des parasites ou des commensaux obligatoires des mammifères non retrouvés dans le milieu extérieur sauf en cas de contamination par un animal excréteur (Ronac'h ;2006).

Elles peuvent survivre 24h à 20°C dans la paille. Mais, dans des conditions plus froides (+4°C) et plus humides, elles pourront résister jusqu'à 48h.

Les pasteurelles peuvent synthétiser deux toxines bactériennes :

- ❖ Une leucotoxine produite uniquement par *Mannheimia haemolytica* durant sa phase de croissance exponentielle (Roth, 1988). Elle est spécifique à de nombreuses cellules

(leucocytes, plaquettes, neutrophiles, macrophages) et entraîne leur lyse par création des pores membranaires mais l'action sur les cellules épithéliales reste nulle (**Wilkie, 1990**).

- ❖ Le lipopolysaccharides somatique (LPS) est une endotoxine entraînant le déclenchement du processus de la réaction inflammatoire.

La capsule bactérienne permet l'adhérence aux cellules épithéliales et bronchiques protégeant les pasteurelles de la phagocytose. Une fois les alvéoles sont colonisées, elles synthétisent des toxines qui exercent leur pouvoir pathogène sur les tissus pulmonaires.

I-IV.4. Typages de la bactérie

Le typage des pasteurelles se fait par le biais des méthodes sérologiques (techniques lourdes) et moléculaires (PCR). Parmi les méthodes sérologiques, 4 sont les plus utilisées :

- Épreuve rapide d'agglutination sur lame (Typage capsulaire) (OIE, 2005) ;
- Épreuve d'Hémagglutination indirecte (Typage capsulaire) (Carter, 1955) et (Sawada et al., 1985 & Wijewardena et al., 1986) ;
- Épreuve d'immunodiffusion en gélose (Anon, 1981; Wijewardena et al., 1982), (Carter, 1955) et (Heddleston, 1972) ; Contre immunoélectrophorèse (OIE, 2005) ;
- Épreuves d'agglutination (Antigènes somatiques) (Namioka, 1978; Namioka & Murata, 1961).

I-IV.5. Facteurs de virulence

I-IV.5.1. Endotoxine

L'endotoxine semble présenter des propriétés biologiques comparables aux lipopolysaccharides pariétaux d'autres bactéries GRAM- (Keiss et al., 1964). En effet, l'endotoxine initie la réponse inflammatoire pulmonaire par plusieurs mécanismes :

- ✓ Activation des macrophages alvéolaires et action indirecte par activation du complément ;
- ✓ Interaction avec les macrophages pulmonaires intravasculaires et le facteur Hageman.

Les macrophages activés secrètent des substances entraînant l'inflammation, la coagulation, l'oxydation et la protéolyse. La production de leucotriène B₄, puissant attracteur de neutrophiles, explique leur présence avec les macrophages. Le thromboxane A₂ est un agoniste des plaquettes ce qui explique l'agrégation plaquette-macrophage pulmonaire intravasculaire.

En certains endroits, la barrière alvéolaire est rompue. Cela se retrouve sur les trajets de migration des neutrophiles activés qui cheminent entre les cellules épithéliales et les alvéoles. Ils libèrent alors leurs radicaux oxydants et leurs protéases, ce qui conduit à la lyse des tissus. Mais, l'endotoxine peut aussi avoir un rôle direct sur la barrière alvéolaire. Elle est dangereuse pour les cellules endothéliales des artères pulmonaires et augmente la perméabilité vasculaire. De plus, elle active la production des médiateurs inflammatoires (II1, PAF, prostacycline).

I-IV.5.2. Exotoxine ou leucotoxine

Il s'agit d'une toxine entraînant la formation de pores dans les membranes des cellules cibles (Shewen et Wilkie., 1982; Chang et *al.*, 1987).

I.IV.5.2.1. Particularités génétiques et moléculaires

La forme moléculaire de la toxine dépend des conditions de croissance de la bactérie. La toxine est donc constituée de nombreuses sous unités formant un véritable amas. Et plus cet amas prend de l'importance plus l'activité toxique augmente (l'amas jouerait un rôle de protection partielle vis-à-vis des anticorps neutralisants). La structure de la toxine présente des régions définissant l'activité toxique où sont répétées deux fois des séquences différentes de 9 acides aminés (Al Maary et al.,2017).

I-IV.5.2.2. Production et cellules cibles

La leucotoxine est produite pendant la phase de croissance rapide des pasteurelles (**Walker et al., 1984**). La moitié de vie, relativement courte, est inférieure à 60 minutes à 37°C. Le contrôle de la production est complexe. Si un seul gène en position chromosomique commande la production, de nombreux autres gènes sont nécessaires à l'activation de la leucotoxine.

Cette toxine est dotée d'une étroite spécificité, elle n'interfère qu'avec les leucocytes et les plaquettes des ruminants. Il en résulte une véritable immunodépression qui favorise l'installation des pasteurelles dans le poumon.

I.IV.5.2.3. Mécanismes d'action

La leucotoxine s'insère dans la membrane plasmique. Il en résulte la formation des pores transmembranaires. Le diamètre est relativement petit, ce qui permet le passage ionique (Na⁺, K⁺), mais pas celui des macromolécules et des protéines intracellulaires. Il en résulte d'abord une alarme osmotique puis une apoptose cellulaire. Les cellules phagocytaires cibles libèrent

alors leur contenu et en particulier leurs enzymes lytiques dans le poumon provoquant ainsi une destruction tissulaire (Chang et al., 1987).

I-IV.5.3. Autres facteurs

En plus des endotoxines et exotoxines, on distingue d'autres facteurs moins bien connus. Les plus importants sont une neuraminidase (altère les mécanismes d'épuration muco-ciliaires par destruction du mucus), une protéase, une capsule polysaccharidique très grosse, et enfin des fimbriae ou pili.

Les pili permettent l'adhérence bactérienne alors que la capsule glucidique est dotée d'une activité antiphagocytaire et également immunogène.

Les protéases, quant à elles, altèrent la fibronectine présente en surface des cellules épithéliales favorisant ainsi l'accroissement de la colonisation (Ellis & Kuehn, 2010).

I-IV.6. Propriétés antigéniques et Immunigènes

I-IV-6.1. Pouvoir antigénique

Les pasteurelles possèdent plusieurs types d'antigènes répartis en antigènes capsulaires et antigènes somatiques. Parmi eux, il y a des protéines, des polysaccharides des lipopolysaccharides et même un mucopolysaccharide ou mucoprotéide (Bain, 1964). Toutefois, BAIN ne partage pas la répartition systématique en antigènes capsulaires et somatiques. Parce que la constitution des couches pourrait résulter des variations du rythme de synthèse des glucides fermentables, les polysaccharides sont abondants dans la couche externe de la capsule. Mais, ils ne sont pas les seuls antigènes à s'y trouver. Il révèle que les protéines et les polysaccharides se trouvent à la surface, comme le démontrent le test d'immunofluorescence et l'épreuve d'agglutination.

Du point de vue de la protection des animaux, les protéines sont certainement les antigènes immunisant les autres. Les polysaccharides et lipopolysaccharides ne jouent qu'un rôle d'adjuvant (Stamantin, 1958). Dhanda, en 1959, confirme ce rôle des protéines en rapportant que les fractions protéiques possèdent d'excellents caractères immunogènes pour la souris, le lapin, le cobaye et les bovins. Pourtant, aucune protéine homogène pouvant expliquer la protection conférée par l'immunisation active n'a encore été isolée (Bain, 1964).

-L'antigène capsulaire : Selon Perreau en 1976, l'antigène capsulaire est l'antigène protecteur pour les souches B et E. Il conditionne la virulence du microbe d'après Boileau (Boileau

J.J.A.1971) citant Hoffen seich. Il est de nature polysaccharidique (Penn & Nagy, 1976 ; Maheswaranet *al*, 1973 ; Carter & Annau, 1958). C'est un haptène, agissant en "antigène" précipitant et fixateur du complément (Bain, 1964).

Si Perreau semble reconnaître un seul antigène à la capsule, Bain quant à lui, relate que la capsule serait formée de protéines et polysaccharides les plus étroitement liés, et d'autres polysaccharides faciles à isoler. La désignation d'antigène capsulaire engloberait donc l'action des protéines et celle des polysaccharides de la capsule.

- Les antigènes somatiques : pour Perreau (Perreau P, 1976), l'antigène somatique commun aux sérotypes B et E ne semble pas intervenir dans l'immunisation. Cependant, selon les résultats des expériences d'immunité réalisées à Maisons-Alfort en 1975, l'antigène protecteur pour la souche A est l'antigène somatique.

L'antigène somatique est de nature glucido-lipidopo-lypeptidique, selon (Boileau ; 1971) citant Pirotsky. Mais cette nature donnée par Pirotsky semble tout simplement comporter les deux antigènes pariétaux existant chez les Gram-négatifs à savoir :

- le glycopeptide, adjuvant pour les autres constituants,
- le lipopolysaccharide, constituant essentiel qui est l'endotoxine des Gram-négatifs.

Ce lipopolysaccharide a permis de distinguer divers groupes sérologiques. C'est un antigène spécifique. Il est immunologiquement actif lorsqu'il est associé à des fractions protéiques (Perreau ; 1969-1970). D'après Bolotnikov et coll. (Bolotnikov and Shakhidzh, 1971), le lipopolysaccharide de surface purifié est hautement immunogène pour les poulets. La capsule des sérotypes A et D contient de l'acide hyaluronique associé aux lipopolysaccharides de surface qu'il masque. C'est un mucopolysaccharide sérologiquement et immunologiquement inactif (Louembe ; 1976). Cette longue présentation des antigènes n'en élucide pas pour autant nettement le problème de la structure antigénique réelle des pasteurelles. On perçoit que Bain (Bain, 1964) avait raison d'émettre des réserves sur la classification des antigènes en capsulaires et somatiques. En effet, la démarcation n'est pas précise puisque le lipopolysaccharide de surface, normalement présent dans la paroi, vient servir d'élément de typage même à Carter et Perreau qui pourtant à ce que relate (Boileau ; 1971) seraient servi du polysaccharide capsulaire.

De plus, le nombre des antigènes et leur action immunisante exacte ne sont pas connus. La correspondance entre les types de Roberts-Hudson et ceux de Carter-Perreau est encore floue.

I-IV.6.2. Immunité

I-IV.6.2.1. Système de défense non spécifique

Les systèmes de défense non spécifique sont de nature : physique, chimique ou biologique

❖ Système de défense physique

La muqueuse nasale constitue le premier filtre pour les particules dont la taille est supérieure à 10µm. Plus bas, on trouve du mucus dans les bronches et le long de la trachée. Il emprisonne les particules dont la taille est comprise entre 2 et 10µm. Grâce aux mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire, ce mucus remonte les voies aérifères supérieures et est expulsé. Cependant, les plus petites particules (< à 3µm) passent directement dans les poumons.

A cela s'ajoute de la fibronectine présente à la surface de cellules épithéliales saine qui empêche l'adhésion de certaines bactéries Gram négatif par leurs pili (Roth, 1988).

❖ Système de défense chimique

Vient alors le complément : il s'agit d'une cascade de protéines qui peuvent être activées par la voie classique ou interne. Il permet l'opsonisation (interaction avec les anticorps IgG) des pasteurelles ce qui facilite l'ingestion de la bactérie par les macrophages alvéolaires. Mais en plus, il joue un rôle important dans le début de la réponse inflammatoire, celle-ci entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire qui permet aux anticorps et au complément de passer dans la lumière alvéolaire. Cependant, l'inflammation du poumon gêne beaucoup la fonction pulmonaire. Si l'infection n'est pas bloquée, d'importants signes cliniques apparaissent (Roth, 1988).

❖ Système de défense biologique

Dans le mécanisme de défense de voies aériennes inférieures, les cellules phagocytaires ont un rôle très important. Ainsi, les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles peuvent-ils tous les deux détruire les pasteurelles mais ils sont aussi l'objectif de la leucotoxine. Une concentration élevée de la toxine permet leur destruction, mais à des niveaux plus bas, elle inhibe la fonction phagocytaire. Les neutrophiles sont de façon générale plus sensible à la leucotoxine. Ainsi, au début de l'infection les cellules phagocytaires ne sont pas détruites, mais inhibées (Roth, 1988).

I-IV.6.2.2. Système de défense spécifique

Les ruminants exposés à des pasteurelles vivantes produisent des anticorps contre les antigènes de surface de la bactérie et des anticorps anti-leucotoxine. Au niveau des cavités nasales, ce sont les IgA qui sont majoritaires, remplacées progressivement par des IgG au fur et à mesure que l'on descend l'arbre trachéo-bronchique (Wilkie, 1982).

Les premiers (IgA) interviennent dans la neutralisation virale, la neutralisation de la leucotoxine et l'empêchent d'avoir une action nuisible sur les fonctions phagocytaires. De plus, ils agglutinent la bactérie, ce qui facilite la phagocytose.

Le deuxième type d'immunoglobuline (IgG) correspond aux anticorps opsonisant et anticorps stimulant les agents pathogènes bactériens et l'action phagocytaire des macrophages alvéolaires et des neutrophiles. Ces mêmes anticorps activent la voie classique du complément, c'est la raison pour laquelle l'inoculation par voie parentérale d'un vaccin en favorisant la production d'IgG pulmonaires, est plus efficace que l'administration locale.

- ❖ La réponse immunitaire à médiation cellulaire dans les conduits pulmonaires, on trouve 75% de macrophages, 20% de lymphocytes surtout les lymphocytes T et 5% de neutrophiles, éosinophiles, basophiles et de cellules épithéliales. Ce sont les lymphocytes T qui jouent un rôle important. Lorsqu'ils sont sensibilisés après interaction avec un antigène, ils secrètent des lymphokines qui activent la fonction phagocytaire des cellules pulmonaires de type macrophage et neutrophile.

La réponse immunitaire à médiation cellulaire est induite par de nombreux antigènes et est relativement compartimentée. L'immunisation par voie respiratoire induit une réaction locale, mais pas d'immunisation systémique. Cependant, des fortes doses d'inoculation entraînent une disparition de cette compartimentation.

Le système à mémoire fonctionne très bien et longtemps. Les macrophages répondent aux lymphokines et peuvent être activés par les productions des lymphocytes T stimulés par un antigène.

I-IV.6.3. Pouvoir Immunigène

- ❖ Une réponse immune envers la leucotoxine

Les pasteurelles produisent une leucotoxine thermolabile qui lyse les leucocytes (macrophages alvéolaires, lymphocytes, neutrophiles) participant ainsi à un mécanisme d'échappement

bactérien à la réponse immune. Par ailleurs, cette toxine possède un effet pathogène qui, par un mécanisme indirect, participe aux lésions de pneumonie fibrineuse. Il est désormais clair, que l'induction d'une immunité anti-toxinique est nécessaire mais non suffisante, pour une protection satisfaisante (Clinkenbeard et al., 1992).

❖ Une réponse immune envers la surface de la bactérie

Les pasteurelles expriment plusieurs antigènes constitutifs de la capsule ou des pili. Certains de ces antigènes sont des adhésines responsables du pouvoir pathogène des pasteurelles permettant l'attachement de la bactérie à l'épithélium pulmonaire. L'induction d'une immunité contre ces adhésines permet une inhibition de l'adhésion. Par ailleurs, la capsule joue un rôle protecteur, anti-phagocytaire, qui peut être combattu par l'induction d'anticorps anti-capsule qui facilite la phagocytose (anticorps opsonisant). Néanmoins, la vaccination avec le polysaccharide capsulaire n'entraîne pas d'immunité protectrice (Wilkie, 1982).

❖ Une réponse immune envers la membrane bactérienne

En effet, trois protéines de membranes exprimées dans des conditions de déplétion en fer (IROMP) ont été identifiées ; Parmi celles-ci, une protéine de 100 KDa semble être un récepteur majeur de type transferrine, impliquée dans le métabolisme du fer, nécessaire à la multiplication bactérienne et la synthèse de la toxine. L'induction d'une réponse anticorps contre ce récepteur, pourrait interférer avec ce métabolisme et se révéler protectrice (Wilkie, 1982).

❖ Une réponse immune envers d'autres produits (enzymes)

On a montré l'existence d'une scialoglycoprotéase (Gcp) qui peut cliver des récepteurs cellulaires de surface et les IgG d'une neuramidase et d'une substance semblable à une angiotensine. Le pouvoir immunogène protecteur de cette Gcp a été mis en évidence grâce à une Gcp recombinante associée à une protéine (Wilkie, 1982).

I-V. Physiopathologie de la pasteurellose

I-V.1. Symptômes cliniques

La maladie se caractérise par une dépression de l'état général avec une forte fièvre. La température rectale atteint au moins 40°C, le rythme cardiaque est augmenté et les animaux refusent de s'alimenter.

L'atteinte de l'appareil respiratoire se manifeste par une polypnée, un jetage nasal d'abord séreux puis rapidement mucopurulent, pour finir par se dessécher et former des croûtes sur le

muflé. La rhinite s'accompagne de larmoiement. Les mouvements respiratoires, accrus dans les premiers stades de la maladie, sont suivis par de la dyspnée. La toux est souvent relevée et varie dans ses caractéristiques : elle peut être grasse ou douloureuse et retenue. Les animaux peuvent tenir leurs coudes en abduction et l'encolure en extension.

L'auscultation révèle une augmentation des bruits vésiculaires et bronchiques dans les régions antérieures et déclives des poumons. Progressivement, on entend des râles humides puis secs. Des bruits de friction pleurétique peuvent être décelés dans les mêmes zones. La diarrhée survient chez certains animaux et il y a toujours une perte considérable de poids.

L'évolution de la maladie est habituellement courte mais peut atteindre deux à trois semaines à l'échelle du troupeau (Martel et Michel, 1985).

I-V.2. Lésions

I-V.2.1. Lésions macroscopiques

On observe des lésions circulaires à oblongues. Elles sont très congestionnées, œdématisées, fermes et font saillies ou dessus des tissus environnants. La surface pleurale est épaissie et couverte de fibrine. Dans d'autres cas, les plèvres pariétales et viscérales sont accolées. On détecte même une effusion pleurale jaunâtre, claire entre la surface pleurale.

A la section le poumon est ferme et les septa interlobaires sont remplis par un exsudat œdémateux translucide. Les lobules pulmonaires sont rouge sombre. Un exsudat sanguinolent s'en écoule souvent. Dans certains cas, on arrive même à une coloration rougeâtre, pourpre et des aires d'affaissements pulmonaires qui vont jusqu'à l'atélectasie (Vestweber et al., 1990).

I-V.2.2. Lésions microscopiques

Il s'agit là d'une réponse inflammatoire suraiguë, avec production d'un exsudat cellulaire et protéique dans les alvéoles. Dans certaines zones, on a même une dégénérescence de la barrière alvéolaire et un passage de macrophages et de neutrophiles dans la lumière, ces derniers dégénèrent alors sous l'action de la leucotoxine et prennent un aspect fusiforme et tourbillonnant, d'où leur appellation cellule en «grain d'avoine». Les capillaires sont congestionnés, surtout dans les lobules contenant l'exsudat. Dans certaines alvéoles situées plus au centre du lobule, on trouve du liquide œdémateux, parfois mélangé à la fibrine. Alors que, dans les alvéoles plus en périphérie, on découvre des neutrophiles et des macrophages. Les régions les plus périphériques peuvent voir leur barrière alvéolaire complètement déformée

Il faut signaler que les septa interlobaires sont également le siège d'une violente inflammation. On y retrouve aussi macrophages et neutrophiles. Les canaux lymphatiques, les artères et les veines sont dilatés et certains engorgés. Dans la majorité des cas on retrouve une congestion et un épaissement de la plèvre (Vestweber et al., 1990).

I-V.3. Pathogénie

La maladie varie avec le mode de pénétration et l'activité de la bactérie, et avec la réceptivité du sujet. Au niveau du point de pénétration, il y a une culture locale avant l'envahissement de l'organisme par voie sanguine ou lymphatique. Cette culture se traduit par un œdème riche en leucocytes. Dans un organisme très réceptif, une bactérie virulente envahit très vite tout le système lymphatique et le sang, produisant une septicémie hémorragique (Curasson, 1947), qui est une forme suraiguë de la maladie, avec de temps à autre, une répercussion sur le système nerveux central par suite de la rupture de la barrière méningée. Le système vasculaire est congestionné et des pétéchies couvrant divers tissus (Davis et al., 1970). Avec une bactérie peu agressive, il peut n'y avoir qu'un accident au point d'inoculation, ou des localisations à distance, la culture locale provoquant de la nécrose, de la suppuration, de l'œdème pulmonaire, des ulcérations intestinales.

Dans la pasteurellose secondaire à une infection virale telle que la grippe à myxovirus para-influenza type III, l'effet cytopathogène viral sur les cellules des parois bronchiolites et alvéolaires abolissant les moyens de défense, permettrait l'apparition et la multiplication des bactéries (Gauthev, 1972). Les pasteurelles produisent des endotoxines qui seraient responsables des réactions locales (Curasson, 1947).

Bien qu'encore imprécise, cette pathogénie est donc fonction de la virulence des pasteurelles et de l'action de leurs toxines d'une part, de la réceptivité et de l'état de stress (Figure 2) de l'organisme d'autre part. Sa connaissance est importante puisqu'elle explique les différents modes d'évolution de l'infection.

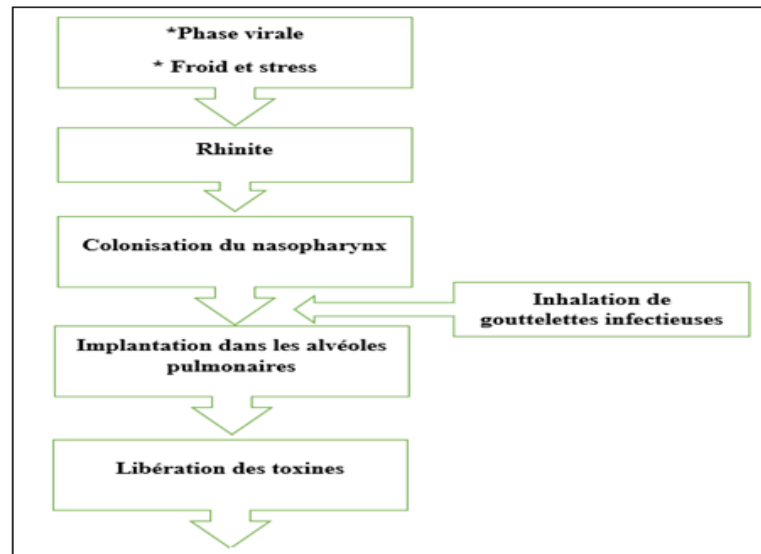


Figure 2 : Étapes de l'infection pulmonaire par les pasteurelles (Catherin, 2005)

I-V.4. Épidémiologie

I-V.4.1. Facteurs de risque

La bonne gestion des pasteurelloses implique avant toute vaccination une bonne maîtrise des facteurs de risque qui consistent à (Douart A., 2002) :

- * l'amélioration des conditions d'ambiance (extraction d'air et des vapeurs), mise en place d'entrée et de sortie d'air, limiter les courants d'air, bien protéger et ventiler le coin nurserie ;
- * la diminution de la densité animale ;
- * la limitation du mélange des animaux appartenant à des classes d'âge différentes ;
- * le vide sanitaire ;
- * la limitation l'achat d'animaux à l'extérieur ;
- * l'élimination des infectes chroniques.

I-V.4.2. Les voies d'entrées de la bactérie

I-V.4.2.1. Voie digestive

La voie digestive sert surtout de porte d'accès au rhino-pharynx nécessitant alors des lésions intestinales (Jacotot, 1927). D'où le rôle important des parasites intestinaux et des aliments traumatisants dans l'apparition de la maladie.

I-V.4.2.2. Voie respiratoire

Les pasteurelles vivent en saprophytes sur les voies respiratoires supérieures et à la faveur d'une baisse de résistance, envahissent les poumons puis passent dans le sang. Cette voie est la principale porte d'entrée (Basset, 1946 ; Davis et al, 1970).

I-V.4.3. Les espèces hôtes de la pasteurellose

La pasteurellose est commune à l'Homme et à de nombreux animaux dont les ruminants sauvages et domestiques. Les équidés, le porc, les rongeurs, les carnivores, les oiseaux etc....

I-V.4.3.1. Les ruminants

La maladie est présente chez les bovins, ovins et caprins soit sous forme septicémique aiguë chez les jeunes, soit sous forme d'une bronchopneumonie aiguë ou subaiguë chez les adultes.

Le Buffle en Asie du Sud et du Sud-Est, on a constaté que l'incidence naturelle de la maladie est beaucoup plus élevée chez les buffles que chez les bovins. Les buffles font surtout la forme aiguë œdémateuse ou "barbone" et la forme aiguë pulmonaire. Les symptômes sont plus graves que chez les bovins et la mortalité est plus forte.

Les Cervidés (cerfs, daims, rennes) et les bisons sont très sensibles et font la maladie de Bollinger".

Le Chameau et le Dromadaire : (Bain ; 1964) rapporte des cas de Pasteurellose enregistrés au Soudan sur le chameau qui passe pourtant pour résistant. De même en Syrie, la maladie "El guedda" des chameaux est une pasteurellose (Karrani and Hariharan, 1972).

Perreau, 1970, lors d'une enquête sérologique au Tchad, a constaté que l'infection pasteurellique qui domine chez les chameaux est celle de *Pasteurella multocida* type A, par la fréquence des anticorps spécifiques chez les chameaux adultes en bonne santé.

I.V.4.3.2. L'éléphant

Les éléphants souffrent aussi de pasteurellose (Bain, 1964).

I-V.4.3.3. Les équidés

La Pasteurellose est rare chez les équidés, bien qu'ils soient porteurs à 60 % quand elle se manifeste. La maladie apparaît comme une complication d'une autre maladie infectieuse et les signes sont ceux de la pasteurellose aiguë œdémateuse des bovins. Seulement, la mortalité est plus faible et la guérison spontanée possible. La Septicémie mortelle à *Pasteurella multocida*

notée chez le cheval et l'âne en Inde en serait un exemple. Au Mexique, une méningo-encéphalite à *Pasteurella haemolytica* est signalée chez le cheval, l'âne et le mulet (Blood et Henderson, 1976).

I-V.4.3.4. Le porc

40 % des porcs sont porteurs avec 85 % de porteurs sains. Mais la pasteurellose porcine pure est rare. La maladie fait donc suite à une infection bactérienne ou virale : exemples de la pneumonie enzootique ou de la peste porcine. La Pasteurellose évolue sous une forme septicémique chez les porcelets (Blood et Henderson, 1976) et sous forme d'une bronchopneumonie aiguë chez les adultes avec une nette tendance à la chronicité. Les sérotypes A et D de *Pasteurella multocida* sont en cause.

I-V.4.3.5. Les rongeurs

Tous sont sensibles à des degrés divers. Mais, les Léporidés le sont plus que les autres. Ils connaissent une forme septicémique rapidement mortelle et une forme aiguë à localisation pulmonaire qui tue également. Une forme subaiguë ou chronique provoque une rhinite ou des abcès surtout localisés sur la tête. Le Cobaye présente les mêmes signes que le lapin (Boileau, 1971). Bien que très souvent contaminé, Le rat ne fait très souvent que des formes subaiguës ou inapparentes. Ce sont des porteurs chroniques pouvant occasionner des enzooties. La souris très sensible à *P. multocida* meurt surtout de la forme septicémique qui est la manifestation habituelle.

I-V.4.3.6. Les carnivores

Sont très peu sensibles à l'infection pasteurellique (Blood et Henderson, 1976). Seuls des cas sporadiques et exceptionnels de manifestation clinique ont été signalés qui se caractérise par la formation d'abcès locaux. En revanche, les carnivores sont souvent responsables de la contamination humaine par griffade et morsure (Blood et Henderson, 1976 ; Manninger et Mocsy, 1959), car 70-80 % des chats et 30 % des chiens sont porteurs de germes. A Dakar, une étude faite par Doutreet coll sur le portage buccal de *Pasteurella multocida* chez les chats, a révélé l'existence de 30% de porteurs.

I.V.4.3.7. Les oiseaux

"Le Choléra aviaire" ou pasteurellose aviaire est une maladie infectieuse, contagieuse/virulente ou inoculable frappant toutes les espèces d'oiseaux, évoluant sous forme

septicémique et plus rarement chronique. Ce sont surtout les poulets et les canards qui manifestent le plus souvent des signes cliniques.

I.V.4.3.8. L'homme

L'homme est sensible à l'infection pasteurellique. La Pasteurellose est donc une zoonose mineure. On connaît deux groupes de manifestations cliniques :

- les formes généralisées d'allure septicémique actuellement en régression due à l'inhalation ou à l'ingestion de particules infectantes : poils d'oiseaux ou surtout plumes (d'où l'appellation ancienne "Maladie des plumeurs"), d'autres animaux porteurs, peuvent être des vecteurs.
- les formes localisées qui par contre sont en nette recrudescence, dues aux griffades, morsures d'animaux porteurs, aux piqûres de matériel souillé et d'évolution aiguë ou subaiguë.

I.V.4.4. Mode de transmission

I.V.4.4.1. Contagion directe

Elle peut se faire soit par inhalation de jetage projeté lors de la toux ou de l'expiration d'un malade ou d'un porteur (Gauthey, 1972 ; Blood et Henderson, 1976) soit par contact museau à museau. Selon (Perreau, 1976), les pasteurelles gagnent alors le pharynx et surtout la région amygdalienne puis passent dans le tube digestif ou dans les poumons. Cette contagion directe est maximale dans les locaux confinés et humides.

I-V.4.4.2. Contagion indirecte

Elle se fait par ingestion des éléments souillés par la salive, le jetage, les excréments des malades et porteurs sains, les litières, les eaux d'abreuvement les pâturages (dans les 24 heures) et des aliments. Elle peut se faire également par piquûre de tiques (Blood et Henderson, 1976) ou autres insectes ayant consommés le sang d'un malade : moustiques taons et même un ver comme la sangsue (Perreau, 1976).

I-V.4.5. Conditions écologiques de la circulation de la pasteurellose

I-V.4.5.1. La température

Le refroidissement brutal de l'air provoque une vasoconstriction au niveau de la muqueuse et une modification du surfactant, préjudiciables à l'activité macrophagique (Espinasse, 1981 ; Lomba, 1983). Par ailleurs, selon Olsen et al en 1982 cité par Nicks et al en 1986, une exposition

au froid diminue la concentration plasmatique en immunoglobulines maternelles chez le nouveau-né, vraisemblablement par réduction de la quantité de colostrum ingérée.

I-V.4.5.2. Variation du degré hygrométrique

L'humidité relative, renforce l'action du froid, elle entraîne une diminution des réactions de protection de l'épithélium cilié bronchique et des cellules immunocompétentes de l'épithélium alvéolaire (Espinasse, 1977 ; Lomba, 1983). De plus, une atmosphère humide tend à favoriser le développement de la population microbienne (Nicks et Dechamps, 1986).

En effet, d'après Jones cité par Nicks et al. (1986), la colonisation des voies respiratoires inférieures par *Mannheimia haemolytica* ne se produit que lorsque l'humidité relative est supérieure à 80%.

I-V.4.5.3. La ventilation

Elle permet le renouvellement de l'air à l'intérieur de l'étable. Elle a pour but de garder sous un seuil de tolérance la concentration de multiples agents, polluants en permanence l'air de l'étable (Nicks et al., 1986). Ainsi, les étables mal ventilées, la pollution chimique par les gaz est considérée comme facteur favorisant les affections respiratoires selon Anderson et Bates.

I-V.4.5.4. La charge microbienne

Elle traduit la pression infectieuse au sein de l'étable. L'importance de ce facteur réside dans le fait que les animaux cohabitent avec une importante population microbienne saprophyte, qui lorsqu'il dépasse un seuil de concentration, les animaux alors passent d'une situation « hors risque » à une situation « à risque » (Nicks et Dechamps, 1986).

Les désinfections insuffisantes renforcent la pollution biologique, cependant une bonne ventilation pourrait réduire la charge microbienne (Espinasse, 1981 ; Nicks and Dechamps, 1986).

I-V.4.5.5. La pollution chimique

La pollution par les gaz surtout l'ammoniac (NH_3) et le gaz carbonique (CO_2), a été incriminée comme facteur prédisposant les animaux aux affections respiratoires (Wizigmann, 1977 ; Lomba, 1983 ; Anonyme, 1987). En effet, selon Lomba 1983, le NH_3 provoque la destruction des cils et augmente la viscosité du mucus au niveau du tractus respiratoire.

I-V.4.6. Autres facteurs

I-V.4.6.1. L'alimentation

Elle varie en fonction de l'âge et du type d'élevage. Toutefois, Wizigmann et al. 1977, incriminent plus les erreurs de rationnement dans l'apparition de la maladie. En effet, Lomba

en 1983 rapporte que les maladies respiratoires chez les jeunes animaux sont beaucoup plus nombreuses chez ceux qui reçoivent de l'ensilage de maïs, que ceux qui reçoivent du bon foin. Par ailleurs Gross et al (1980) indiquent que les changements nutritionnels peuvent altérer les défenses de l'animal, le rendant ainsi sensible aux infections.

I-V.4.6.2. Mode d'élevage et taille du troupeau

Dans les élevages industriels pour la production de viande, les maladies respiratoires peuvent être considérées comme des maladies conditionnées par des facteurs prédisposant, représentés principalement par les transports à longue distance, le rassemblement et l'allotement d'animaux de différentes origines (Gagliardi & Carlotto, 1977). En effet, Lomba 1983 a observé que dans de telles conditions, une hiérarchie s'établit dans les lots par la lutte entre les animaux, entraînant ainsi un grand besoin d'oxygène, phénomène qui favorise l'hypoxie et l'acidose métabolique avec induction des maladies respiratoires.

D'autres facteurs de stress interviennent à savoir : le sevrage, l'écornage, la vaccination, la vermifugation et l'incompétence ou l'agressivité des soigneurs (Lomba, 1983)

I-V.5. Diagnostic

I-V.5.1. Diagnostic épidémio-clinique

Le diagnostic clinique, sur le terrain, s'appuie sur les commémoratifs, les symptômes et les lésions. En ce qui concerne les commémoratifs, ils convient de s'attacher aux circonstances qui font varier la gravité de la maladie.

I-V.5.2. Diagnostic biologique

Les examens de laboratoire sont indispensables afin d'établir un diagnostic précis car l'examen clinique ne permet d'aboutir qu'à une suspicion vue que les pasteurelles sont présentes naturellement dans les voies respiratoires hautes des ruminants. Les prélèvements à privilégier pour rechercher des pasteurelles ayant une action pathogène sur les poumons sont les ATT (Aspiration Trans-Trachéale), LBA (Liquide Broncho-Alvéolaire) et les écouvillons nasaux et poumon en cas de mort.

Les méthodes de détection directe utilisées reposent sur l'amplification d'ADN bactérien et sur l'isolement et l'identification des pasteurelles.

I-V.5.2.1. Polymérase chaine réaction (PCR)

La PCR (Polymérase Chaine Réaction) est une réaction d'amplification de l'ADN permettant d'obtenir des millions de copies d'un matériel génétique donné, au sein d'un échantillon. La matrice à amplifier peut-être de l'ADN directement extrait (ADN génomique) d'un échantillon

(organe, écouvillon, ...) ou de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par une réaction de rétro-transcription depuis un ARN extrait. Des PCR spécifiques pour la détection des deux bactéries incriminées lors d'une déclaration de la pasteurellose sont nécessaires :

* PCR en temps réel (test de screening), qui est une technique moléculaire très spécifique et sensible utilisant un couple d'amorces pour la mise en évidence d'un gène hautement conservé.

*PCR en temps réel avec la technologie Sybr®Green Cette méthode utilise le principe de la PCR en temps réel qui est une amélioration de la PCR classique (Polymérase Chain Réaction). Pour une PCR classique, la détection se fait à la fin de la PCR sur un gel d'agarose. Mais pour la PCR en temps réel, la détection se fait lors de l'hybridation ou de l'élongation, d'où l'utilisation de sonde ou intercalant Sybr Green (SG). Ce dernier utilisé dans notre étude, est peu fluorescent à l'état libre, il augmente d'une part en fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin et, d'autre part, il n'inhibe pas la réaction de PCR. L'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (amplicons). L'émission fluorescente décroît complètement lors de l'étape de dénaturation du cycle suivant.

Dans ce système, la spécificité de la réaction ne repose que sur la spécificité des amorces, sans contrôle de la taille des amplicons. Pour vérifier qu'un seul produit PCR a été amplifié, on réalise une courbe de fusion en fin de réaction. La technique utilisant le Sybr Green ne nécessite aucune expertise, elle est très économique et facile.

*PCR conventionnelle (test de confirmation), ciblant des gènes bien précis des deux bactéries incriminées lors de cette pathologie ; Pour *Mannheimia haemolytica*, les amorces ciblent le fragment de gène Sod A (Guenther et al., 2008) et pour *Pasteurella multocida*, la confirmation se fait par des amorces spécifiques citées par (Townsend et al., 2001).

Après extraction de l'ADN présent dans chaque type échantillon étudié, l'amplification est assurée par l'activité de l'ADN polymérase, les amorces et une sonde TaqMan marquée par un agent fluorescent dans le cas de la PCR en temps réel.

L'amplification de l'ADN se déroule en 3 phases :

- La phase de latence : certains composants ne se trouvent plus en quantité suffisante pour émettre un signal.

- La phase exponentielle : une fluorescence est détectée et son augmentation est chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent, dont proportionnelle à l'augmentation du produit PCR.
- La phase plateau : le signal émis et la concentration d'amplicon restent constants et épuisement des réactifs. L'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicon produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'acide nucléique.

I-V-5.2.2. Les méthodes bactériologiques, isolement, et identification des pasteurelles

La culture bactérienne

Le développement des pasteurelles exige le plus souvent un milieu enrichi, la gélose au sang (2-5% de sang frais ovin). Les colonies multipliées sont identifiées par plusieurs tests pour confirmer qu'il s'agit bien des *pasteurelles* (catalase, oxydase et autres).

La coloration gram

Les bactéries seront fixées sur une lame soit par fixation à l'éthanol 90° soit par passage de la lame dans la flamme, ensuite la lame est plongée dans un premier colorant. Ce colorant puissant, toxique et cancérogène va traverser les parois et membranes des bactéries et se fixer dans leurs cytoplasmes, après on fait un lavage subséquemment la lame est traitée au lugol en solution qui sert de mordant, il va renforcer le violet de gentiane contenu dans le cytoplasme des bactéries, après le temps d'incubation on réalise un rinçage ensuite on additionne une solution d'éthanol à 90°. Cette étape est décisive car permet de discriminer les bactéries Gram négatif des bactéries Gram positif. Ainsi, la bactérie gram - est donc décolorée. La lame, après avoir été rincée, est plongée brièvement dans un dernier colorant, la fuchsine, ce colorant traverse toutes les parois et membranes et va colorer en rose toutes les bactéries gram négatives. Enfin, la lame est rincée puis séchée pour observation sous un microscope optique à l'objectif x100 + huile à immersion (ZEISS, Allemagne).

La galerie biochimique

La galerie contient des microtubes contenant milieux et ou substrats déshydratés. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions

produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue soit à l'aide d'un manuel analytique soit à l'aide d'un logiciel d'identification apiweb (Biomerieux V 1.2.1, France).

I-V.5. 3. Diagnostic différentiel

Toutes les maladies respiratoires (Parainfluenza3, RSV, IBR, BVD et PPR) permettent de réaliser le diagnostic différentiel avec d'autres pneumopathies telles que : emphysème pulmonaire, bronchite vermineuse, échinococcose pulmonaire, tuberculose pulmonaire, etc et surtout avec la pasteurellose dont les lésions pulmonaires peuvent évoquer celles de la péripneumonie. Sauf que cette dernière est connue être d'une contagiosité plus marquée, d'une évolution plus rapide, de jetage plus abondant, d'atteinte pleurale plus discrète, d'aspect moins exsudatif, hépatisation pulmonaire plus massive, souvent apicale et symétrique avec lésions hémorragiques...) (Martel et al 2002).

I-V.6. Traitement

Il repose sur deux bases

* L'amélioration immédiate des conditions d'ambiance (aération, ventilation, vapeurs toxiques...), et la réduction des apports si l'alimentation trop riche est mise en cause.

* Un traitement médical :

- Des antibactériens à des doses bien précises
- Des anti-inflammatoires non stéroïdiens
- Des analeptiques cardio-respiratoires (théophylline, heptaminol...)
- Des fluidifiants bronchiques (dérivés de la terpine, bromhexine, aérosols...).

En pratique, les pasteurelles étant des pathogènes majeures dans le cas des pneumonies, une antibiothérapie les visant est donc justifiée même sans connaître précisément l'agent. La réalisation d'un antibiogramme est toujours intéressante, mais dans l'urgence elle n'est pas forcément possible avant la mise en place d'un traitement. De nombreuses familles d'antibiotiques sont utilisables contre les pasteurelles, on peut citer, les β -lactamines, les

céphalosporines, les macrolides, les phénicolés et les fluoroquinolones (Meyer, 2004). Il faut noter que *Pasteurella multocida* possède peu de résistances naturelles contre les antibiotiques. En parallèle, il est toujours intéressant de mettre en place un traitement symptomatique à l'aide d'anti-inflammatoires stéroïdiens ou non, de bronchodilatateurs et de modulateurs des sécrétions bronchiques.

I-V.7.Prevention

I-V.7.1. Conduite d'élevage

La gestion des mères est importante pour qu'elles soient dans un état sanitaire correct au vêlage (vaccination, faible charge parasitaire, préparation au vêlage et transition alimentaire), et puissent avoir un colostrum de qualité. Puis, il faudra surveiller la prise colostrale par les veaux. Au niveau de l'élevage, comme pour les autres maladies respiratoires, il faudra contrôler les paramètres d'ambiance et les paramètres qui peuvent entraîner du stress chez les animaux.

I-V.7.2. Médicale

Le développement de la maladie pouvant être dû à une rupture de l'équilibre suite à une atteinte virale, il faudra veiller à bien contrôler ces épisodes. La vaccination apparaît comme un moyen efficace de se prémunir contre l'infection par les pasteurelles. Buffard décrit que la vaccination permet d'avoir un gain de poids supérieur chez les individus vaccinés ainsi qu'une mortalité inférieure (Buffard, 2004). En France, les principaux vaccins disponibles sont :

- + Les vaccins inactivés qui sont les plus anciens et de moins en moins utilisés car contestés à cause de l'adjuvant qui aggrave les symptômes (Sustronck, 1997) ;

- + Les vaccins sous unités (leucotoxine et protéines surnageant lors de culture bactérienne) sont les vaccins les plus commercialisés et leur efficacité a été démontrée (O'Connor, 2001). La leucotoxine seule n'est pas protectrice, mais son adjonction permet de potentialiser l'efficacité de ces préparations.

I-VI. Généralités sur les antibactériens

I-VI.1. Résistance des pasteurelles aux antimicrobiens

La sensibilité ou la résistance d'une bactérie à un antimicrobien, dépend du succès ou de l'échec clinique du traitement. Pour être efficace, l'agent antimicrobien doit être présent au niveau du site d'infection en concentration suffisante et pour une durée suffisante, pour tuer ou inhiber le développement du germe (Prescott and Baggot, 1988).

Plusieurs études ont été consacrées à l'évaluation de la sensibilité des pasteurelles aux antimicrobiens. Hjerpe et Routenm (1976) ont rapporté que *Pasteurella multocida* et *Mannheimia haemolytica* sont habituellement sensibles aux sulfamides, pénicillines G, l'ampicilline, tétracyclines, néomycines, kanamycines, gentamicines, polymyxines.

Deux principales techniques sont utilisées :

- ❖ La technique de diffusion de l'antibiotique sur milieu gélosé, c'est la plus utilisée.
- ❖ La technique de dilution utilisant des tubes ou des plaques à cupules contenant différentes concentrations de l'antibiotique (McAllister, 1979). Selon cet auteur cette méthode permet une lecture directe de la CMI et une étude de la synergie entre deux ou plusieurs antibiotiques. Le principal inconvénient de cette méthode réside dans la contamination.

I-VI.2. Antibiorésistance

Hjerpe et Routen (1976) ont rapporté que les pasteurelles sont habituellement résistantes à la dihydrostreptomycine et à l'érythromycine, et sont toujours résistantes à la tylosine. Le problème de résistance multiple chez *Pasteurella multocida* et *Mannheimia haemolytica* a été également évoqué par (Chang et Carter 1976). L'usage abusif des antibiotiques dans le traitement des pneumonies chez les ruminants, a entraîné l'émergence de plusieurs souches de pasteurelles résistantes. Cette résistance est généralement d'origine plasmidique (Lees, 1991).

I-VI.3. Familles des antibiotiques et résistances

I-VI.3.1. Pénicillines

La famille des pénicillines renferme des antibiotiques naturels et semi-synthétiques, bactéricides, inhibant certaines enzymes bactériennes, essentiellement celle intervenant dans la synthèse des peptidoglycanes (Yao et Moellering, 1991). Le spectre d'activité des pénicillines est orienté sur les bactéries gram- et gram+, ainsi que les anaérobies. Mise à part de l'ampicilline, les autres pénicillines ont une bonne absorption intestinale (KeckG. et Meissonnier E., 1992).

Dans la famille des pénicillines, on distingue 4 groupes :

*Pénicillines naturelles : Pénicillines G ;

*Pénicillines acido-résistantes, habituellement administrées par voie orale ;

*Pénicillines résistantes aux pénicillinase : oxacilline, méthicilline.....etc ;

*Pénicillines à large spectre : Ampicilline, Amoxicilline...etc (Huber, 1988) Concernant l'activité des pénicillines, il est généralement admis qu'elles sont efficaces sur les germes sensibles mais ayant une concentration minimale inhibitrice (CMI) $< 1\mu\text{g/ml}$. Les germes ayant une CMI $> 16\mu\text{g/ml}$ sont considérés comme résistants. Cette résistance est en relation avec les β -lactamases. Par ailleurs pour les bactéries gram-, une résistance de type plasmidique est assez fréquente (Prescott et Baggot, 1988).

I-VI.3.2. Céphalosporines

Elles ont un mécanisme d'action similaire à celui des pénicillines. Elles sont caractérisées par leur résistance aux pénicillinases des staphylocoques (Prescott et Baggot, 1988).

*la première génération des céphalosporines a un spectre d'action orienté surtout sur les bactéries gram+ et de façon importante sur les gram-.

*le seconde génération comprend des antibiotiques qui sont stables vis-à-vis de certains β -lactamases produites par les gram-.

*La troisième génération est constituée de composés ayant une activité sur les Enterobacteriaceae et *P. aeruginosa* (ceftiofur). Cependant, ils ne sont pas très actifs sur les gram+ (Yao et Moellering, 1991).

I-VI.3.3. Aminoglycosides

Les aminoglycosides ont un spectre d'activité large. Ils sont efficaces sur les bactéries gram-aérobies et sur les mycoplasmes. Ce sont des antibiotiques bactéricides, agissant en se combinant à la sous unité 30s ribosomiale (Prescott et Baggot, 1988 ; Yao et Moellering, 1991).

La gentamicine est l'antibiotique le plus actif et le plus représentatif de la famille, elle est produite par *Microspora purpurea*. La plupart des germes résistants à la gentamicine font intervenir une enzyme codée par le plasmide : la phosphotransférase (Prescott and Baggot, 1988).

Les mêmes auteurs rapportent que seuls les germes ayant une sensibilité in vitro avec une CMI $< 4\mu\text{g}:\text{ml}$, sont sensibles à la gentamicine. Les aminoglycosides sont faiblement absorbés au niveau du tube digestif et sont doués d'une grande néphrotoxicité (Huber, 1988).

I-VI.3.4. Tétracyclines

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques, ils inhibent la synthèse protéique en se liant à la sous-unité 30s ribosomale. Ils sont partiellement absorbés au niveau du tube digestif, métabolisés au niveau du foie et concentrés dans la bile (Prescott et Baggot, 1988). Une bactérie est considérée résistante aux tétracyclines si la CMI de l'antibiotique considéré dépasse 8µg/ml. La résistance aux tétracyclines commence devenir problématique vu l'usage abusif qui en est fait, le type de résistance le plus répandu est de type plasmidique (Huber, 1988).

I-VI.3.5. Lincosamides et macrolides

I-VI.3.5.1. Lincosamides

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques, ils inhibent la synthèse protéique en se combinant à la sous unité 50S du ribosome. La plupart des bactéries gram- sont résistantes aux lincosamides du fait que l'imperméabilité de la bactérie et de la méthylation du site ribosomal au niveau des lincosamides (Prescott et Baggot, 1988).

Ils ont un spectre d'activité dirigés essentiellement contre les gram+. La clindamycine est l'un des antibiotiques les plus actifs contre *Clostridium perfringens* (Yao et Moellering, 1991).

I-VI.3.5.2. Macrolides

Ils sont bactériostatiques et ont une bonne absorption digestive. Ils comprennent : l'érythromycine, l'oléandomycine, la spiramycine, la tylosine et klajosamycine (KeckG. and Meissonnier E., 1992).

La résistance à l'érythromycine résulte de la méthylation du site ribosomal, et il existe une résistance croisée avec les lincosamides et d'autres macrolides (Prescott and Baggot, 1988).

I-VI.4. Antimicrobiens de synthèse

I-VI.4.1. Quinolones

Ce sont des antibactériens bactéricides à faible dose et de façon paradoxale, bactériostatiques à forte dose (Keck. G and Meissonnier E., 1992). La première génération a un spectre d'activité dirigé surtout contre les Enterobactériacés, particulièrement *E. Coli*. Elle comprend, l'acide nalidixique, l'acide oxolinique et la fluméquine. La seconde génération constituée de fluoroquinolones et aux mycoplasmes. Elle comprend deux produits : la danofloxacin et l'enrofloxacin (Chappel, 1990).

I-VI.4.2. Sulfamides et triméthoprim

Les sulfamides sont des antimicrobiens de synthèse, bactériostatiques, ils interfèrent avec la synthèse de l'acide folique au niveau de la bactérie (Bevill, 1988). Ils ont un large spectre, inhibant les bactéries, les chlamydiae, les toxoplasmes et les coccidies. En effet, les sulfamides sont actifs sur les gram⁺ et sur la plupart des gram⁻, surtout les entérobactéries.

Les sulfamides sont largement utilisés en pratiques courante, de ce fait, de nombreux phénomènes de résistance ont été rapportés (Bevill, 1988). Par ailleurs, selon ce même auteur, la résistance aux sulfamides résulte soit de l'adaptation enzymatique ou du transfert du matériel extra-chromosomique.

Le triméthoprim est un dérivé de la diaminopyrimidine, largement utilisé en association avec les sulfamides. Il est bactériostatique et inhibe l'enzyme dihydrofolate réductase (Yao and Moellering, 1991). L'association triméthoprim/Sulfamethaxazole a permis l'élargissement du spectre d'activité de ces substances. En effet, cette association a une action bactéricide contre les gram⁺ et les gram⁻ aérobies et contre une grande proportion des anaérobies. Les bactéries sont considérées sensibles, si la CMI de cette association est < 0,5/9,5µg/ml (Prescott et Baggot, 1988).

I-VI.4.3. Nitrofuranes et dérivés

Ce sont des antimicrobiens, bactériostatiques à large spectre surtout vis-à-vis des germes à gram⁻ (Keck G. and Meissonnier E., 1992). Ils sont également actifs sur quelques protozoaires et champignons (Huber, 1988). Keck G. et Meissonnier E., 1992 distinguent 4 groupes : Antiseptiques urinaires avec absorption et élimination urinaire rapide ex : nitrofurantoin.

- ❖ Antiseptiques digestifs très peu absorbés par voie digestive, avec un risque d'intoxication lors de surdosage ex : furazolidone, nitrofurant, furaltadone.
- ❖ Antiseptiques externes ex : furazolidone, nitrofurant.
- ❖ Anti-infectieux général, utilisé en ichthyopathologie ex nifurpirinol

I-VII. Colistine et le gène mcr-1

La colistine est un antibiotique de la famille des polymyxines utilisé régulièrement en médecine vétérinaire depuis les années 1950 selon ANSES 2017, notamment dans les filières animales de

production. C'est un important médicament de dernier recours contre les bactéries gram-négatives multirésistantes (MDR). La colistine interagit sur des groupements phosphate des lipopolysaccharides (LPS) présentes sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Ce premier mécanisme de résistance à la colistine transférable fait intervenir un gène nommé *mcr-1*.

Le gène de résistance à la colistine à médiation plasmidique est une enzyme PEtN transférase qui transfère enzymatiquement le PEtN au lipide A (Abdul Momin et al, 2017 ; Esposito et al., 2017 ; Poirel, Jayol, Nordmann, et al., 2017). Ceci, entraîne une réduction des charges anioniques sur le lipide A, empêchant interactions électrostatiques avec les molécules de polypeptides cationiques telles que les polymyxines (colistine et polymyxine B), conduisant à la colistine résistance (Tendon, Poirel, & Nordmann, 2017).

Sa détection est réalisée en utilisant l'intercalant Sybr Green qui a le même principe que le bromure d'éthidium. Ce colorant vient s'insérer au niveau des chaînes doubles brin d'ADN et il ne devient fluorescent que s'il se lie à l'ADN double brin. Contrairement à la chimie Taqman, il n'est nul besoin de concevoir une sonde. En contrepartie, la fluorescence mesurée peut provenir de produit d'amplification non spécifique. Il convient donc de s'assurer de la spécificité des produits de PCR. Il est conseillé, de faire migrer sur gel les produits de PCR afin de s'assurer que la taille du fragment amplifié correspond à ce qui est attendu.

I-VIII. Principes de Production et contrôles des vaccins bactériens inactivés

Selon le guide pour l'élaboration des monographies des vaccins pour usage vétérinaire (Pharmacopée Européenne Edition 2008), le vaccin inactivé est une préparation d'une/ ou plusieurs souche(s) appropriée(s) de bactérie(s) inactivée(s) en maintenant des propriétés immunogènes appropriées.

I-IX. Exigences réglementaires

L'un des grands enjeux de la sécurité vaccinale est de garantir la qualité et l'innocuité des vaccins, depuis le stade du développement, en passant par les essais cliniques, la fabrication, le contrôle de la qualité et la distribution, jusqu'au point d'utilisation finale, où de bonnes pratiques de vaccination doivent être assurées. En plus des tests très poussés, la réglementation en matière de vaccins comporte plusieurs autres méthodes destinées à garantir leur qualité et leur innocuité. Il s'agit notamment de la caractérisation du matériel du départ, l'établissement

de banques de germes, de systèmes de lots de semence, de l'application des principes régissant les bonnes pratiques de fabrication, de la mise en circulation indépendante de vaccins lot par lot, par des autorités nationales de réglementation pleinement opérationnelles, ainsi que d'une surveillance pré et post commercialisation intensifiée, des manifestations indésirables éventuelles pouvant faire suite à l'administration de ces vaccins. Ces méthodes contribuent à garantir la qualité, l'efficacité et l'innocuité des vaccins.

I-X. Validation des méthodes de contrôle des vaccins

La norme de l'OIE pour la gestion et les techniques exigeantes pour la réalisation d'essais, pour les maladies (Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2008), précisent que, les méthodes d'essai et les procédures doivent être appropriées, pour des applications de diagnostics spécifiques, pour que les résultats des tests peuvent être pertinents. En d'autres termes, l'essai doit être « apte à l'usage » (OIE, 2013). L'évaluation qualitative et quantitative de la capacité d'un résultat de test positif ou négatif, pour prédire avec précision l'état d'exposition de l'animal ou d'une population d'animaux, est la considération ultime de la validation du test. Cette capacité dépend de la création d'un essai soigneusement optimisé et normalisé, par accumulation des données de validation, qui assure la confiance dans le dosage et l'aptitude à l'effectuer, en fonction de but recherché. Afin de veiller à ce que les résultats des tests fournissent des inférences diagnostiques utiles sur des animaux ou des populations, à l'égard de l'objectif visé, le processus de validation englobe le développement initial et la documentation sur la performance du test, ainsi que l'évaluation continue, du contrôle de la qualité et d'assurance qualité (OIE, 2013).

I-XI. Vaccination et vaccins disponibles

L'importance sanitaire et économique des pasteurelloses est non négligeable. Les pasteurelloses sont responsables de nombreuses affections aiguës parfois mortelles le taux de mortalité peut atteindre 20% et la morbidité peut atteindre 50% selon la SNGTV (société nationale des groupements techniques vétérinaires) ; l'affection peut aussi évoluer vers la chronicité et parfois même peut induire de nombreux retard de croissance. Sur le marché on note la présence de 3 types de vaccin :

*Vaccins inactivés à base de corps bactériens entiers

*Vaccins anti-leucotoxine

*Vaccins de nouvelle génération IRP.

I-XII. Nouvelle technologie de production de vaccin contre la pasteurellose à partir des OMV

Les vésicules membranaires externes (OMV) sont petites, sphérique (100-300 nm) libérées dans le milieu extracellulaire par les vésicules de la membrane externe des bactéries Gram négatif (Beveridge, 1999). Plusieurs espèces bactériennes ont été signalées comme produisant des OMV, telles que *Escherichia coli* (McBroom and Kuehn, 2007 ; Schwechheimer et Kuehn, 2015), *Pseudomonas aeruginosa* (Bauman and K. Kuehn, 2006), *Shigella* sp. (Kadurugamuwa and Beveridge, 1999), *Salmonella* sp (Elhenawy et al., 2016), *Helicobacter pylori* (Fiocca et al., 1999 ; Turner et al., 2015), *Campylobacter jejuni* (Lindmark et al., 2009 ; Elmi et al., 2012), *Borrelia burgdorferi* (Dorward et al., 1991 ; Shoberg and Thomas, 1993), *Vibrio* sp. (Chatterjee et Chaudhuri, 2011) et *Neisseria* sp. (Devoe and Gilchrist, 1973 ; Pettit and Judd, 1992). Ils portent des lipopolysaccharides (LPS), des phospholipides, des peptidoglycanes, des protéines de la membrane externe (OMP), des composants de la paroi cellulaire, des protéines (périplasmique, cytoplasmique et membranaire), des acides nucléiques (ADN, ARN), des métabolites ioniques et des molécules de signalisation en tant que cargaison (Lindmark et al., 2009 ; Koeppen et al., 2016 ; Vanaja et al. 2016). En raison de la nature du transfert de la cargaison, elles devraient jouer un rôle dans l'adhérence bactérienne à l'agent antibactérien. Ils sont également impliqués dans les réponses au stress, ce qui implique la formation d'un biofilm, administration inter- et intraspécifique de molécules résistantes aux antibiotiques et modulation de l'immunité de l'hôte réponse. La capacité des OMV à transférer des molécules biologiques à la cellule hôte, rend leur production utile parmi les cellules hôtes Bactéries Gram-négatives. En dehors de leur rôle dans le développement de la communication bactérienne, transfert des facteurs de virulence sous forme de cargaisons vers les OMV, elles améliorent également la survie bactérienne à l'intérieur de l'hôte (Ellis and Kuehn, 2010 ; Chattopadhyay and Jaganandham, 2015). Le développement des systèmes sécrétoires (I - VI) chez les bactéries Gram-négatives a contribué à la sécrétion de facteurs de virulence dans l'ensemble de la bactérie dans l'espace extracellulaire. Sécrétées en tant qu'entités distinctes, transfert de facteurs de virulence, de molécules d'adhésion à médiation OMV, toxines et autres composés immunomodulateurs, elles constituent un système de sécrétion distinct, qui fonctionne en mode Gram-négatif des bactéries pour accéder aux tissus et à la circulation sanguine de l'hôte.

Chapitre II-
Matériel & Méthodes

II-I. Échantillons étudiés

Un nombre total de cent soixante-deux échantillons (121 écouvillons nasaux et 41 poumons) ont été prélevés chez différentes espèces de ruminants (bovins, ovins et caprins), présentant des signes cliniques respiratoires rappelant la maladie de la pasteurellose, durant la période janvier 2015 à Décembre 2017 et ce dans six différentes régions du Maroc (Figure 3).

Les échantillons identifiés, accompagnés de leurs fiches de prélèvements (Annexe 1), ont été acheminés à Biopharma sous régime de froid.

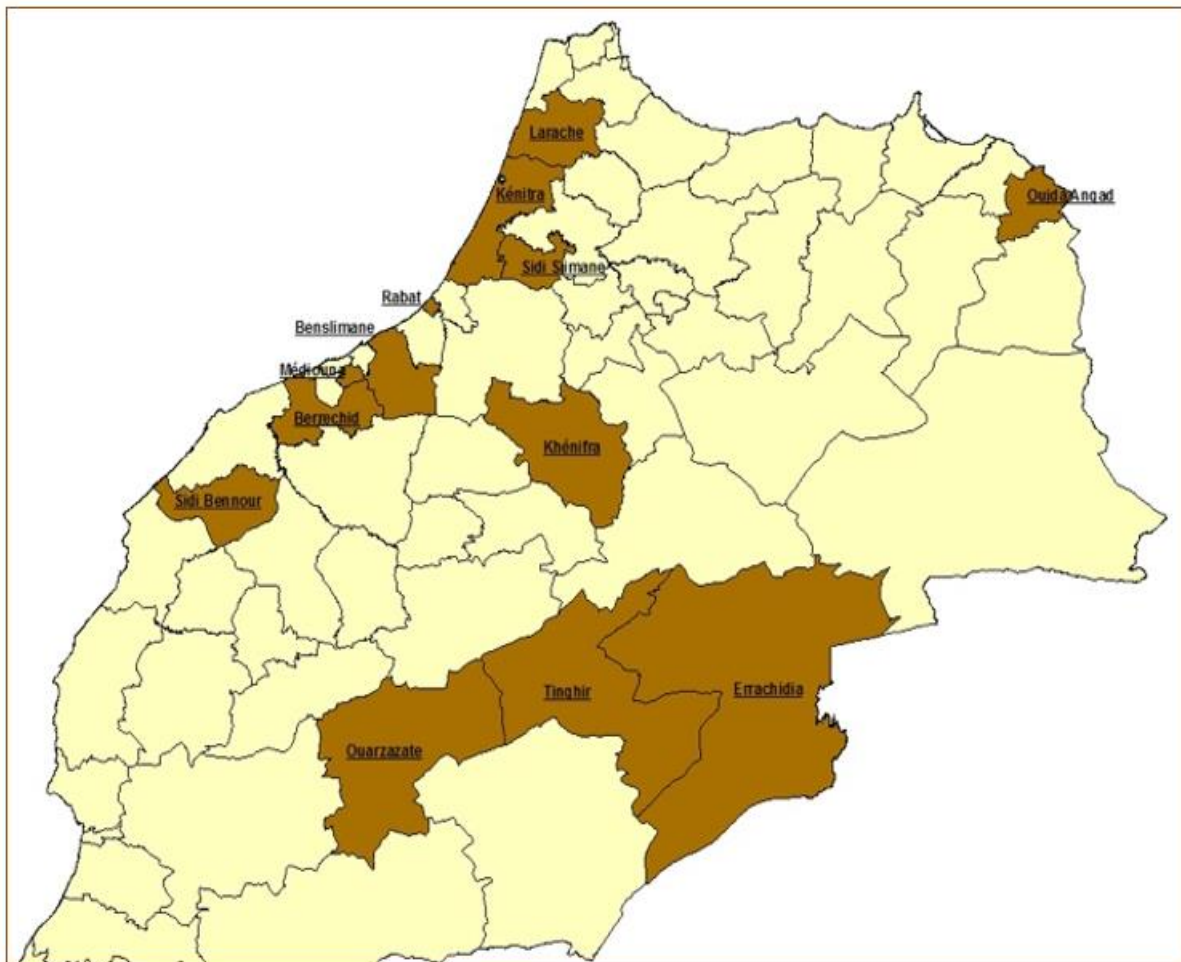


Figure 3 : Distribution géographique des échantillons prélevés lors de l'étude

II-II. Test de dépistage par PCR en temps réel

II-II.1. Préparation des échantillons

Dès leur réception, les écouvillons nasaux ont été placés dans un milieu de culture à base de Bouillon cœur cerveau (BCC), puis incubés à 37°C pendant une nuit, les poumons ont été

broyés dans des tubes stériles à l'aide d'un broyeur-Homogénéiseur automatique à billes (Bertin Technologies, France). Après centrifugations à 8000xg pendant 10 min à 4°C, le surnageant estensemencé dans le BCC pendant une nuit. Les cultures issues des deux différents types d'échantillons font l'objet d'une extraction de l'acide nucléique (ADN).

II-II.2. Extraction de l'acide nucléique

L'extraction des bactéries (*MH* & *PM*) responsables des signes respiratoires comprend quatre étapes : La lyse d'échantillon qui consiste à mélanger les échantillons avec un tampon de lyse, qui permet de rompre et dénaturer tous les constituants cellulaires à savoir les membranes, en libérant le contenu suivant : ADN, protéines, et les lipides. Suivie par la précipitation qui se fait par le biais de l'éthanol, qui est généralement utilisé pour concentrer les acides nucléiques et les séparer des protéines et lipides. Ensuite un lavage qui a pour but de purifier l'acide nucléique, suivie d'un séchage, permettant ainsi d'éliminer les traces d'éthanol. Et enfin l'ajout de l'élution buffer pour la récupération de l'acide nucléique.

L'extraction a été réalisée par le kit Machery Nagel Tissue (Machery-Nagel, Germany) (Annexe 2) sur tous les prélèvements préalablement traités suivant les instructions du fournisseur. La souche de référence *Pasteurella multocida* 11039 (DPIV, Rabat) a été utilisée comme contrôle positif d'extraction tandis que l'eau grade PCR a été utilisée comme contrôle négatif dans toutes les réactions de PCR.

II-II.3. Amplification

La matrice des ADNs génomiques directement extraits des différents échantillons prélevés (organe, écouvillon, ...) ont fait l'objet d'une PCR en temps réel spécifique aux espèces *Mannheimia haemolytica* et *pasteurella multocida*. L'amplification a été réalisée à l'aide d'une paire d'oligo-nucléotides (amorces sens et anti sens), et une sonde oligo-nucléotidique (TaqMan) marquée par un fluorochrome, en utilisant le kit VetMax TM triplex *pasteurella multocida* & *Mannheimia haemolytica* (Thermofisher Scientific, USA).

Un volume de 5 µl d'ADN extrait a été utilisé dans un volume réactionnel total de 20 µL. Le test a été effectué sur l'appareil smart cycler (Cepheid, USA) selon le cycle de température suivant : activation de l'ADN polymérase à 95°C pendant 15 minutes, suivie de 45 cycles d'amplification (une dénaturation à 94 ° C pendant 1 minute et hybridation et élongation à 60°C pendant 90 secondes).

II-III. Isolement et identification bactérienne

II-III.1. Culture sur gélose au sang et MacConkey

Les échantillons positifs par PCR en temps réel (test de dépistage) sont cultivés sur milieu spécifique de gélose au sang (2-5% de sang frais ovin). (Gentry et al., 1987, Anigen et al., 1999).

Cette étape est effectuée comme suit, après un enrichissement des poumons broyés et écouvillons nasaux dans le BCC (Bouillon de cœur cerveau), on incube à 37°C pendant 24h. Ensuite, nous ensemençons dans de la gélose au sang tout en utilisant des témoins positifs et négatif pour valider la réaction. Après ensemencement, les boîtes ont été incubé à 37°C pendant 18-24h dans une ambiance idéale de micro-aérophilie qui pourrait se prolonger jusqu'à 48h. Les colonies évocatrices de *Pasteurella* sont soumises à plusieurs tests, à savoir : une coloration de Gram (Figure 4), un test de catalase et d'oxydase et une croissance sur gélose MacConkey pour une identification plus poussée (Quinn et al., 1994).

II-III.2. Coloration gram

Après fixation des bactéries sur une lame (deux méthodes possibles : fixation à l'éthanol à 90° (5 minutes) ou par passage de la lame dans la flamme, dite frottis) :

- La lame est plongée dans un premier colorant : le violet de gentiane (**1 minute**). Le violet de gentiane est un colorant puissant, (toxique et cancérigène). Il va traverser les parois et membranes des bactéries et se fixer dans leurs cytoplasmes. Ainsi à cette étape toutes les cellules sont colorées en violet.
- La lame est ensuite traitée au lugol (diiodé) en solution qui sert de mordant (Minimum 1min) : il va renforcer le violet de gentiane contenu dans le cytoplasme des bactéries. Le violet de gentiane est chassé par la solution d'éthanol à 90°. Cette étape est cruciale et doit être faite rapidement, car elle permet de discriminer les bactéries Gram négatif des bactéries Gram positif. Le principe est le suivant : les bactéries Gram négatif possèdent une paroi pauvre en peptidoglycane, composant qui en raison de sa faible quantité va permettre à l'alcool d'emporter le violet de gentiane, celui-ci disparaissant du cytoplasme. La bactérie est donc décolorée.
- La lame, après avoir été rincée, est plongée brièvement dans un deuxième colorant, la fuchsine (30 secondes). Ce colorant traverse toutes les parois et membranes et va colorer

en rose toutes les bactéries qui ont été décolorées durant l'étape précédente ; les bactéries Gram positif étant colorées en violet (plus sombre) n'apparaîtront pas rose (plus clair).

La lame est ensuite récupérée, rincée et séchée, puis observée au microscope optique généralement à l'objectif x100. Les bactéries *Gram négatif* apparaîtront en rose. L'observation de leur couleur est généralement accompagnée de descriptions structurelles (ex. bacille ou coque).

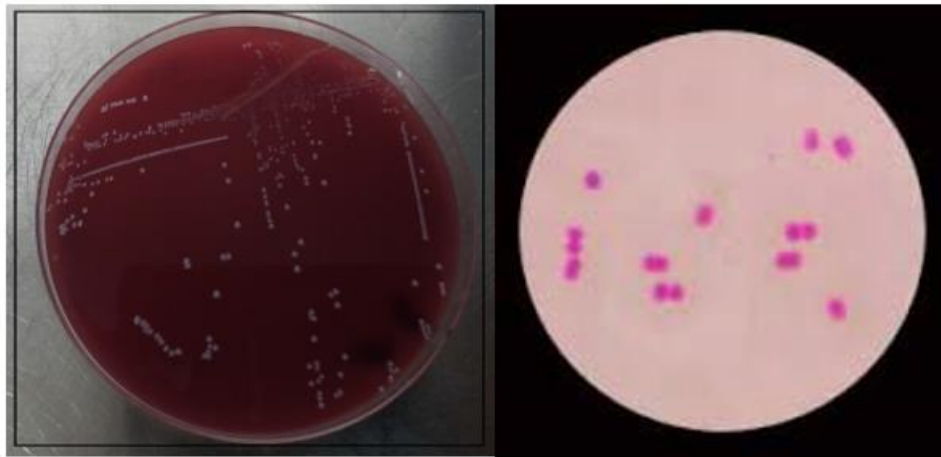


Figure 4 : croissance des colonies sur gélose au sang et identification par coloration gram

II-III.3. Test de catalase

Une catalase est une oxydo-réductase hémunique qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène : $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$.

S'il y a présence d'effervescence, on dit que la bactérie est catalase+, pas d'effervescence on parle d'une réaction catalase (Figure 5).

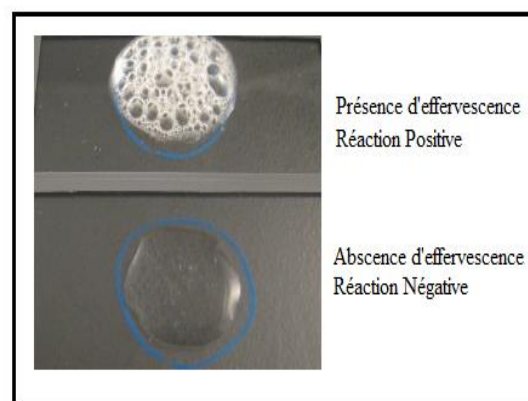


Figure 5 : Réaction de catalase

II-III.4. Test d'oxydase

La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bactéries. Le chlorhydrate ou le N-diméthylparaphénylène diamine (PDA) est utilisé comme réactif, généralement imprégné sur des disques (disques oxydases). Un de ces disques est placé sur une lame et une colonie y est déposée avec une pipette pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette (Figure 6) au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase + et elle possède le cytochrome oxydase. Et rien n'apparaît, cela signifie que la bactérie est oxydase- et qu'elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).



Figure 6 : Réaction d'oxydase

II-IV. Etude histologique des poumons d'animaux morts par la pasteurellose

Des tissus pulmonaires présentant des modifications macroscopiques sont prélevés sur 10 animaux (6 bovins et 4 ovins) et fixés dans du formol à tampon neutre (FBN) à 10% pour des examens histopathologies. Des tissus fixés à 10% de NBF sont traités pour un examen d'histopathologie selon les méthodes standard. Ils sont déshydratés dans des bains d'alcool en série et inclus dans de la cire de paraffine. Des coupes de cinq μm d'épaisseur sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine et examinées au microscope optique pour rechercher des modifications histopathologiques.

II-V. Test de confirmation des isolats par PCR conventionnelle

II-V.1. Confirmation de *Mannheimia haemolytica*

La réaction de PCR pour *Mannheimia haemolytica* a été réalisée dans un volume total de 25 μl en utilisant le kit Taq DNA recombinant (Invitrogen, Life technologies), contenant 0,1 μM de chaque amorce pour la détection du gène sodA, dNTP 10 mM, tampon PCR 10X, MgCl_2 50 mM, 5 U/ μl d'ADN polymérase Taq et 5 μL de l'ADN extrait. L'ADN a été amplifié dans le

thermocycleur TC512 (Techne, USA), dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation primaire à 94 ° C pendant 3 min suivie de 35 cycles en utilisant le protocole suivant : dénaturation initiale à 94 ° C pendant 45 sec, hybridation à 64 ° C pendant 30 secondes et extension à 72 ° C pendant 90 secondes, suivies de 10 minutes à 72 ° C.

II-V.2. Confirmation de *Pasteurella multocida*

Le test PCR pour *Pasteurella multocida* a été confirmé par le même test avec des amorces spécifiques décrites par (Townsend et al, 2001) pour la détection du gène KMT1 qui détecte tous les sérogroupes (réaction de groupe), et aussi ceux qui détecte les types capsulaires (A, B, D, E et F) pour les gènes (hyaD-hyaC, bcbD, dcb F, ecbJ et fcbD) respectivement. Cette analyse a été réalisé dans un volume total de 25µl selon le programme d'amplification suivant : Activation de l'ADN polymérase 95 ° C pendant 3 minutes suivie de 30 cycles d'amplification (94 ° C pendant 45 secondes, 55 ° C pendant 30 secondes et 72 ° C pendant 1 min 30 secondes) suivi de 10 minutes à 72 ° C.

Les produits de PCR ont été analysés sur un gel d'agarose à 2% coloré avec Sybr safe (Invitrogen, USA). Les fragments d'ADN ont été visualisés par l'instrument Omega Lum G (Aplegen, USA). Une échelle d'ADN de 100 paires de bases (Invitrogen, USA) a été utilisée pour déterminer la taille des fragments amplifiés (amplicon 143 pb, 460 pb et 1044 pb) de *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* (PM) et PM séro groupe A respectivement.

II-VI. Étude du pouvoir pathogène sur souris

Pour confirmer le pouvoir toxique des souches isolées on a réalisé l'inoculation sur les souris et leur suivi afin d'estimer le taux mortalité causé par les bactéries en question.

II-VI.1. Dénombrement

Les souches identifiées ont été inoculées dans un bouillon d'infusion de cœur cervelle (BCC) et incubées dans un incubateur avec agitation (100 tr/min) à 37 ° C pendant une nuit. Le nombre d'unités formant des colonies (CFU / ml) d'inoculum a été calculé par la méthode de la plaque d'étalement dans des plaques de BCC Agar (Goldman E, Green LH., 2008). Pour déterminer le nombre d'UFC, la méthode utilisée est celle de dénombrement en masse tout d'abord on prépare des dilutions (Figure 7) en série allant de 10^{-1} à 10^{-10} de la suspension bactérienne à dénombrer, alors 1ml de chaque dilution est ajouté à 9 ml de gélose déjà préparer et mis à une température comprise entre 48°C et 50°C puis bien homogénéiser et couler sur boites de pétri (2 boites /Dilution).

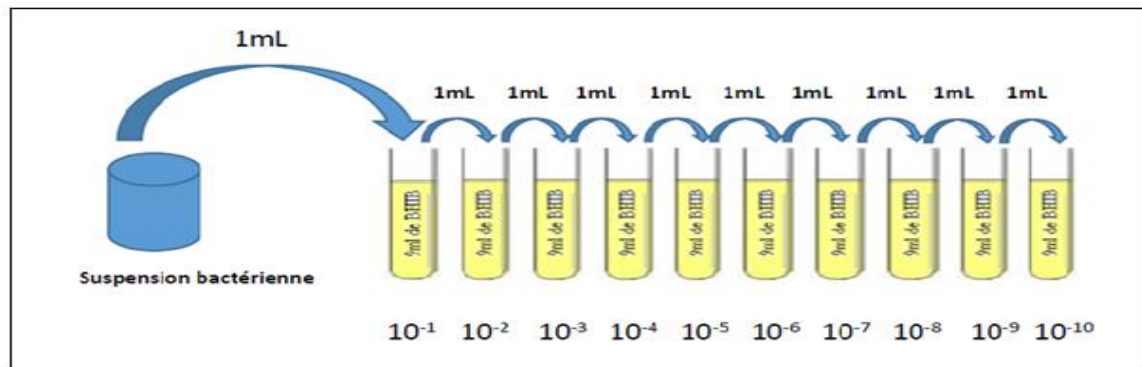


Figure 7 : Méthode de préparation des dilutions successives pour dénombrement en masse

Ensuite, les boîtes ont été placées dans l'étuve 37°C pendant 24h et à la fin de la durée d'incubation, le dénombrement a été réalisé à l'aide d'un compteur de colonies (Figure 8).

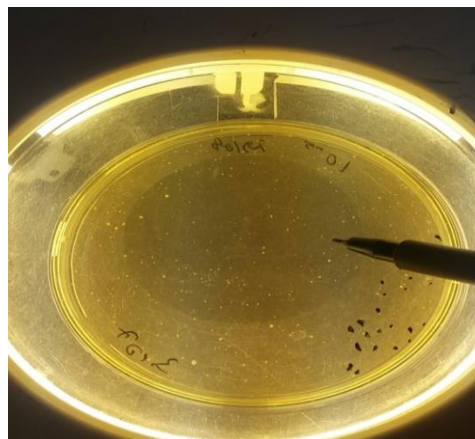


Figure 8 : Comptage des colonies

Seules les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 10 et 300 qui sont pris en considération. En effet, au-dessus de 300 UFC, les colonies sont indénombrables et en dessous de 10 elles sont peu nombreuses pour être dénombré selon la norme ISO 7218 version 2013.

La formule suivante a été utilisée en y apportant le nombre de colonies déterminé :

$$N = \frac{\Sigma c}{(V \times 1,1d)}$$

Avec :

N : Nombre d'UFC par ml de produit initial ;

Σ colonies : Sommes des colonies des 2 boîtes retenues ;

V : Volume de solution déposé (1ml) ;

d : facteur de la première dilution retenue avec l'inoculum moins dilué.

II-VI.2. Test sur souris

Des groupes de 5 souris (de sexe mâle, poids moyen de 22g) sont inoculés par les souches isolées lors de cette étude et ceci par voie intrapéritonéale (Figure 9). Un groupe de souris entretenu dans les mêmes conditions que les autres a été utilisé en tant que groupe témoin et a reçu par la même voie d'injection uniquement du bouillon BCC frais. Les souris ont été suivies pendant 24 heures en vérifiant leur état général (signes cliniques) et mortalités (Annexe n°7).



Figure 9 : Étude de pouvoir pathogène et inoculation par voie intrapéritonéale sur souris

II-VI.3. Ré-isolément à partir des organes des souris mortes

Après autopsie des souris mortes ; des organes ont été prélevés pour ré isoler la bactérie responsable de la septicémie (Figure 10), on procède au broyage de ces organes (rate, poumon et foie) dans BCC à l'aide d'un broyeur automatique utilisant les billes ensuite on passe à l'étape de pré-enrichissement dans BCC pendant une nuit à 37°C, après on procède à l'extraction et amplification de l'ADN extrait. Des échantillons de foie et de poumon provenant des souris mortes sont striés sur de la gélose au sang et incubés comme décrit ci-dessus pour l'isolement bactérien. De plus, les colonies sont confirmées par PCR conventionnelle spécifique de *Mannheimia haemolytica* (Guenther et al., 2008) et de *Pasteurella multocida* (Townsend et al., 2001).



Figure 10 : Autopsie des souris mortes

II-VII. Antibiogramme

II-VII.1. Test de diffusion sur disque

L'antibiogramme des isolats est effectué à l'aide de la méthode de diffusion sur disque de Kirby-Bauer, décrite au chapitre 2.1.1.1 du manuel « Méthodes de laboratoire pour les antibiogrammes bactériens » (Hudzicki, 2009). Les suspensions bactériennes sont préparées, nous avons laissé le produit agir pendant quelques minutes, puis nous l'avons mis sur une plaque de gélose Mueller-Hinton (Oxoid, UK), le volume excédentaire est enlevé, les plaques sont séchées pendant cinq minutes et les disques antimicrobiens sont placés à environ 2 cm de distance sur la surface. Ils sont ensuite incubés à 37 °C pendant la nuit. Les zones d'inhibition sont mesurées au millimètre près avec une règle (Hudzicki, 2009). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Escherichia coli* ATCC 25922 utilisés pour le contrôle de la qualité de la fertilité (Bauer et al., 1966), brièvement chacun des isolats est soumis à un panel de treize antibiotiques recommandés par le manuel de l'oie (Oie, 2018) (Tableau 1) : Amoxicilline (25µg), Amoxicilline/acide clavulanique (20/10µg), Gentamicine (15µg), Streptomycine (10UI), Florfénicol (30µg), Doxycycline (30UI), Erythromycine (15UI), Spiramycine (100µg), Acide Nalidixique (30µg), fluméquine (30µg), Enrofloxacin (5µg) et Sulfaméthazole (23,75µg), Colistine (50 µg).

En parallèle, une analyse statistique (test de Fisher et test Khi-2) a été réalisée pour déduire la valeur p dont le but de savoir s'il y a une différence significative entre les familles d'antibiotiques utilisées.

Tableau 1 : Interprétation de la taille du Diamètre des Antibiotiques

Source: the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (AC-FSM) veterinary recommendations.

	Charge du disque	Résistant	Intermédiaire	Sensible
Amoxicilline	25 µg	<14	15-20	≥21
Amoxicilline/Acide Clavulanique	20/10 µg	<14	15-20	≥21
Gentamicine	15µg (10UI)	<14	15	≥16
Streptomycine	10 UI	<13	14	≥15
Florfenicol	30 µg	<15	16-18	≥19
Doxycycline	30 UI	<17	18	≥19
Erythromycine	15 UI	≤13	14-22	≥23
Spiramycine	100 µg	<16	17-21	≥22
Acide Nalidixique	30 µg	<15	16-19	≥20
Fluméquine	30 µg	<21	22-24	≥25
Enrofloxacin	5 µg	<17	18-21	≥22
Sulfamethaxazole	23.75 µg	<10	11-15	≥16
Colistine	50 µg	<15	-	>15

II-VII.2. Test CMI vis-à-vis de la colistine

L'activité antimicrobienne exprimé en CMI est déterminée par la méthode de dilution, utilisant des plaques à cupules type sensititre, ces cupules contiennent des concentrations connues d'antimicrobiens (Annexe 10).

II-VII.3. Détection du gène mcr-1 (Sybr Green PCR)

II-VII.3.1. Extraction d'ADN

L'extraction des acides nucléiques est faite avec le kit commercialisé Machery Nagel Tissue (Machery-Nagel, Germany) selon les recommandations du fabricant.

II-VII.3.2. Intercalant et amorces utilisées

Les amorces utilisées sont celles décrites dans la publication Rebelo et al., (2018). Ces amorces permettent la détection d'un petit fragment (320 pb au niveau du gène mcr-1). Les amorces nucléotidiques sens (forward) mcr-1-fr (5'- AGTCCGTTTGTCTTGTGGC -3') ; ainsi que l'anti-sens (reverse) mcr-1-as, (5'- AGATCCTTGGTCTCGGCTTG -3'). Le Master Mix Sybr Green "The SensiFAST Sybr® Lo-ROX Kit" (Bioline, A Meridian Life Science Company) a été utilisé dans notre étude.

II-VII.3.3. Amplification d'ADN

a. Mélange réactionnel

Pour réaliser le mélange réactionnel, nous avons choisi d'utiliser le Master Mix Sybr Green, SensiFAST Sybr® Lo-ROX Kit. Le mélange réactionnel est réalisé comme suit tableau 2 :

Tableau 2 : Mix Sybr Green

Reagent	Volume	Final concentration
2x SensiFAST SYBR® Lo-ROX Mix	10 µL	1x
10 µM forward primer	0.8 µL	400 nM
10 µM reverse primer	0.8 µL	400 nM
Template	up to 8.4 µL	
H ₂ O	As required	
20 µL Final volume		

Pour chaque set d'échantillons à tester, nous avons inclus un témoin positif et un témoin négatif (l'eau utilisée pour la préparation du master mixte pour PCR).

b. Thermocycleur de type Agilent

Le système Agilent est conçu pour la réalisation de PCR en temps réel sur un format de 96 échantillons. La PCR se fait dans des plaques à 96 puits. Dans chacun des puits se déroule une PCR en temps réel pour chaque échantillon.

La plaque vient se placer sur un bloc chauffant, qui assure un échange thermique rapide et homogène pour toute la plaque. Il est possible, grâce à ce système qui émet et lit la fluorescence à plusieurs longueurs d'ondes, d'élaborer des PCR multiplexes. C'est-à-dire de réaliser plusieurs PCR dans un même puits grâce à son système optique et une source lumineuse à haute énergie et large spectre.

La plaque est secouée de haut en bas en gardant la plaque horizontalement afin que le mix ainsi que l'ADN soient mélangés au fond des puits. Le film transparent que l'on a posé au-dessus de la plaque sert à éviter l'évaporation lors du chauffage à haute température dans le thermocycleur. Ensuite, il convient de placer la plaque dans le compartiment d'Agilent et de lancer le programme.

c. Programme

Le profil thermique utilisé pour l'amplification du gène *mcr-1* par PCR en temps réel Sybr Green a été réalisé selon les conditions rapportées dans la figure 11.



Figure 11 : Cycle d'amplification du gène mcr-1 par Sybr Green

II-VII.3.4. Confirmation par migration sur gel d'agarose

L'amplicon obtenu est migré directement sur gel d'agarose afin de confirmer les résultats obtenus par amplification Sybr Green.

II-VIII. Production d'un lot expérimental de vaccin inactivé

A partir d'une souche de *Mannheimia haemolytica* (S32/15) isolée et identifiée par tests moléculaires et dont le dénombrement est $(5,52 \cdot 10^{10} \text{ UFC/ml})$ et pouvoir pathogène a été évalué en se basant sur la DL50, un lot de vaccin inactivé expérimentale a été produit dans un bioréacteur.

II-VIII.1. Etapes de production

II-VIII.1.1. Préparation de l'inoculum

Le lot de semence congelé situés au niveau de la souche-thèque, sont repris avec de l'eau distillée stérile dans un flacon contenant du milieu pour préculture et servant uniquement de support pour l'ensemencement.

Les flacons ainsi ensemencés sont incubés dans une étuve à $+37^{\circ}\text{C}$ durant 16 à 18 heures.

Après seize à dix-huit heures de culture, un prélèvement est effectué dont le but de contrôler la pureté, la densité optique et le pH.

La pureté est d'abord vérifiée, sur chacun des échantillons par examen, direct de la morphologie en contraste de phase et de l'affinité tinctoriale après coloration de Gram. L'observation ne doit pas révéler des contaminants au niveau de la forme bactérienne. La pureté est ensuite contrôlée par ensemencement sur gélose au sang. Le contrôle du pH à ne pas négliger.

II-VIII.1.2. Préparation du fermenteur

Le fermenteur est stérilisé à vide, sous pression de vapeur, durant quarante-cinq minutes à 121°C, il est par la suite refroidi et maintenu sous pression d'air afin de contrôler son étanchéité.

Avant d'entamer le transfert du milieu de culture depuis la cuve de préparation vers le fermenteur, l'étanchéité de ce dernier est vérifiée afin de prévenir d'éventuelle contamination ; par la suite la cuve est dépressurisée et l'installation des sondes peut alors commencer. En effet, après nettoyage et standardisation de l'électrode de pH, l'ensemble sonde-électrode est installé sur la cuve du fermenteur. La sonde biomasse est également nettoyée et installée sur le fermenteur.

Après avoir ajusté le volume et le pH du milieu, le fermenteur est stérilisé à plein durant quarante minutes à +121°C, puis mis sous pression d'azote et refroidi à la température d'incubation à +37°C. Le fermenteur est maintenu sous une pression d'azote d'environ 1,2 bar jusqu'au moment de l'ensemencement.

II-VIII.1.3. Fermentation bactérienne

Les additifs stérilisés par filtration sont ajoutés au milieu par transfert, à l'aide d'une pompe péristaltique après raccordement des flacons au fermenteur.

Un prélèvement est effectué sur le fermenteur en utilisant un montage de prise d'échantillon qui est également restérilisé en place ; ceci est dans le but de contrôler sa stérilité et son pH. En effet, la stérilité est contrôlée par observation directe du milieu qui doit être clair. Elle sera toutefois contrôlée sur des boîtes de pétri pour confirmer sa stérilité après quarante-huit heures à +37°C. Le pH est mesuré ~~sur~~ par un pH mètre de laboratoire dont l'électrode a été préalablement standardisée. Les valeurs du pH, mesuré d'une part sur l'échantillon au moyen du pH mètre de laboratoire et d'autre part sur le milieu de culture au moyen du pH mètre implanté sur le fermenteur, doivent correspondre. A défaut, le pH mètre placé sur le fermenteur doit être standardisé en tenant compte, de la valeur lue sur le pH mètre de laboratoire. D'autre part, le pH initial du milieu de culture devant avoir une valeur précise ($7,5 \pm 0,2$), il convient

de le rectifier si nécessaire, après standardisation de l'électrode, par addition de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide tartrique.

Si le contrôle des cultures en flacons ne révèle aucune anomalie, notamment l'absence des contaminants, le pH ($5 \pm 0,5$) et la densité optique ($DO \geq 1$), les flacons répondants aux différents contrôles en cours sont connectés au fermenteur par l'intermédiaire d'un montage ensemencement raccordé d'une part au piquage inoculum du fermenteur et d'autre part à une des cannes de transfert équipant le bouchon des flacons; le montage est également restérilisé en place avant l'ensemencement du fermenteur.

La pression dans le fermenteur est ramenée à la pression atmosphérique et le contenu des flacons d'inoculum est alors transféré dans le fermenteur à l'aide d'une pompe péristaltique.

Le suivi de la culture consiste à l'enregistrement de la température, du pH, de la densité optique, du volume et de l'agitation. Des prélèvements sont effectués régulièrement et au besoin afin de vérifier les paramètres de la culture et le suivi microscopique de l'état des cellules bactériennes cultivées. Des corrections sont apportées au besoin afin d'optimiser la croissance bactérienne et la production des exotoxines.

La multiplication bactérienne s'accompagne d'une acidification du milieu, le pH est rétabli à sa valeur de consigne à l'aide de l'hydroxyde de sodium. Pour ce faire, un récipient contenant d'hydroxyde de sodium, équipé d'un montage de transfert re-stérilisable en place, est raccordé au piquage d'entrée de la cuve d'alimentation de l'hydroxyde de sodium. La régulation du pH et de la température s'effectue automatiquement par le biais de l'ordinateur de pilotage du fermenteur ou via un système de régulation indépendant.

Des prélèvements de la culture sont effectués stérilement dans des flacons bouchonnés. Les contrôles en cours de la culture concernent l'observation à l'état frais de la culture bactérienne, la vérification du pH et de la densité optique. Dès l'obtention du maximum de la courbe de croissance (densité optique maximum), deux prélèvements de la culture sont effectués stérilement dans des flacons bouchonnés ; la culture bactérienne est soumise à ~~subit~~ ainsi divers contrôles à savoir :

- La pureté est d'abord vérifiée sur un des prélèvements par examen direct de la morphologie en contraste de phase et de l'affinité tinctoriale après coloration de Gram.
- La stérilité du produit ainsi préparé est vérifiée par ensemencement de boîtes de pétri.

- Des contrôles physico-chimiques sont effectués pour vérifier notamment du pH et la densité optique.

D'autres contrôles sont effectués par le service de contrôle qualité, à savoir :

- La détermination du pouvoir toxique sur souris sur un échantillon de culture centrifugé.
- L'identité bactérienne est par ailleurs vérifiée par PCR.

II-VIII.1.4. Inactivation

La solution de formol a été préalablement préparée en quantité suffisante pour obtenir, dans la culture industrielle à inactiver en fin de croissance, la concentration requise de solution commerciale contenant 37 à 40% d'aldéhyde formique. La solution de formol est transférée à l'aide d'une pompe péristaltique après accordement du flacon à un piquage d'entrée du fermenteur. Le pH est maintenu à 7 pendant le début d'inactivation dans le fermenteur.

L'inactivation de l'ensemble du corps bactériens et toxine se déroule en deux phases, à savoir :

- Première phase : depuis l'injection de la solution de formaldéhyde jusqu'à dix-huit à vingt-quatre heures ; la culture est maintenue au niveau de cuve à +37°C et sous agitation.
- Deuxième phase : pendant laquelle un certain nombre d'opération visant le traitement du produit, elle se poursuit pendant douze jours.

II-VIII.1.5. Récolte

Après douze jours d'inactivation à +37°C et sous agitation le principe actif est récolté dans des poches stériles. Au cours de cette opération, trois prélèvements sont effectués au début, milieu et à la fin de la récolte ; les échantillons sont par la suite transmis au service de contrôle qualité. Contrôle du principe actif sont comme suit :

- Contrôle de stérilité bactérienne et fongique,
- Contrôle d'inactivation,
- Contrôle d'innocuité spécifique et non spécifique,
- Dosage du formaldéhyde résiduel.

II-VIII.1.6. Stockage

Le principe actif est stocké en chambre froide (+5°C ± 3°C) et à l'obscurité jusqu'à son utilisation. Le principe actif doit être utilisé dans une période de deux ans. Tout principe actif

qui n'a pas été utilisé dans les deux années sera considéré comme étant périmé et détruit suivant la procédure en vigueur.

- **Contrôle de la qualité**

Ces essais s'effectuent sur tout lot produit (selon le guide pour l'élaboration des monographies des vaccins pour usage vétérinaire, Pharmacopée Européenne Edition 2008) :

- **Identification**

Injecté/administré à des animaux de laboratoire exempts d'anticorps dirigés contre la bactérie en question le vaccin stimule la production de tels anticorps.

- **Contamination bactérienne et fongique**

Le vaccin et le liquide éventuellement délivré avec la préparation satisfont à l'essai de stérilité prescrit dans la monographie Vaccins pour usage vétérinaire.

II-VIII.1.7. Innocuité

Il faut utiliser 2 animaux de laboratoire ayant au plus l'âge minimal recommandé pour la vaccination, exempts d'anticorps dirigés contre la maladie de préférence exempts d'anticorps dirigés contre la bactérie. Dans certains cas justifiés, nous utilisons des animaux ayant un faible taux de ces anticorps, n'ayant pas été vaccinés contre cette pathologie.

Aussi, l'administration du vaccin à ces animaux n'entraîne pas de réponse au moins d'une des espèces auxquelles le vaccin est destiné. Le choix des animaux est fait en fonction de la masse corporelle minimale recommandée pour la vaccination.

Il faut administrer à chaque animal la dose qu'il faut de vaccin par une voie recommandée et faire une observation de ces animaux au moins 1 fois par jour pendant x jours.

Le vaccin est satisfait à l'essai si aucun animal ne présente de signes notables de maladie ni ne meurt de causes attribuables au vaccin ; il peut se produire une augmentation transitoire de la température corporelle qui ne dépasse pas 2,0°C.

II-VIII.1.8. Activité

Le vaccin satisfait aux exigences de l'essai ou des essais prescrits sous pouvoir immunogène lorsqu'il est administré par une voie et une méthode recommandée (guide pour l'élaboration des monographies des vaccins pour usage vétérinaire, Pharmacopée Européenne Edition 2008).

II-VIII.2 Vaccination et suivi sérologique

* les animaux de l'expérimentation

La vérification de la vaccination a été réalisé sur 10 ovins numérotés comme suit 1, 3, 4, 9, 11, 12, 14, 22, 31 et 34. Ces animaux ont reçu 1 ml de la dose vaccinale par voie sous cutanée et suivie durant un intervalle de temps régulier. Les échantillons sanguins ont été collectés dans des tubes secs (J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49, J56, J63 et J77). La première injection était le 06/10/2017 et le rappel était le 02/11/2017. L'étude réalisée est résumée dans l'annexe n°12.

*le suivi sérologique

Le suivi est réalisé en utilisant le kit Elisa Monoscreen pour la détection de *Mannheimia Haemolytica* dont le principe est comme suit : les microplaques à 96 puits sont sensibilisées par du lipopolysaccharide (LPS) de *Mannheimia haemolytica*. L'entièreté des microplaques est sensibilisée par le LPS. Les sérums sanguins sont dilués dans le tampon de dilution. Après incubation et lavage de la préparation, on ajoute le conjugué, de la protéine G couplée à la peroxydase. A l'issue d'une seconde incubation d'une heure à 21°C +/- 3°C et d'un second lavage, on ajoute la solution de révélation (TMB). Ce chromogène présente le double avantage d'être plus sensible que les autres chromogènes de la peroxydase et de ne pas être cancérigène. En cas de présence d'immunoglobulines spécifiques de *Mannheimia haemolytica* dans le sérum ou le plasma, le conjugué reste fixé sur la cupule contenant le LPS et l'enzyme catalyse la transformation du chromogène incolore en un produit bleu. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques présents dans l'échantillon. Il est possible d'attribuer à ces échantillons un niveau de positivité compris entre + et +++++. Les étapes sont en détails dans l'annexe n°13.

Chapitre III-
Résultats

III-I. Test de dépistage par PCR en temps réel

L'analyse de 162 échantillons prélevés d'espèces différentes (ovins, bovins et caprins) par PCR en temps réel a montré que 67 échantillons (41%) étaient positifs, dont 51 provenaient d'écouvillons nasaux et 16 de poumons (Annexe 3). Les résultats du test de screening des échantillons par PCR en temps réel et leur distribution par espèce et type d'échantillon sont présentés au Tableau 3.

Tableau 3 : Screening par PCR en temps réel

Types d'échantillon	Espèces	Nombre d'échantillon	nombre de positifs	
			Nombre	Pourcentage (%)
Ecouvillons nasaux	sheep	75	26	35
	goat	6	3	50
	bovine	40	22	55
	Total (EN)	121	51	42
Poumons	sheep	4	3	75
	goat	1	1	100
	bovine	36	12	33
	Total (PM)	41	16	39
	Total global	162	67	41

III-II- Isolement et identification bactérienne

Un échantillon positif par le test de dépistage est ensuite confirmé en utilisant des techniques bactériologiques et biochimiques classiques. Les colonies à Gram négatif, Catalase (+), Oxydase (±) (Annexe 4) et distinctes allant du rose au rouge sur gélose MacConkey étaient caractéristiques de *Mannheimia haemolytica*. et l'absence de croissance bactérienne sur l'agar MacConkey était caractéristique de *Pasteurella Multocida*. La confirmation des colonies bactériennes a été effectuée par PCR conventionnelle.

Les soixante-sept isolats isolés sont conservés à -80°C dans des cryoperles (Figure 12).

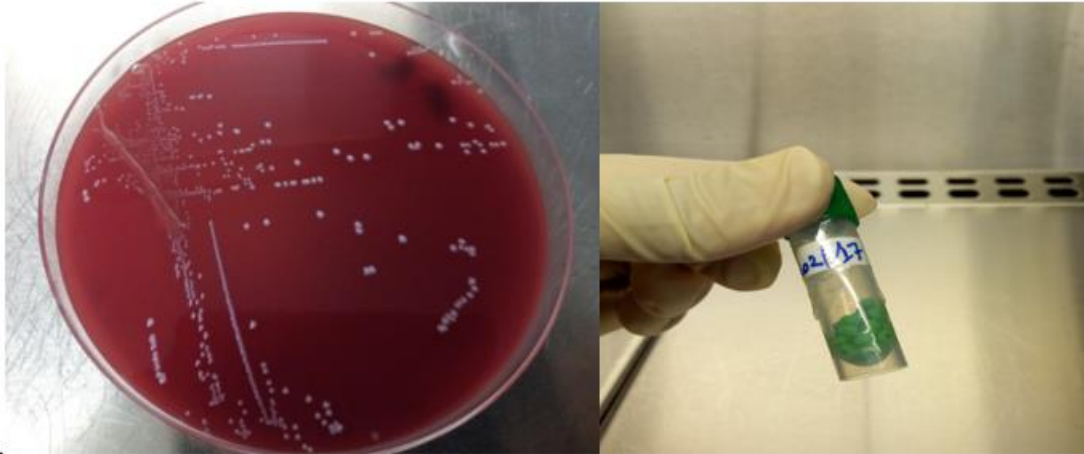


Figure 12 : Culture bactérienne sur gélose au sang et conservation sur cryoperles

III-III. Etude histologique

Les lésions histopathologiques révélées dans la plupart des poumons des animaux examinés comprenaient un œdème dans les espaces interlobulaires ainsi qu'on constate l'infiltration de cette espace par des polymorphonulaires (PMN) et de macrophages et également le dépôt de fibrine (Figure 13.1 et Figure 13.2).

On constate également une importante charge de la lumière bronchique et des espaces alvéolaires par des PMN et des macrophages associés à une nécrose multifonctionnelle et parenchymateuse respiratoire sévère dans certaines zones (Figure 13.3 et 13.4).

Ces lésions histopathologiques correspondaient à un diagnostic de bronchopneumonie aiguë très grave. Dans tous les cas, plusieurs colonies bactériennes ont été identifiées *in situ* et se présentaient sous la forme de bâtonnets granulaires bleu foncé (Figure 13.5 et 13.6).

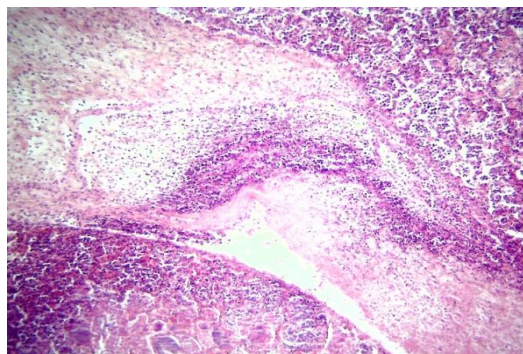


Figure 13.1: Poumon de veau - Œdème grave et infiltration fibrino-leucocytaire des espaces interlobulaires. H&E, X10.

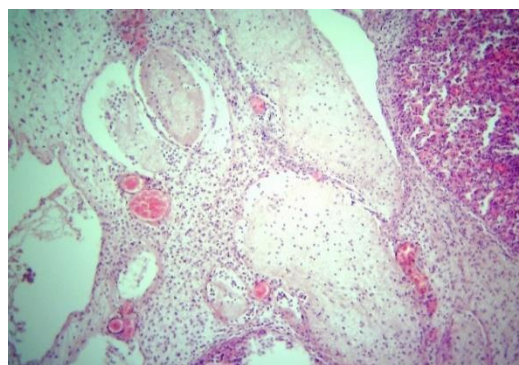


Figure 13.2: Poumon de veau - œdème et infiltration fibrino-leucocytaire des espaces pleuraux pulmonaires. H&E, X10.

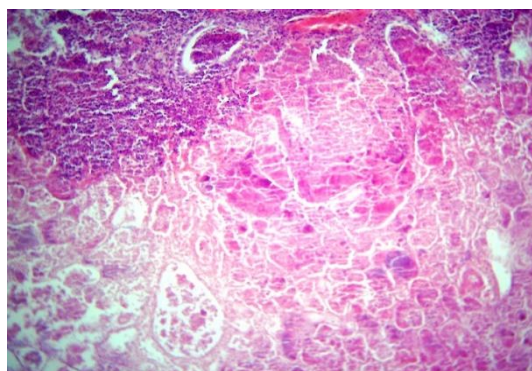


Figure 13.3: Poumon de veau - Bronchopneumonie leucocytaire subaiguë et nécrosante. Œdème grave, hyperémie et infiltration leucocytaire dans la lumière des espaces alvéolaires et des bronches et nécrose pulmonaire parentérale sévère avec présence de colonies bactériennes. H&E, X40.

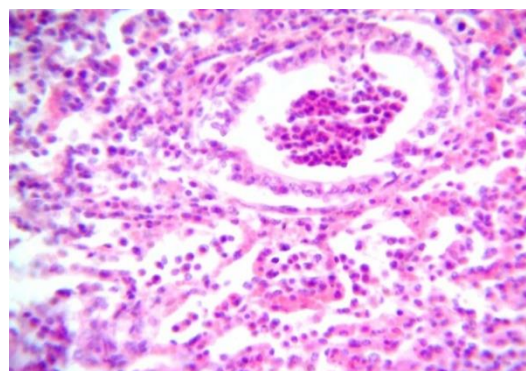


Figure 13.4: Poumon de veau - Bronchopneumonie leucocytaire subaiguë. Infiltration leucocytaire grave dans les espaces alvéolaires et les bronches secondaires. H&E, X100.

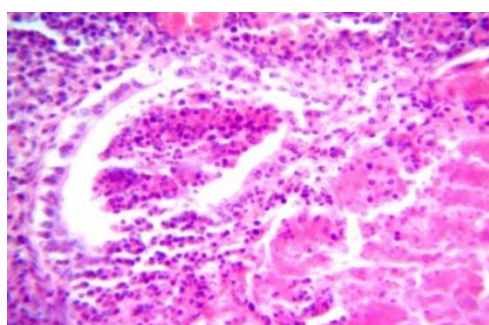


Figure 13.5: Poumon de veau - Bronchopneumonie leucocytaire subaiguë. L'infiltration leucocytaire grave dans les espaces alvéolaires et les bronches secondaires (flèche) et la nécrose pulmonaire parenchymale grave (P). H&E, X100.

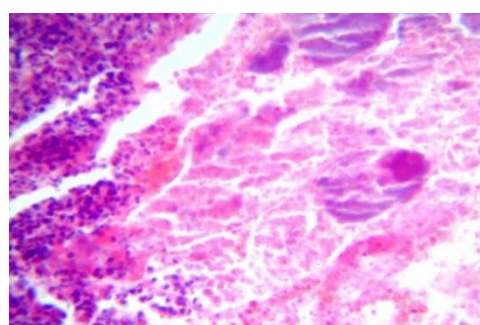


Figure 13.6: Poumon de veau - Infiltration leucocytaire grave et diffuse et nécrose pulmonaire parenchymale (P) avec présence de colonies bactériennes (flèches). H&E, X100.

Figure 13 : Lésions Microscopiques pulmonaires

III-IV. Test de confirmation des isolats par PCR conventionnelle

La confirmation moléculaire des espèces de *Pasteurella* a été réalisée en utilisant une PCR conventionnelle avec des amorces spécifiques (annexe 6).

III-IV.1. Confirmation de *Mannheimia haemolytica*

L'identification moléculaire des 34 souches avec les amorces spécifiques du gène Sod A a révélé une amplification positive des fragments de 143pb (Figure 14 et annexe 5)

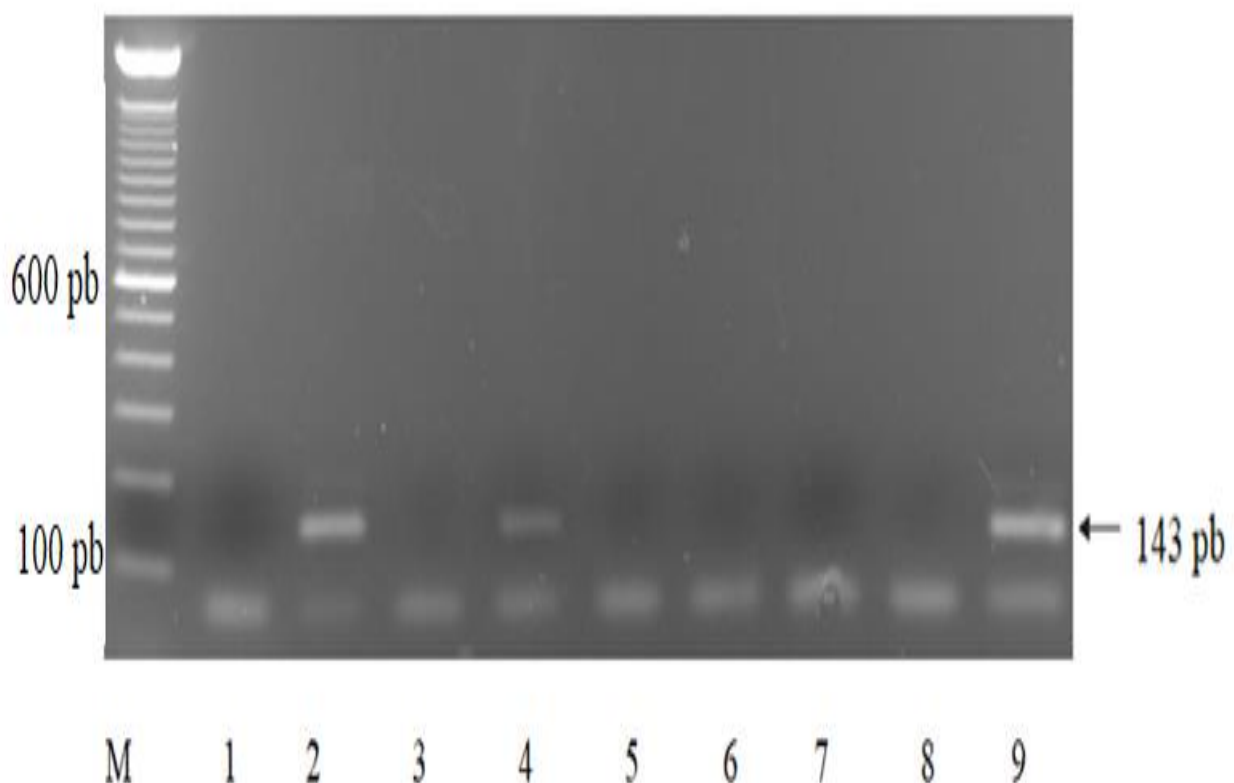


Figure 14 : Amplification de fragments spécifiques de *Mannheimia haemolytica*

Électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. M (100pb): Marqueur, 1: NTC, 2: S15/17, 3: S16/17, 4: S17/17, 5: S18/17, 6: S20/17, 7: S22/17, 8: S23/17, 9: Positif.

Les souches *Mannheimia haemolytica* ont été détectées dans 34 des 67 souches examinées. Un total de 28 souches (55%) provenait de prélèvements nasaux et 6 souches (38%) de poumons (Tableau 4).

Tableau 4 : Résultats du test de confirmation de *Mannheimia haemolytica* par PCR conventionnelle

Types d'échantillon	Espèces	Nombre d'échantillon	Nombre de positifs	
			Nombre	Pourcentage (%)
Ecouvillons nasaux	OVIN	26	11	42
	CAPRIN	3	3	100
	BOVIN	22	14	64
	Total (EN)	51	28	55
Poumons	OVIN	3	1	33
	CAPRIN	1	1	100
	BOVIN	12	4	33
	Total (Pm)	16	6	38
	Total global	67	34	51

III-IV.2. Confirmation de *Pasteurella multocida*

La confirmation a été effectuée à l'aide d'une PCR gel-based (annexe 5) ciblant le gène KMT1 pour tout le groupe et celui du séro groupe A ; 9 échantillons (7 écouvillons et 2 poumons) étaient positifs, représentant respectivement 14% et 13% de tous les échantillons testés (Figures 15, 16 et le Tableau5).

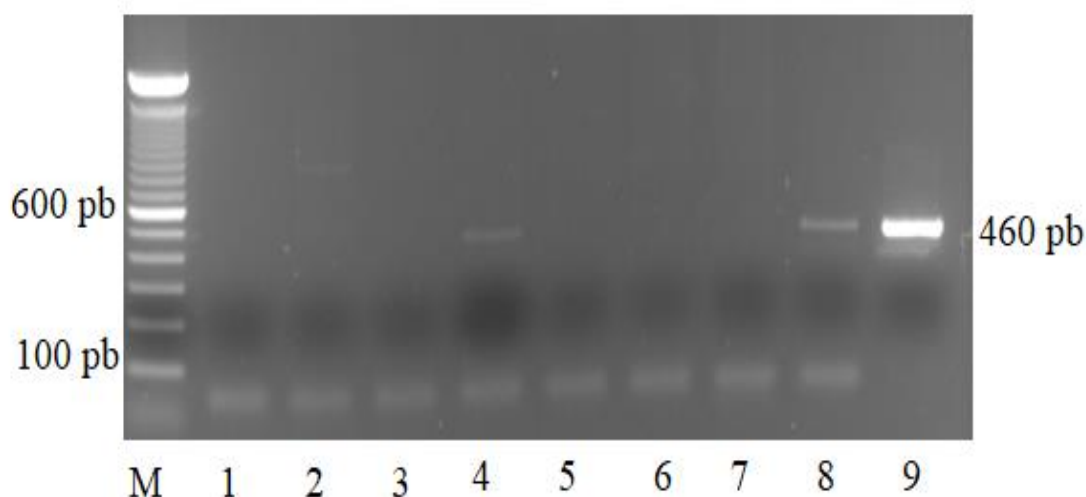


Figure 15 : Amplification de fragments spécifiques de *Pasteurella multocida*

Électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. M(100pb): Marqueur, 1: NTC, 2: S27/15, 3: S3/16, 4: S91/17, 5: S15/17, 6: S17/17, 7: Négatif, 8:NTC, 9: Positif.

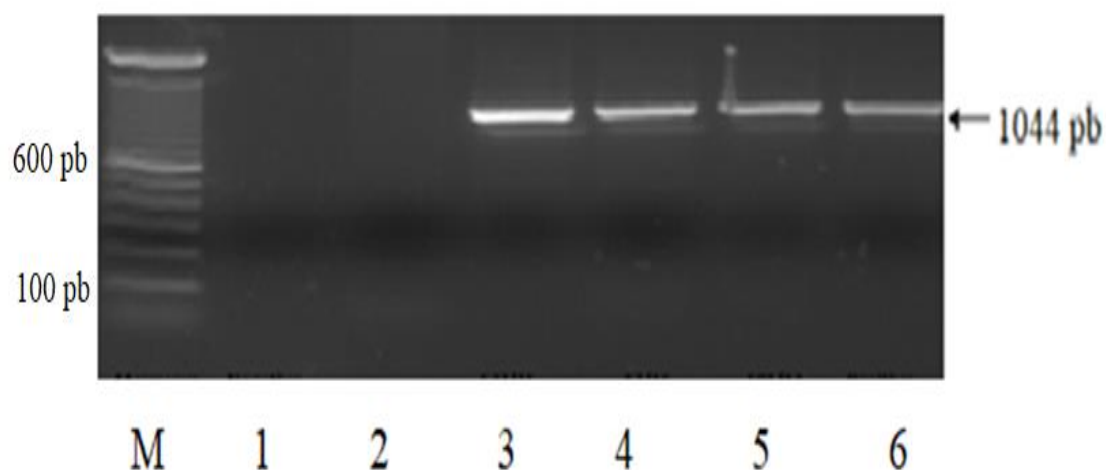


Figure 16 : Amplification de fragments spécifiques du sérogroupe A de *Pasteurella multocida*

Électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. M (100 pb): Marqueur, 1: NTC, 2: Négatif, 3: S27/15, 4: S3/16, 5: S91/17, 6: Positif.

Tableau 5 : Résultats test de confirmation de *Pasteurella Multocida* par PCR conventionnelle

Types d'échantillon	Espèces	Nombre d'échantillon	Nombre de positifs	
			Nombre	Pourcentage (%)
Ecouvillons nasaux	OVIN	26	4	15
	CAPRIN	3	0	0
	BOVIN	22	3	14
	Total (EN)	51	7	14
Poumons	OVIN	3	0	0
	CAPRIN	1	0	0
	BOVIN	12	2	17
	Total (Pm)	16	2	13
	Total global	67	9	13

III-V. Étude du pouvoir pathogène sur souris

III-V.1. Dénombrement

Pour déterminer le nombre d'UFC, la méthode utilisée est celle de dénombrement en masse tout d'abord on prépare des dilutions en série allant de 10^{-1} à 10^{-10} de la suspension bactérienne à dénombrer, après 1ml de chaque dilution est ajouté à 9 ml de gélose déjà préparé et mis à une température comprise entre 48°C et 50°C puis bien homogénéiser et couler sur boîtes de pétri (2 boîtes /Dilution). Les concentrations obtenues sont figurées dans l'annexe n°9.

III-V.2. Pouvoir pathogène sur souris

L'étude de la pathogénicité est réalisée sur un groupe de 5 souris qui sont injectées via la voie intrapéritonéale par 60 souches de *pasteurella* isolées lors de cette étude, en se basant sur le résultat de la PCR en temps réel, sur l'intensité de la bande lors de la PCR conventionnelle et sur le dénombrement (UFC). Cette étude a montré que 26 souches (Tableau 6) causaient un taux de mortalité de 100% chez les souris dans les 12 à 18 heures (Annexe 7) qui suivent l'injection. 17 souches avaient un taux de mortalité supérieur à 60% dans les 19 et 24 heures. En revanche, aucune mortalité n'a été enregistrée chez les cinq souris utilisées comme témoins.

Tableau 6 : Pourcentage de mortalité des souris inoculées par les souches isolées par voie intrapéritonéale

60 souches testées	14	2	1	6	11	26
Mortalité (en nombre)	0	1	2	3	4	5
Mortalité (en %)	0	20	40	60	80	100
%	18%	3,00%	2,00%	10%	18%	43%

III-V.3. Ré-isolément à partir des organes des souris mortes

Des échantillons de foie et de poumon provenant des souris mortes sont confirmés par PCR conventionnelle spécifique de *Mannheimia haemolytica* (Guenther et al., 2008) et un prototype des résultats obtenus est représenté dans la figure 17.

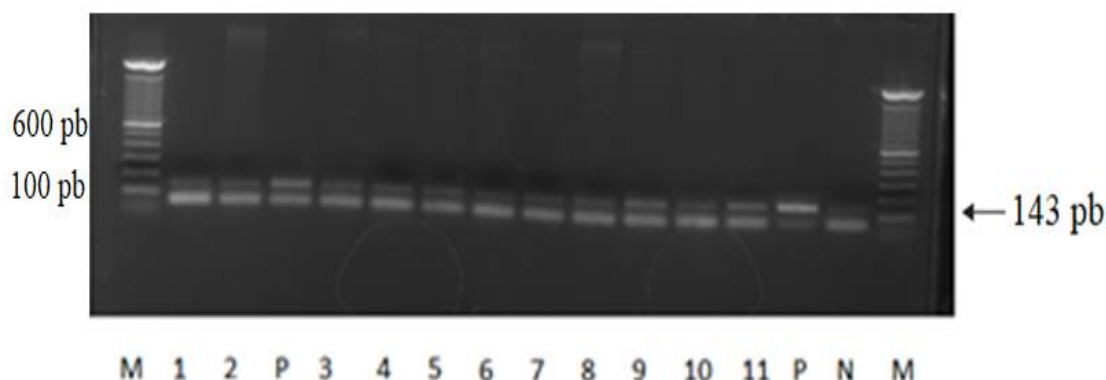


Figure 17 : Amplification de fragments spécifiques de *Mannheimia haemolytica* à partir des organes des souris inoculées

M (100pb): Marqueur, 1: S30/15, 2: S33/15, P: Positif extraction, 3: S41/15, 4: S1/16, 5: S4/16, 6: S6/16, 7: S7/16, 8: S10/16, 9: S86/17, 10: S96/17, 11: S102/17, P: Positif amplification, N: Négatif, M (100 pb): Marqueur.

III-VI. Antibiogramme

III-VI.1. Test de diffusion sur disque

L'antibiogramme des isolats est effectué à l'aide de la méthode de diffusion sur disque. Ce test est réalisé sur 41 souches de pasteurelles (34 *Mannheimia haemolytica* et 07 *Pasteurella Multocida*) (Tableau 7). Toutes les souches ont montré une résistance (Annexe 10) aux antibiotiques testés à un taux supérieur à 14 %, sauf pour une souche de *P. multocida* qui n'avait pas de profil de résistance contre l'AMC. Le niveau de résistance le plus élevé a été constaté contre les NA pour *P. multocida* (100%) et contre UB (82,4%) pour *M. haemolytica*. Les taux de sensibilité pour *P. multocida* se situaient entre 0 (contre NA) et 85,7 % (contre STR, AMC et FFC), tandis que la sensibilité des isolats de *M. haemolytica* se situait respectivement entre 17,6 % contre UB et 79,4 % contre AMC. Pour la colistine les taux de résistance des souches des espèces Pasteurellaceae étaient compris entre 59% et 71%, ce qui correspond respectivement à *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* segroup A. Les ratios de sensibilité étaient compris entre 29% et 41%, ce qui correspond respectivement à *Pasteurella multocida* segroup A et *Mannheimia haemolytica*.

En outre, pour les deux espèces de *Pasteurellaceae*, ce test a montré que la multirésistance aux antibiotiques a été constatée dans tous les isolats testés puisque des profils de résistance ont été établis pour au moins trois classes d'agents antimicrobiens (Figure 18). Enfin, en se basant sur ces résultats obtenus, nous pouvons dire que l'amoxicilline/acide clavulanique (AMC) était l'agent antimicrobien le plus efficace.

Une analyse statistique était réalisée pour l'étude de la résistance vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques analysées (Tableau 8), Une résistance substantielle par rapport aux familles d'antibiotiques a été obtenue pour les betalactamines, en particulier l'AMC ($P=0,009$) et les macrolides ($P<0,001$), ce qui est très proche des résultats rapportés précédemment par Onat et al. (2010).

Tableau 7 : Réponse de sensibilité des différentes souches aux différentes familles antibiotiques

Famille des Antibiotiques	Code	<i>Mannheimia haemolytica</i> (34)			<i>Pasteurella multocida</i> (7)		
		%S	%Int	%R	%S	%Int	%R
Bêtalactamines	A	17 (50)	4 (11,8)	13 (38,2)	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,9)
	AMC	27 (79,4)	0	7 (20,6)	6 (85,7)	1 (14,3)	0
Aminoglycosides	STR	25 (73,5)	1 (2,9)	8 (23,5)	6 (85,7)	0	1 (14,3)
	CN	24 (70,6)	3 (8,8)	7 (20,6)	5 (71,4)	0	2 (28,6)
Macrolides	E	10 (29,4)	3 (8,8)	21 (61,8)	2 (28,6)	0	5 (71,4)
	SP	10 (29,4)	3 (8,8)	21 (61,8)	2 (28,6)	0	5 (71,4)
Sulfamides	SXT	23 (67,6)	0	11 (32,4)	5 (71,4)	0	2 (28,6)
Quinolones	NA	9 (26,5)	0	25 (73,5)	0	0	7 (100)
	UB	6 (17,6)	0	28 (82,4)	2 (28,6)	0	5 (71,4)
Tétracyclines	DO	14 (41,2)	0	20 (58,8)	3 (42,9)	0	4 (57,1)
Fluoroquinolones	ENF	15 (44,1)	4 (11,8)	15 (44,1)	2 (28,6)	1 (14,3)	4 (57,1)
	FFC	24 (70,6)	5 (14,7)	5 (14,7)	6 (85,7)	0	1 (14,3)
Polymyxines	CT	14 (41)	-	20 (59)	2 (29)	-	5 (71)

Avec **S** : sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistant, **A**: Amoxicilline, **AMC**: Amoxicilline/ acide clavulanique, **CN**: Gentamicine, **STR**: Streptomycine, **FFC** : Florfénicol, **DO**: Doxycycline, **E**: Erythromycine, **SP**: Spiramycine, **NA**: acide nalidixique, **UB**: Fluméquine, **ENF**: Enrofloxacin, **SXT**: Sulfaméthazole.

Tableau 8 : Analyse statistique de la résistance d'un des antimicrobiens vis-à-vis de la famille des antibiotiques

La famille des antibiotiques	Bêtalactamines		Aminoglycosides		Macrolides		Quinolones		Fluoroquinolones	
Antibiotique	A	AMC (R)	STR	CN (R)	E	Sp (R)	NA	UB (R)	ENF	FFC (R)
Profil des isolats	S	1 (4%)	S	7 (21,9%)	S	1 (6,7%)	S	6 (66,7%)	S	2 (9,1%)
	R	6 (37,5%)	R	2 (22,2%)	R	25 (96,2%)	R	27 (84,4%)	R	4 (21,4%)
P value	0,009		1		<0,001		0,342		0,39	

Avec **S** : sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistant, **A**: Amoxicilline, **AMC**: Amoxicilline/ acide clavulanique, **CN**:Gentamicine, **STR**: Streptomycine, **FFC** : Florfénicol, **E**: Erythromycine, **SP**: Spiramycine, **NA**: acide nalidixique, **UB**: Fluméquine, **ENF**: Enrofloxacin.

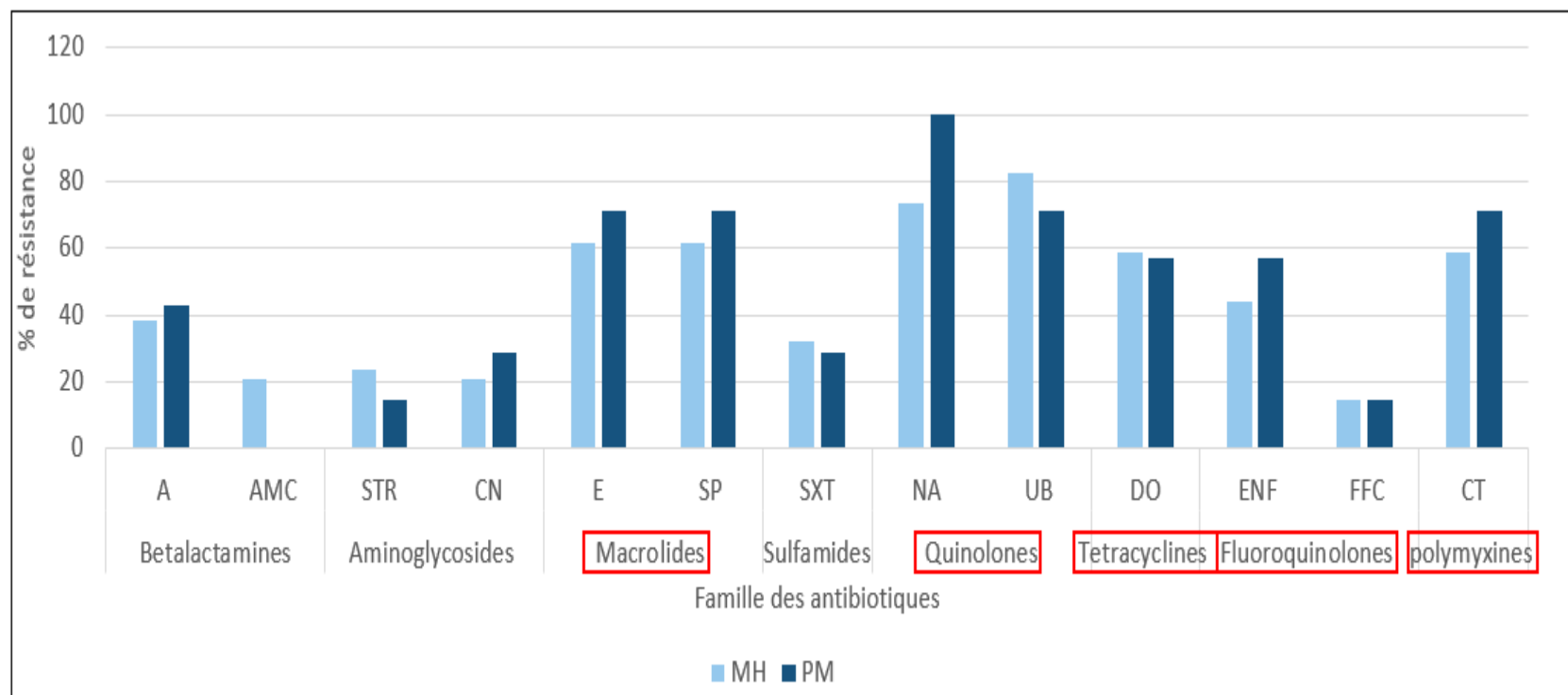


Figure 18: Profil de resistance aux différentes famille des antibiotiques

MH : *Mannheimia haemolytica*, **PM** : *Pasteurella multocida*, **A**: Amoxicilline, **AMC**: Amoxicilline/ acide clavulanique, **CN**: Gentamicine, **STR**: Streptomycine, **FFC** : Florfénicol, **DO**: Doxycycline, **E**: Erythromycine, **SP**: Spiramycine, **NA**: acide Nalidixique, **UB**: Fluméquine, **ENF**: Enrofloxacin, **SXT**: Sulfamethaxazole.

III-VI.2. Test CMI vis-à-vis de la colistine

Les 41 souches testées par le test CMI contre la colistine ont un profil de résistance avec une CMI= >64 µg/ml sauf pour 3 souches qui ont une valeur < 2 µg/ml.

III-VI.3. Détection du gène *mcr-1*

III-VI.3.1. Sybr Green PCR

Pour cela, les souches ont été ensemencées sur des géloses au sang puis incubées à 37°C pendant 24h. Les souches isolées ont ensuite été extraites puis amplifiées par PCR quantitative en temps réel. Le processus de PCR est suivi au cours du temps à l'aide de la fluorescence correspondant à la quantité de produits amplifiés à cet instant. Le Sybr®Green utilisé est un fluorophore qui s'incorpore dans la double hélice d'ADN et qui à l'état libre n'émet pas de fluorescence (Annexe 11). On mesure l'augmentation de la fluorescence à chaque étape d'élongation de chaque cycle. La spécificité des amorces utilisées est vérifiée à la fin de l'étape d'amplification grâce à la courbe de fusion : on observe une diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Les produits non spécifiques vont se dissocier à des températures plus basses qu'un produit spécifique d'amplification (Figure 19).

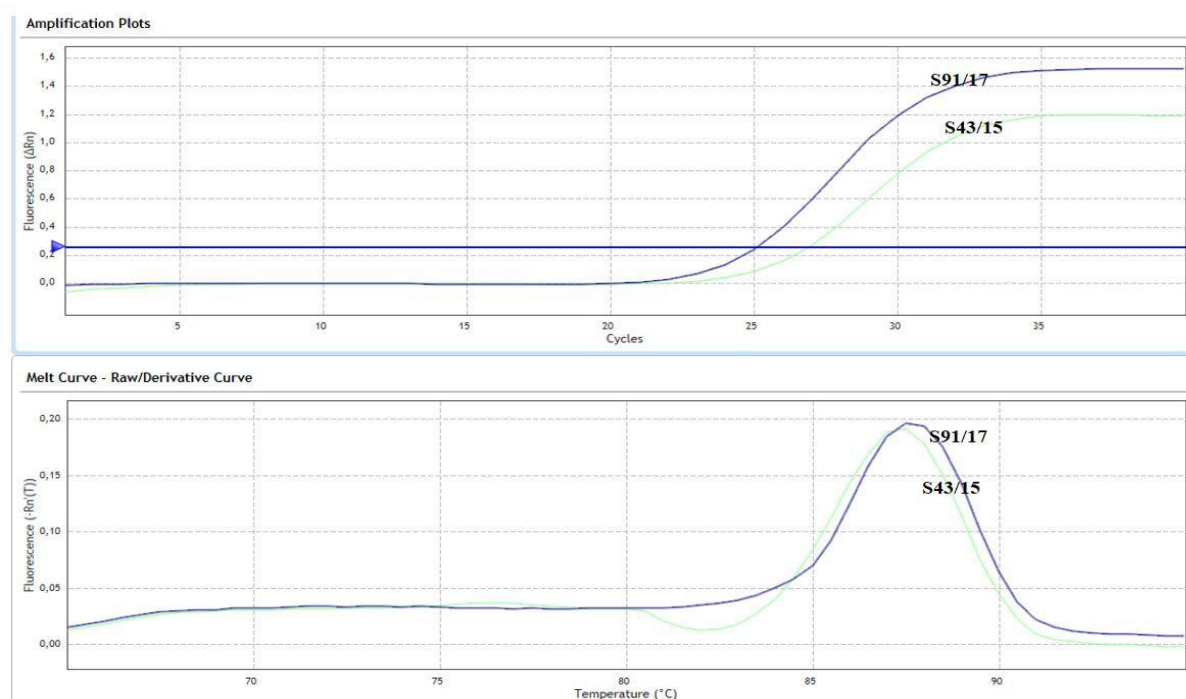


Figure 19 : Courbe amplification par Sybr Green et température de fusion correspondante

III-VI.3. Confirmation par migration sur gel

Pour confirmer les résultats de Sybr Green une migration sur gel des amplicons (produits de PCR) a été réalisée afin de s'assurer que la taille du fragment amplifié correspond à ce qui est attendu (Figure 20). Ce gène est confirmé pour 6 souches suivantes S43/15, S12/16, S13/16, S46/17, S73/17 et S91/17.

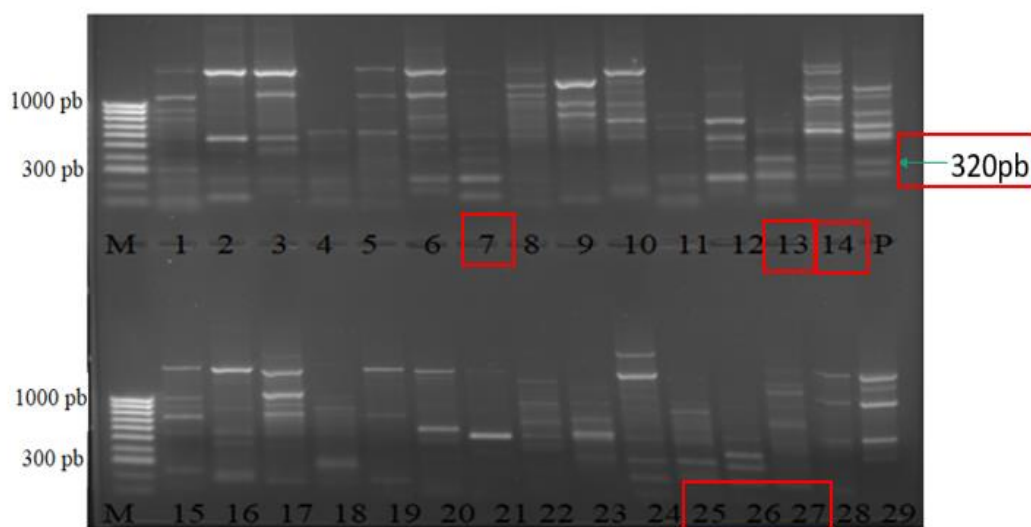


Figure 20 : Confirmation du gène mcr-1 par migration sur gel

M: Marqueur (100pb), 1:S7/15, 2:S27/15, 3:S30/15, 4:S34/15, 5:S41/15, 6:S42/15, 7:S43/15, 8:S1/16, 9:S2/16, 10:S4/16, 11:S8/16, 12:S10/16, 13:S12/16, 14:S13/16, 15:S14/16, 16:S15/16, 17:S4/17, 18:S6/17, 19:S11/17, 20:S15/17, 21:S16/17, 22:S20/17, 23:S38/17, 24:S42/17, 25:S46/17, 26:S73/17, 27:S91/17, 28:S93/17, 29:S96/17.

III-VII. Suivi sérologique de la vaccination

La vaccination de 10 animaux préalablement identifiés a été réalisée par voie sous cutanée (annexes 12 et 13). Les échantillons sanguins ont été collectés dans des tubes secs à intervalle de temps régulier (J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49, J56, J63 et J77). Les prélèvements ont été centrifugés à 2500g, puis le sérum a été aseptiquement collectés et conservés à -20°C jusqu'au analyse. Les résultats obtenus brutes sont sous forme de DO, et à partir de ces valeurs on calcule le pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\text{Sample's Coeff.} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD negative serum}}{\text{OD positive serum} - \text{OD negative serum}} \times 100$$

Les résultats des analyses exprimés sous forme de pourcentages d'inhibition sont présentés dans le tableau 9 ; et le suivi de la séroconversion est illustré dans la figure 21.

Le seuil de positivité est 23%.

Les animaux N°1, 3, 4, 9, 22 et 31 ont été positifs à J0 de ce fait pour ne pas fausser notre interprétation ces animaux ont été éliminés de l'étude.

Les animaux N° 11 et 12 sont séro-convertit à J7 et reste positifs jusqu'au J7 (jour 42 de l'expérimentation) et J0 (jour 35 de l'expérimentation) après rappel respectivement.

L'animal N° 14 est séro-convertit à J21, après il est resté négatif le long de l'expérimentation.

L'animal N° 34 est séro-convertit à J7 et resté positif le long de l'expérimentation.

Lors de cette expérimentation, on note une séroconversion (tableau 9 et figure 21) qui n'a pas duré très longtemps et les valeurs du pourcentage d'inhibition ont régressés rapidement.

Tableau 9 : Résultats des pourcentages d'inhibition des sérums ovins analysés par ELISA *Mannheimia haemolytica* (BioX)

N°	J0	J7	J14	J21	J28	J35	J42	J49	J56	J63	J77
1	51,417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	67,814	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	127,834	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	39,676	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	16,498	31,984	29,453	31,984	29,049	26,012	24,595	21,862	22,47	20,816	47,324
12	21,053	36,235	36,336	35,729	37,652	28,543	22,976	21,761	23,988	7,052	32,625
14	17,713	17,409	17,611	39,271	11,437	8,704	9,109	20,142	14,474	13,254	10,11
22	35,121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	28,644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	19,939	40,891	38,563	37,045	31,68	36,741	39,069	33,3	38,563	29,992	24,299

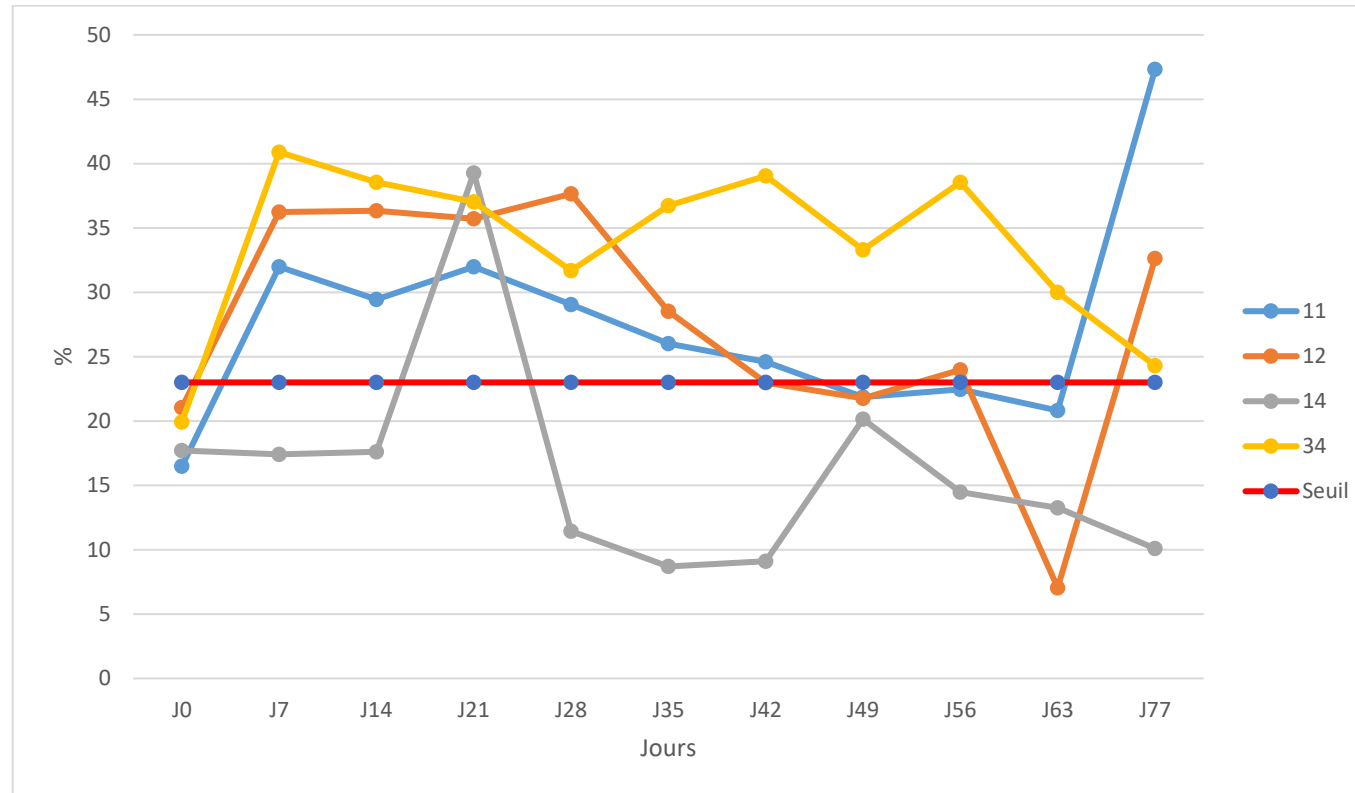


Figure 21 : Cinétique de la séroconversion après vaccination des ovins

Ce graphe représente la séroconversion de chaque animale après vaccination par voie sous cutanée, c'est des courbes dont l'axe d'abscisses correspond aux jours après vaccination et l'axe d'ordonnée correspond au pourcentage calculé. Comme vous le voyez tous les courbes sont au-delà du seuil sauf pour l'animal 14 séro-convertit à J21, après il est resté négatif le long de l'expérimentation.

Chapitre IV-
Discussion

Le présent travail a été entrepris dont les objectifs étaient, d'isoler les souches *Pasteurella* responsable des cas de maladies cliniques chez les ruminants, d'identifier les bactéries par coloration Gram, catalase, oxydase et par outil moléculaire, d'étudier le pouvoir pathogène des souches sélectionnées sur souris et de réaliser un antibiogramme en testant des antibiotiques usuellement utilisés en médecine vétérinaire pour aboutir à la production d'un lot de vaccin expérimental à partir d'une souche sélectionnée et évaluer sa protection.

L'étiologie de la pasteurellose est souvent multifactorielle (Taylor et al., 2010), les pertes élevées chez les animaux en détresse respiratoire sont toujours associées à des infections virales (primaires), mycoplasme et bactéries (Grissett et al., 2015 ; Panciera et al., 2010).

Au Maroc, les données d'études scientifiques sur les maladies respiratoires causées par le genre *Pasteurella* sont très rares, à l'exception de quelques données éparses liées à l'élevage intensif de bovins. Les éleveurs et les vétérinaires praticiens déclarent souvent des foyers de détresse respiratoire chez les bovins et les ovins. Par ailleurs, l'isolement des pasteurelles et leur association à la pasteurellose reste toujours controversé.

Les souches *M. haemolytica* et *P. multocida* sont parmi les bactéries les plus importantes qui sont impliquées dans les infections respiratoires des ruminants comme agent pathogène primaire ou secondaire associé à des taux élevés de mortalité. Ces bactéries sont omniprésentes dans la population des ruminants en tant que commensales nasopharyngées normales et, après un stress ou une infection virale, elles peuvent proliférer et être inhalées dans les poumons. Chacune possède son propre cadre de facteurs de virulence, notamment le biofilm, les capsules, les adhésines, les toxines et les enzymes, qui améliorent sa capacité à coloniser les voies respiratoires inférieures, à échapper au système immunitaire, ainsi elles peuvent résister aux traitements antimicrobiens pour provoquer la destruction des tissus et inciter à la réponse inflammatoire intense (Panciera et al., 2010).

Cette observation nous a poussé à poser les questions suivantes, notamment ; Est ce que les symptômes observés dans les élevages marocains sont dus à des souches de *Pasteurella* ? Comment se répartissent -elles ? Et quelle est leur pouvoir pathogène ?

Plusieurs approches ont été utilisées pour répondre à ces questions, à savoir, l'identification bactérienne, l'étude histologique sur les poumons d'animaux morts, l'identification moléculaire et l'antibiogramme. Par ailleurs, des investigations ont été menées, durant la période entre janvier 2015 à Décembre 2017, dans six régions différentes du Royaume du Maroc :

Tanger-Tetouan-El houceima, Draa-Tafilalet, Casablanca-Settat, Rabat-Sale-Kenitra, Oriental, Beni-Mellal-khenifra. Les animaux des élevages enquêtés ont présenté de la fièvre et des signes cliniques respiratoires rappelant la maladie de la pasteurellose tels que : L'écoulement nasal, détresse respiratoire, polypnée et parfois les animaux succombent en quelques jours. Et nous avons pu isoler 67 souches dont 51 à partir des écouvillons nasaux et 16 à partir des poumons.

Sur le plan microscopique, les résultats corroborent avec les signes cliniques en se basant sur les commémoratifs déclarés par les vétérinaires praticiens ainsi qu'avec le tableau lésionnel retrouvé par l'examen histopathologique sur les animaux morts prélevés. En effet, des lésions de bronchopneumonie aiguë sévères ont été observées dans les poumons des bovins et des moutons examinés à savoir Œdème grave et infiltration fibrino-leucocytaire des espaces interlobulaires, et espaces pleuraux pulmonaires, hyperémie et infiltration leucocytaire dans la lumière des espaces alvéolaires et des bronches et nécrose pulmonaire parenchymale sévère avec présence de colonies bactériennes, une infiltration leucocytaire grave dans les espaces alvéolaires et les bronches secondaires et la nécrose pulmonaire parenchymale grave Infiltration leucocytaire grave et diffuse et nécrose pulmonaire parenchymale. De tels changements tissulaires ont été décrits dans la littérature chez les bovins infectés par ces bactéries (Lopez, 2001, Zecchinon and Desmecht, 2005).

Les résultats de la distribution de la maladie par région étudiée ont montré que 100% des échantillons prélevés ont été positifs pour les bactéries impliquées dans la pasteurellose à Oujda, Benslimane et Berrchid, cependant une confirmation minimale de 24 % a été enregistrée dans la région de Larache.

La PCR de sérotype qui permet la détection de type capsulaire s'est avérée être une méthode sensible dont le principe est basé sur le mécanisme de répllication de l'ADN *in vivo* : l'ADN bicaténaire est déroulé en ADN monocaténaire, puis dupliqué et réenroulé, selon des cycles répétitifs comprenant les trois étapes dénaturation, hybridation et extension, comme l'a indiqué précédemment (Townsend et al., 2001) et (Al-Maary et al., 2017).

D'après les résultats obtenus lors de l'essai de confirmation par PCR sur gel, il apparaît clairement que *M. haemolytica* (Guenther et al, 2008) avec une prévalence de 51% est la bactérie dominante dans tous les échantillons analysés dans les six régions étudiées, comparativement à *P. Multocida* (Townsend et al, 2001) qui n'a présenté que 13%. Elle a été isolée dans les régions suivantes : Draa-Tafilalet, Casablanca-Settat, Rabat-Sale-Kenitra, Beni-Mellal-khenifra.

Pour pouvoir ensuite attribuer une résistance détectée par la mesure des CMI à l'expression d'un gène *mcr*, il faut détecter la présence de ce gène à l'aide de techniques moléculaires, qui sont les seules permettant un diagnostic spécifique de certitude selon le haut conseil de la santé 2016. L'EUCAST souligne la nécessité d'un contrôle rigoureux de la qualité de toute méthode et recommande aussi d'inclure le contrôle de qualité *E. coli* NCTC 13846 résistant à la colistine (*mcr-1* positif).

La colistine est l'un des rares antibiotiques encore actifs. Sa résistance est complexe et très variée, d'une part par la présence de diverses mutations chromosomiques et d'autre part par l'apparition récente d'une résistance plasmidique *mcr*. Les altérations chromosomiques conduisent à l'apparition de résistances non transférables horizontalement et donnent un « coût énergétique » à la bactérie. Concernant la résistance plasmidique, bien qu'elle soit plus prévalente dans le monde animal, le plasmide a toutes les caractéristiques pour diffuser vers l'homme. La résistance à la colistine est un problème majeur de santé publique et conduit à une impasse thérapeutique et à un risque accru de mortalité. C'est pourquoi, il est primordial pour les laboratoires de détenir des techniques fiables et reproductibles afin de bien détecter cette résistance pour limiter sa diffusion et préserver la colistine comme antibiotique de dernier recours.

Ce travail a fait aussi objet d'une étude du pouvoir toxique des souches isolées dont la but de choisir une souche destinée pour la production d'un vaccin efficace, En outre, 43 souches ont induit un taux de mortalité de plus de 50 % chez les souris infectées expérimentalement. Ainsi l'étude du pouvoir pathogène a montré que les souches isolées sont classées comme souches hypertextoxiques, ce qui explique la mort des souris en 24 h.

En occurrence, malgré la vaccination et l'antibiothérapie pratiquées à grande échelle, la maladie est toujours présente ce qui suspecte une résistance des souches vis-à-vis des antibiotiques. Pour confirmer cette hypothèse, 41 souches isolées dans cette étude, réparties sur les 6 régions du Royaume, ont fait l'objet du test de l'antibiorésistance.

Le test de sensibilité aux antimicrobiens *in vitro*, n'indique pas systématiquement qu'un antimicrobien serait efficace *in vivo* ; puisqu'il ne tient pas compte des autres facteurs tels que : le pH au niveau du site d'infection, les défenses de l'organisme...etc. L'antibiogramme des isolats ont été effectués à l'aide de la méthode de diffusion sur disque de Kirby-Bauer, (Hudzicki, 2009).

Ce test a été réalisé sur les souches de pasteurelles isolées (34 *Mannheimia haemolytica* et 07 *Pasteurella Multocida*). Tous les isolats ont montré une résistance aux antibiotiques testés à un taux supérieur à 14 %, sauf pour un isolat de *P. multocida* qui n'avait pas de profil de résistance contre l'AMC.

Le niveau de résistance le plus élevé (100%-82,4%) a été trouvé pour (NA) et (UB) (familles des quinolones), qui correspondaient aux taux de *Pasteurella multocida* serogroup A et de *Mannheimia haemolytica* respectivement contrairement au travail effectué par (Onat et al 2010) qui ne représente aucune résistance de *Mannheimia haemolytica* vis à vis des cinq antibiotiques testés et qui note une résistance de *Pasteurella multocida* envers Enrofloxacin et Sulfamethaxazole mais avec un pourcentage minime de 3,7%. Ainsi, le résultat de résistance obtenue suggère que ces antimicrobiens ne devraient pas être utilisés de façon répétée pour le contrôle et le traitement de la pasteurellose.

Les ratios de sensibilité étaient compris entre (0-85,7%) pour *Pasteurella multocida* serogroup A qui correspondent respectivement aux antibiotiques STR, AMC et FFC (à ratio égal) et (NA). Quant à *Mannheimia haemolytica*, les ratios de sensibilité étaient entre (79,4%-17,6%) incluant (AMC) et (UB). Des résultats similaires ont été rapportés par (Onat et al, 2010). En effet, la surveillance de la sensibilité aux antimicrobiens des espèces de *Pasteurella* est essentielle pour déterminer le développement de la résistance. Des augmentations de la résistance aux antibiotiques chez les deux espèces de *Pasteurella* ont été signalées ces dernières années (Welsh et al., 2004 ; Catry et al., 2006 ; Hendriksen et al., 2008) et confirmées dans notre étude par des profils de résistance au moins pour trois classes d'agents antimicrobiens.

Sur la base de la valeur p des tests statistiques (Fisher et Khi-2), un résultat significatif (Résistance versus familles d'antibiotiques) a été obtenu par les bêta-lactamines, en particulier les familles AMC ($p=0,009$) et macrolides ($p<0,001$), ce qui est très proche des résultats rapportés précédemment par (Onat et al., 2010). Donc, nous pouvons dire que les tests statistiques n'ont pas révélé de différences significatives entre la famille des bêta-lactamines et celle des macrolides. De ce fait, le choix de l'un de ces antimicrobiens dans le traitement repose sur le coût de chacun d'eux.

En parallèle, lors de ce travail nous avons noté la présence des MDR, de ce fait nous avons complété le panel antibiogramme par la colistine qui est un antibiotique de la famille des polymyxines.

La colistine est l'un des derniers recours médicaux efficaces pour le traitement des infections à Gram négatif multirésistantes et qui possède un spectre d'activité antibactérien étroit limité aux bactéries gram-. La méthode de microdilution en bouillon selon la norme ISO 20776-1 a été choisie comme méthode de référence. 41 souches de bactéries à Gram négatif ayant des profils de sensibilités vis-à-vis de la colistine variable, ont été testées. Cette étude conclut que les tests en gradients de diffusion sous-estiment les valeurs de la CMI et doivent ainsi être évités même lorsque les résultats du contrôle de qualité se trouvent dans les valeurs limites.

Les tests de sensibilité à la colistine sont techniquement difficiles en raison de plusieurs problèmes. Tout d'abord, la colistine diffuse très mal en gélose. Ensuite, les polymyxines se lient à une gamme de plastiques et de verre, y compris les plastiques les plus courants (polystyrène et polypropylène) utilisés dans les plateaux de microdilution des tests de sensibilité en laboratoire, ce qui augmente les problèmes de fiabilité et de reproductibilité (ECDC, 2016 ; Humphries, 2015).

Actuellement, les techniques de détermination de la CMI (diffusion en milieu gélifié ou en gradient de concentrations) ne sont plus recommandées en raison de la mauvaise diffusion de la colistine dans la gélose (Gales et al, 2001). La corrélation des CMI avec les diamètres des zones de diffusion des disques avaient déjà été considérée comme problématique il y a plus de 30 ans (Barry, 1976). De plus, de nombreuses études ont montré une variabilité significative entre les résultats de la CMI lors de l'utilisation de différentes méthodes et la présence d'erreurs très importantes pour certaines (Hindler & Humphries, 2013 ; Dafopoulou et al., 2015).

Ces problèmes ont été largement étudiés par le Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST) et le Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI). Les deux recommandent, comme seule méthode de test de sensibilité fiable et reproductible, la détermination de la CMI par méthode de microdilution en bouillon selon le standard ISO 20776-1. Ils précisent d'utiliser un milieu liquide Mueller-Hinton ajusté en cations, de réaliser le test avec la colistine sulfate (et non la colistine méthanesulfonate : CMS) et d'utiliser des plaques de titrage en polystyrène dépourvues de prétraitement. Aucun autre additif tel que les polysorbates ne doit être utilisé (EUCAST, 2016).

Le Haut Conseil de la Santé Publique, en 2016, a donc pris des décisions pour détecter ces souches résistantes à la colistine associées au gène *mcr-1*. Il est ainsi recommandé de déterminer la CMI de la colistine par la méthode de référence de microdilution en milieu liquide selon les recommandations du CA-SFM/EUCAST 2017. La résistance s'exprime le plus souvent à bas niveau avec des valeurs de CMI rapportées 2 mg/L.

Cependant, depuis de nombreuses années, une émergence de bactéries multi-résistantes (BMR) est observé. L'émergence des BMR et leur diffusion sont le résultat de deux facteurs conjoints : la pression de sélection par les antibiotiques et la transmission des souches résistantes, transmission croisée, ou des supports génétiques de la résistance (plasmides) selon le *Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales*.

Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique.

Par ailleurs, la production de vaccin a été réalisée en tenant compte des normes et guide pour les bonnes pratiques de fabrication de vaccin à partir de la souche S32/15. Les différents contrôles effectués, à savoir : le contrôle d'inactivation, physico-chimique et biologique, confirmaient la bonne qualité de la production. L'évaluation du pouvoir immunogène a été réalisé, les résultats satisfaisants de l'essai d'efficacité du vaccin inactivé, indiquent que le vaccin est insuffisant pour induire une réponse immunitaire protectrice justifié par l'absence de tous signes cliniques et toutes lésions macroscopiques lors du suivi. Le suivi est réalisé en utilisant le kit Elisa Monoscreen pour la détection de *Mannheimia Haemolytica*. L'analyse des résultats obtenus a révélé la présence d'une séroconversion qui n'est pas assez importante qui peut être due au kit utilisé destiné aux bovins et donc le critère spécificité est mis en cause. En plus, les résultats obtenus ne sont pas spécifiques du fait qu'il s'agit d'une Elisa indirecte. On note l'augmentation du % à partir de J7, ceci implique l'installation des anticorps. Après, le % diminue, à cette étape, il faut intervenir en faisant un rappel, ce dernier a été réalisé à J35.

Ces résultats de séroconversion obtenus peuvent être améliorés en jouant sur les facteurs qui peuvent augmenter l'immunogénicité et la croissance bactérienne à savoir la culture dans un milieu enrichi comme le milieu (BCC), pH=7,2 et l'incubation dans une étuve à 37°C assurant l'aération et l'agitation

Enfin, l'étude décrite ici a confirmé la mauvaise gestion des élevages des ruminants marocains, avec la possibilité d'échec d'antibiothérapie et la thérapie préventive d'où l'obligation de revoir la stratégie de contrôle des autorités compétentes dans ce domaine.

Conclusion générale & Perspectives

L'étude que nous avons menée est le premier rapport qui décrit une étude sur le terrain vis-à-vis de la pasteurellose et qui a confirmé la circulation de *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* chez les ruminants au Maroc. Les échantillons prélevés à partir des ruminants présentant les symptômes de la maladie étaient positifs. La bactérie a été détectée dans des échantillons obtenus auprès de six régions différentes du Royaume du Maroc (Tanger-Tetouan-El houceima, Draa-Tafilalet, Casablanca-Settat, Rabat-Sale-Kenitra, Oriental, Beni-Mellal-khenifra) indiquant des épidémies généralisées. En effet, nous avons isolé *Mannheimia haemolytica* dans 51% des cas et *Pasteurella multocida* dans 13% des cas. Ces résultats ont été réaffirmés par l'étude histologique et l'étude du pouvoir pathogène sur souris, ces isolats étaient fortement pathogènes.

Sur le plan thérapeutique, le test de sensibilité aux antimicrobiens *in vitro* a révélé que les pasteurelles manifestent une résistance envers les antibiotiques habituellement utilisés dans le traitement. De ce fait, pour les deux espèces de *pasteurella*, la famille des bêtalactamines et macrolides promettent d'être d'excellents composées pour la thérapeutique des maladies respiratoires bactériennes et que la multirésistance aux médicaments (MDR) était présente chez tous les isolats. Pour remédier à ce problème, le recours au laboratoire devrait être plus souvent envisagé et le traitement devrait être basé sur les résultats du test de sensibilité.

En plus, nous avons rapporté dans cette étude non seulement la présence de résistance à la colistine au Maroc mais en outre que les tests de gradient de diffusion sous-estiment les valeurs de CMI et devraient donc être évités même lorsque les résultats du contrôle de qualité sont dans les valeurs limites. Il est immédiatement nécessaire de reconsidérer l'utilisation appropriée de la colistine en médecine vétérinaire. De telles mesures permettront de réduire le risque zoonotique que peut représenter les bactéries porteuses du gène *mcr-1*, notamment chez les ruminants.

Cette étude constitue une étape cruciale ; et ce par la recherche et le développement de vaccin comme outil médical de prévention et de gestion des risques.

Ce travail ouvre des perspectives et peut être poursuivi par d'autres investigations à savoir l'augmentation du panel d'échantillonnage et continuation de l'isolement de *PM* & *MH* en circulation au Maroc, réalisation d'une autre production de vaccin en changeant soit la souche soit les paramètres de culture soit carrément la technologie.

Toutefois, une éventuelle synergie entre les virus respiratoires et les mycoplasmes n'est pas à exclure, pour cela il est indispensable d'entreprendre des recherches en vue de diagnostic

différentiel par rapport aux maladies respiratoires virales dont les symptômes sont identiques à la pasteurellose.

Par ailleurs, le séquençage du génome total des souches pasteurelles caractérisées et leur comparaison avec celles de références internationales est primordial, afin de connaître l'origine des nouvelles souches circulantes et pour savoir si elles sont introduites sur le terrain ou elles sont nouvellement immergées par mutation génétique. De même, il faut réaliser le clonage des gènes spécifiques pasteurelles, dans un vecteur d'expression de type Baculovirus et/ou plasmide d'expression bactérien, afin de les purifier sous forme recombinants. Ceci permettra d'induire une excellente immunité contre les souches en circulation au Maroc. Aussi, le but final est la sélection d'une souche (s) candidate (s) pour assurer une meilleure protection contre la pasteurellose et revoir la stratégie de lutte assurée par les autorités compétentes Marocaines.

Références Bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul Momin, M. H. F., Bean, D. C., Hendriksen, R. S., Haenni, M., Phee, L. M., & Wareham, D. W. (2017).** CHROMagar COL-APSE: A selective bacterial culture medium for the isolation and differentiation of colistin-resistant Gram-negative pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 66, 1554–1561. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000602>.
- Al-Maary, K. S., Dawoud, T. M., Mubarak, A. S., Hessain, A. M., Galal, H. M., and Kabli, S. A. 2017.** “Molecular Characterization of the Capsular Antigens of *Pasteurella multocida* Isolates Using Multiplex PCR.” *Saudi J. Biol. Sci.* 24: 367-70.
- Anonyme. (1987).** Bronchopneumonie infectieuse : un problème économiquement grave n°123, VETOMECUM, 1-2.
- Bain R.V.S. (1964).** La Septicémie hémorragique. *Études Agricoles de la F.A.O.* N°62.
- Barry AL (1976).** The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Philadelphia: Lea & Febiger; 236 p.
- Basset I. (1946).** Quelques maladies infectieuses. Paris Vigot-Frères.
- Bauman, S. J., and Kuehn, M. J. (2006).** Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect.* 8, 2400–2408. doi: 10.1016/j.micinf.2006.05.001
- Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris & M. Turck, 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, (4), 493–496.
- Beveridge, T. J. (1999).** Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 181, 4725–4733.
- Bevill, R.F. (1988).** Sulfamides in veterinary pharmacology and therapeutics 6th ed. (ed., Booth, N.H. and McDonald, L.E) pp.785-495.
- Blood D.C et HENDERSON J.A. (1976).** Médecine Vétérinaire - 2e édition française d'après la 48^e édition anglaise. Vigot Frères éditeurs – PARIS.
- BOLOTNIKOV I.A. and SHAKHIDZH L.G. (1971).** Radiophosphorus labelling of some antigenic fraction Of *Pasteurella multocida*. N°6 (38-39) Leningrad.

BOILEAU J.J.A. (1971). La Pasteurellose à *Pasteurella multocida* Zoonose d'avenir. Th. Doc. vêt Alfort, N°6D.

Buffard. S. (2004). Intérêt médical, zootechnique et économique de l'association d'un vaccin contre *Mannheimia haemolytica* à un vaccin RS-BVD chez les taurillons. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes, 67p.

Carter G. R. (1967). Pasteurellosis : *P. multocida* and *pasteurella haemolytica*. Adv.Vet. sci., 11:321-379.

Carter G.R.J, ANNAU E.J. (1958). Isolation of capsular polysaccharides from colonial variants of "*pasteurella multocida*" Amer. J. Veto Res, 14:475-478.

Carter G.R. (1955). A haemagglutination test for the identification of serological types. Am. J. Vet. Res., 16 : 481-484.

Catherine S. (2005). Aspect thérapeutique des bronchopneumonies à *Pasteurella* chez les bovins : résultats d'un essai clinique avec association antibiotique - AINS. Thèse pour le Doctorat vétérinaire, Faculté de médecine de Lyon, 124p.

Catry, B., A. Decostere, S. Schwarz, C.Kehrenberg, A.de Kruif & F. Haesebrouck, 2006. Detection of tetracycline-resistant and susceptible Pasteurellaceae in the nasopharynx of loose group-housed calves. Veterinary Research Communications, 30, (7), 707–715.

Chang V.F., Young R., Post D., Struck D.K. (1987). Identification and characterization of the *Pasteurella Haemolytica* leucotoxine. Infect.Immun. 55:2348-2354.

Chappel, L.R. (1990). Chemistry and pharmacodynamics of danofloxacin scientific papers presented at a symposium on advocin Salvador, Bahia, Brazil.

Chatterjee, D., and Chaudhuri, K. (2011). Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. FEBS Lett. 585, 1357–1362.

Chattopadhyay, M. K., and Jaganandham, M. V. (2015). Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. Front. Microbiol. 6:758.

Clinkenbeard k.D., Clarke C.R., Morton R.J., Panciera R.J. (1992). Role of *pasteurella haemolytica* leukotoxin in virulence and immunity in shipping fever pneumonia. Compending on Continuing Education for the practicing Veterinarian.14,1249-1262.

- CURASSON G (1947).** Maladies Infectieuses des Animaux domestiques. Tome II - Maladies microbiennes. 10e édition, Vigot Frères éditeurs, 1947 – PARIS.
- Dafopoulou K, Zarkotou O, Dimitroulia E, Hadjichristodoulou C, Gennimata V, Pournaras S (2015).** Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Non susceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 59(8):4625- 30.
- DAVIS W. JOHN, LARS H. KARSTAD, DANIEL O. TRAINER (1970).** Infectious diseases of wild mammals. First edition. The IOWA State University Press, AMES, IOWA, USA.
- Devoe, I. W., and Gilchrist, J. E. (1973).** Release of endotoxin in the form of cell wall blebs during in vitro growth of *Neisseria meningitidis*. J. Exp. Med. 138, 1156–1167.
- DHANDA M.R. (1959).** Immunisation des bovins contre la Septicémie hémorragique avec un antigène capsulaire purifié. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., tome XII (NS), N°2.
- Dorward, D. W., Schwan, T. G., and Garon, C. F. (1991).** Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. J. Clin. Microbiol. 29, 1162–1170.
- Douart A. (2002).** Les pasteurelloses des petits ruminants. In Veterianire n° special: Pathologie ovine et caprine, 33:86-89.
- Elhenawy, W., Bording-Jorgensen, M., Valguarnera, E., Haurat, M. F., Wine, E., and Feldman, M. F. (2016).** LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in *Salmonella*. MBio 7:e00940-16.
- Ellis, T. N., and Kuehn, M. J. (2010).** Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 81–94.
- Elmi, A., Watson, E., Sandu, P., Gundogdu, O., Mills, D. C., Inglis, N. F., et al. (2012).** *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 80, 4089–4098.
- Eshetu, M. 1991.** “Pneumonic Pasteurellosis in Sheep Slaughtered at Addis Ababa Abattoir.” Debre-Zeit: DVM thesis, FVM, AAU

ESPINASSE J. (1981). Milieu et troubles respiratoires des ruminants. In milieu pathologie et prévention chez les ruminants. INRA.Publi ; 63-74.

Espinasse J., Faye P., Asso J. (1977). Les infections respiratoires dans le veau. Maloine.S.A. Editeur Paris.

Esposito, F., Fernandes, M. R., Lopes, R., Muñoz, M., Sabino, C. P., Cunha, M. P., ... Lincopan, N. (2017). Detection of colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* using inhibition by EDTA and zeta potential assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 55, 3454–3465. <https://doi.org/10.1128/JCM.00835-17>.

Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T. L., et al. (1999). Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J. Pathol.* 188, 220–226.

Gagliardi G et Carlotto F. (1977). Les maladies respiratoires dans l'élevage industriel pour la production de viande bovine. *Bull. off. int. Epiz.* 88:81-87.

Gales AC, Reis AO, Jones RN (2001). Contemporary Assessment of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Polymyxin B and Colistin: Review of Available Interpretative Criteria and Quality Control Guidelines. *J Clin Microbiol.* 39(1):183- 90.

Gauthév G (1972). Une association virale et bactérienne : la Grippe bovin⁸ à myxovirus para-influenza type III et la Pasteurellose bovine. *Th. Doc. Vét., Lyon*, N°36.

Grissett, G. P., White, B. J., and Larson, R. L. 2015. “Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex.” *J. Vet. Intern. Med.* 29: 770-80.

Gross R.L and Newberne P.M. (1980). Role of nutrition in immunology function. *Physiol.Rev*; 60: 188-302.

Hendriksen, R. S., D. J.Mevius, A.Schroeter, C.Teale, D.Meunier, P. Butaye &D.W asyl,(2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle indifferent European countries : 2002 – 2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 10, 1–10.

Hjerpe, C.A. et Routen, T.A. (1976). Considérations théoriques et pratiques concernant le traitement par les sulfamides et les antibiotiques de la pneumonie bactérienne chez les bovins

à l'engrais dossiers de l'élevage, 2: 1-18.

Hindler JA, Humphries RM. (2013). Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *J Clin Microbiol.* 51(6):1678- 84.

Huber, W.G. (1988). Penicillins, aminoglycosides, macrolides, lincosamides, polyxines, tetracyclines and other bacterial drugs in veterinary pharmacology and therapeutics 6th ed (ed.,Booth, N.H. and McDonald. L.E) pp.813-847.

Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society of Microbiology, 1–14.

JacototH. (1927). La Pasteurellose des bœufs et des buffles en Indochine. Th. Doc. Vét-PARIS.

Kadurugamuwa, J. L., and Beveridge, T. J. (1999). Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other gram-negative bacteria. *Microbiology* 145(Pt 8), 2051–2060. doi: 10.1099/13500872-145-8-2051.

Humphries RM. Susceptibility Testing of the Polymyxins: Where Are We Now? Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther. janv 2015;35(1):22- 7. 28:<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/enterobacteriaceae-risk-assessment-diseases-caused-by-antimicrobial-resistantmicroorganisms-europe-june-2016.pdf>.

KarraniA.A. and Hariharan H. (1972). Incidents of Pasteurellosis among cattle in Somalia subsequent to dual vaccination. *Bull. Epi. Ois. Afr.*, 20, N°3, (205-209).

Keck, G et Meissonnier.E, (1992). Dictionnaire des médicaments vétérinaires au Maghreb, 1^{ère} édition, MV editions.

Keiss G.E., Will D.H., Collier J.R. (1964). Skin toxicity and hemodynamic properties of endotoxin derived from *Pasteurella Haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.*, 25/935-942.

Koeppen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., et al. (2016). A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLoSPathog.* 12:e1005672.

- Lees, P. (1991).** The pharmacokinetics of drugs used in the treatment of respiratory diseases I cattle and pigs proceedings of the royal veterinary college, Hazksheadcapus.
- Lindmark, B., Rompikuntal, P. K., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., Guerry, P and Wai, S.N. (2009).** Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 9:220.
- Lomba F. (1983).** Faut-il encore vacciner le jeune bétail contre les maladies respiratoires *L.E.B.*, 7 :31-33.
- Lopez, A. 2001.** “Respiratory System, Thoracic Cavity and Pleura.” In Thomson’s Special Veterinary Pathology. Mosby Inc., USA, 125-96
- Louembe O. (1976).** Le diagnostic sérologique des infections de *Pasteurella multocida*. *Sc. Nat., Univ. Paris-Sud, centre d'Orsay.*
- Maheswaran S.K., Johnson G.H, PomergyB.S. (1973).** Studies on *Pasteurella multocida* - The capsular polysaccharide from turkey iso1ates. *Avian diseases*, 17, N°4, (705-716).
- Manninger R et MocsyJ. (1959).** Traité des maladies internes des animaux domestiques. Tome I- les maladies infectieuses. 387^e édition, Vigot frères éditeurs-Paris.
- Martel J.L, Meunier D, Chalus-Dancla E. (2002).** Les pasteurelles bovines évolution du groupe, importance de l’antibiorésistance. *Bulletin de l’académie vétérinaire de France.* 155, 303-312.
- Martel J.L., Michel R. (1985).** Le rôle des pasteurelles dans les bronchopneumonies infectieuses. *Rec. Med. Vet.* 161 :1123-1130.
- Meyer G., Corbiere F., Foucras G., Cassard H., Schelcher F. (2004).** La prévention médicale et le traitement des maladies respiratoires chez les taurillons. *Bull GTV*, 27 :25-31.
- McAllister, H.A. (1979).** Antimicrobial agents and susceptibility tests in diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology Third ed. Carles C Thomas publisher.
- McBroom, A. J., and Kuehn, M. J. (2007).** Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 63, 545–558.
- Mutters R., Mannheim W., Hinz K.H. (1989).** Taxonomy of the group in *pasteurella* and *pasteurellosis* Academic Press, London, PP:3-34.
- Namioka S. (1978).** *Pasteurella multocida*. Biochemical characteristics and serotypes. In: *Methods in Microbiology*, 10. Academic Press, London, UK, 272292.

Namioka S. & Murata M. (1961). Serological studies on *Pasteurella multocida*. I: a simplified method of capsular typing of the organism. *Cornell Vet.*, 51, 498-507.

Nicks B et Dechamps P. (1986). Relation entre les conditions d'habitat et la pathologie infectieuse. *Ann. Med. Vet.*, 130: 485-496.

Nurhusein, Y. 2005. "Aerobic Bacterial Flora in the Respiratory Tract of Apparently Healthy Sheep Slaughtered in Dessie Abattoir." *Debre-Zeit: DVM thesis, FVM, AAU.*

O'Connor. A, Martin. SW, Nagy. E, Menzies. P, Harland. R. (2001). The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to *Haemophilus somnus* and *Mannheimia haemolytica* at 3 Ontario feedlots. *Can J Vet Res*, 65, 3, 2001: 143-150.

Onat, K., S. Kahya and K. T. Carli, 2010. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 34, (1), 91–94.

Panciera, R. J., and Confer, A. W. 2010. "Pathogenesis and Pathology of Bovine pneumonia." *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26 (2): 191-214.

Penn C.W., Nagy L.K. (1976). Isolation of a protective, non-toxic capsular antigen from *Pasteurella multocida* type Band E. *Research in Veterinary Science*, 20 (1), (90-96).

Perreau P. (1976). La Pasteurellose septicémique des bœufs et des buffles. *Maisons-Alfort, E.N.S.*, III, 84, avril, 1976.

Perreau P. (1969-1970). Cours de microbiologie systématique, Institut Pasteur - PARIS.

Pettit, R. K., and Judd, R. C. (1992). The interaction of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* with normal human serum. *Mol. Microbiol.* 6, 729–734.

Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). *Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes.* *Clinical Microbiology Reviews*, 30, 557–596.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>:

Poirel, L., Larpin, Y., Dobias, J., Stephan, R., Decousser, J.-W., Madec, J.-Y., & Nordmann, P. (2017). Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin

resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90, 7–10.

Prescott, J.F, Baggot, J.D. (1988). Antimicrobial therapy in veterinary medicine Blackwell Scientific publications.

Ronarc'h. S. (2006). Intérêt de l'association d'un vaccin contre *Mannheimia haemolytica* à un vaccin RS-BVD chez les taurillons. Thèse pour le Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes : 93p.

Roth, JA. (1988). How cattle defend themselves against *Pasteurella haemolytica* pneumonia. *Vet Med*: 1067-1072.

Sawada T., Rimler R. B. & Rhoades K.P. (1985). Haemorrhagic septicaemia: naturally acquired antibodies against *Pasteurella multocida* types B and E in calves in the United States. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 1247-1250.

Schwechheimer, C., Sullivan, C. J., and Kuehn, M. J. (2013). Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry* 52, 3031–3040.

Sellyei, B., Z. Varga, , K. Szentesi-Samu, É. Kaszanyitzky & T. Magyar, 2009.

Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry . *Acta Veterinaria Hungarica*, 57, (3), 357–367.

Shewen P.E., Wilkie B.N. (1982). Cytotoxin of *Pasteurella Haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* 35:91-94.

Shoberg, R. J., and Thomas, D. D. (1993). Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect. Immun.* 61, 3892–3900.

Stamantin (1958). Recherches concernant les pasteurelloses animales dans la République Populaire Boumaine. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 50, (212-221).

Sustronck B. (1997). Évolution des vaccins à *Pasteurella* dans la prévention des maladies respiratoires. Société Française de buiatrie. Paris, 1997. 300-303.

- Taylor, J.D., Fulton, R.W., Lehenbauer, T.W., Step, D.L., Confer, A.W., 2010.** The epidemiology of bovine respiratory disease: what is the evidence for predisposing factors? *Can. Vet. J.* 51, 1095–1102.
- Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., and Adler, B. 2001.** “Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System.” *J. Clin. Microbiol.* 39: 924-9.
- Turner, L., Praszkie, J., Hutton, M. L., Steer, D., Ramm, G., Kaparakis-Liaskos, M., et al. (2015).** Increased outer membrane vesicle formation in a *Helicobacter pylori* tolB mutant. *Helicobacter* 20, 269–283.
- Vanaja, S. K., Russo, A. J., Behl, B., Banerjee, I., Yankova, M., Deshmukh, S. D., et al. (2016).** Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. *Cell* 165, 1106–1119.
- Vestweber J.G., Klemm R.D., Leipold H.W., Johnson D.E., Bailie W.E., 1990.** Clinical and pathologic studies of experimentally induced *Pasteurella haemolytica* pneumonia in calves. *American Journal of Veterinary research*, 51:1792-1798.
- Walker R.D., Schultz T.W., Hopkins F.M., Bryant M.J. (1984).** Growth phase-dependent phagocytosis of *Pasteurella Haemolytica* by bovine pulmonary macrophages. *Am.J.Vet.Res.*45:1230-1234.
- Welsh, R. D., L. B. Dye, M. Payton & A. W. Confer, 2004.** Isolation and Antimicrobial Susceptibilities of Bacterial Pathogens from Bovine Pneumonia: 1994–2002. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation* 16, (5), 426-431.
- Wilkie. IW, Fallding.MH, Shewen.PE, Yager JA. (1990).** the effect of *Pasteurella haemolytica* and the leucotoxine of *Pasteurella haemolytica* on bovine lung explants. *Can J Vet Res*, 54, 1: 151-156.
- Wilkie, Javana., 1982.** Réponse immunitaire de l'appareil respiratoire aux agents pathogènes. 181 :1074-1079.
- Wijewardana T.G., De Alwis M.C.L. & Bastianz H.L.G. (1986).** Cultural, biochemical and pathogenicity studies on strains of *Pasteurella multocida* isolated from carrier animals and outbreaks of haemorrhagic septicaemia. *Sri Lanka Vet. J.*, 34, 4357.

Wizigmann G., Dirksen G., Sandersleben J.V., Geisel O., Held T., MayarA. (1977). La bronchopneumonie enzootiques des bovines études Clinique et nécroscopique. Pt.Vet ;6 :69-74.

Yao, J.D.C., Moellering, R.C.JR. (1991). Antibacterial agents, in manual of clinical microbiology 5TH ed. (eds.; Balows, C; A.; Hausler, W.J.JR.; Herrmann, K., Isenberg, H.D.; Shademy, H.J.) pp.878-882; American Society of microbiology, Washington, D.

Zecchinon L., Fett T., DesmechtD. (2005). How Mannheimia haemolytica defeats host defence through a kiss of death mechanism. **Vet. Res.**, 36:133-156.

Webographie

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. Mars 2016. Disponible sur : <http://www.eucast.org>.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). RAPID RISK ASSESSMENT - Plasmid-mediated colistin resistance in Enterobacteriaceae. 2016.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2017. V1.0 Mars.

Guide pour l'élaboration des monographies des vaccins pour usage vétérinaire, Pharmacopée Européenne Edition 2008.

Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP). Avis le 06 décembre 2016 relatif au diagnostic microbiologique des entérobactéries productrices de carbapénémases ou résistantes à la colistine renfermant le gène mcr-1.

OIE, 2008. World Animal Health Information Database - Version: 1.4. World Animal Health Information Database. Paris, France: World Organisation for Animal Health. <http://www.oie.int>.

OIE, 2013. World Animal Health Information Database - Version: 1.4. World Animal Health Information Database. Paris, France: World Organisation for Animal Health. <http://www.oie.int>.

OIE 2019 - World Organisation for Animal Health. June 20, 2019, from <http://www.oie.int/fr/normes/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>

Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN). Protocole BMR-RAISIN 2018. Disponible sur : invs.santepubliquefrance.fr.

Société nationale des groupements techniques vétérinaires, Novembre 2000.

<http://ovine.sngtv.pagesperso-orange.fr/Pasteurelloses.pdf>

Taxonomy of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 (Approved Lists 1980) emend. Mutters et al. 1985.<http://doi.namesforlife.com/10.1601/tx.3371>

Wikipedia France, 2006.[http ://fr.wikipedia.org/](http://fr.wikipedia.org/). Réaction en chaîne par polymérase.

Annexes

Annexe 1 : Fiche de prélèvements affections respiratoires

- 1- Identification de l'Élevage :
- 2- Province :
- 3- Tableau de prélèvements :

N° de Prélèvement (Identification du prélèvement)	N° identification de l'animal	Espèce animale (OV, CP, BV)	Age de l'animal	Date d'apparition des signes respiratoires	Date de prélèvement	Type de prélèvement*

***Les types de prélèvement et codes correspondants sont :**

- ☐ Ecouvillon nasal : EN
- ☐ Poumon : P (quantité suffisante de la partie lésée, minimum 5*5cm)

Nom et signature du Préleveur

Remarques : Les prélèvements doivent être collectés le plus aseptiquement possible, placés individuellement dans des flacons ou sac en plastique stérile, correctement identifiés, hermétiquement fermés et acheminés au laboratoire sous régime de froid

Annexe 2 : Extraction d'ADN

NucleoSpin® Tissue		
1 Prepare sample		Cut 25 mg into small pieces
2 Pre-lyse sample		180 µL T1 25 µL Proteinase K 56 °C, 1–3 h
3 Lyse sample		200 µL B3 70 °C, 10 min
4 Adjust DNA binding conditions		210 µL 96–100% ethanol
5 Bind DNA	 	Load all 11,000 x g, 1 min
6 Wash silica membrane	 1 st and 2 nd 	1 st wash 500 µL BW 2 nd wash 600 µL B5 11,000 x g, 1 min
7 Dry silica membrane		11,000 x g, 1 min
8 Elute highly pure DNA	 	100 µL BE (70 °C) RT, 1 min 11,000 x g, 1 min

Annexe 3: Résultats de dépistage par PCR en temps réel

Code	n° identification	Espèce	Type de prélèvement	Provenance	PCR en temps réel	
					PM(FAM)	MH(CY3)
S1/15	9626	Bovin	Poumon	Kénitra	30.09	0
S2/15	865	Bovin	Poumon	Kénitra	0	0
S3/15	9530	Bovin	Poumon	Kénitra	0	0
S4/15	9612	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	30.26	0
S5/15	795	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	37.70	0
S6/15	9521	Bovin	Poumon	Kénitra	31.62	0
S7/15	5312	Bovin	Poumon	Laarche	31.44	0
S8/15	93	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S9/15	9601	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S10/15	853	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S11/15	790	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S12/15	5123	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	0	0
S13/15	2290	Bovin	Poumon	Kénitra	0	0
S14/15	9546	Bovin	Poumon	Kénitra	0	0
S15/15	9538	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S16/15	1000	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S17/15	114	Bovin	Poumon	Laarche	0	0

S18/15	5238	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S19/15	5142	Bovin	Poumon	Laarche	0	0
S20/15	973	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	0	0
S21/15	NI	bovin	Poumon	Kénitra	0	0
S22/15	119 O	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	0	0
S23/15	851	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	0	0
S24/15	759	Bovin	Poumon	kénitra	0	0
S25/15	NI	Bovin	Poumon	kénitra	0	0
S26/15	l1	Bovin	Poumon	Moulay bouslhame	0	0
S27/15	123	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	27,8	0
S28/15	37	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S29/15	382	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S30/15	119 T	Ovin	écouvillon	Tinghir	28.73	0
S31/15	101	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S32/15	896	bovin	Poumon	Kénitra	0	22.25
S33/15	737	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	29.34	0
S34/15	371	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	29.44	0
S35/15	102	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S36/15	120	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S37/15	105	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S38/15	354	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0

S39/15	468	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S40/15	351	Ovin	écouvillon	Ouarzazate	0	0
S41/15	741/1	Ovin	écouvillon	Sidi bettach	31,93	0
S42/15	741/2	Ovin	écouvillon	Sidi bettach	32,21	0
S43/15	742/2	Ovin	écouvillon	Sidi bettach	32,08	0
S1/16	ATFI/1	Bovin	écouvillon	Benslimane	26.76	0
S2/16	AHMINE/1	Bovin	écouvillon	Berchid	15.21	19.95
S3/16	AHMINE/2	Bovin	écouvillon	Berchid	18.09	0
S4/16	AHMINE/3	Bovin	écouvillon	Berchid	18.10	0
S5/16	AHMINE/4	Bovin	écouvillon	Berchid	27.05	0
S6/16	ALI/1	Bovin	écouvillon	Berchid	25.90	0
S7/16	ALI/2	Bovin	écouvillon	Berchid	24.48	18.71
S8/16	ALI/3	Bovin	écouvillon	Berchid	24.70	23.80
S9/16	ALI/4	Bovin	écouvillon	Berchid	26.06	0
S10/16	ALI/5	Bovin	écouvillon	Berchid	26.69	15.76
S11/16	AZOUZ/1	Bovin	écouvillon	Berchid	18.75	27
S12/16	OMAR/1	Bovin	écouvillon	Tit Mellil	28.65	0
S13/16	OMAR/2	Bovin	écouvillon	Tit Mellil	29.40	0
S14/16	JALOUL/1	Bovin	écouvillon	Berchid	27.77	0
S15/16	JALOUL/2	Bovin	écouvillon	Berchid	22.60	0

S1/17	BR/SB	BOVIN	Pm	IAV	0	0
S2/17	BR/155	BOVIN	Pm	IAV	32,55	19,37
S3/17	BR/238	BOVIN	Pm	IAV	32,28	21,62
S4/17	BR/241	BOVIN	Pm	IAV	32,25	31,38
S5/17	AO/1	OVIN	Pm	IAV	0	0
S6/17	AO/2	OVIN	Pm	IAV	32,81	0
S7/17	08_16	velle	Pm	IAV	0	0
S8/17	04_15	vœu	Pm	IAV	31,69	0
S9/17	pm/16	vœu	Poumon	IAV	0	0
S10/17	1_2017	Vœu	écouvillon	Khmiss zmamra	33,99	0
S11/17	2_2017	Vœu	écouvillon	Khmiss zmamra	34,27	0
S12/17	3_2017	Vœu	écouvillon	Khmiss zmamra	32,17	0
S13/17	4267 male	bovin	Poumon	IAV	34,65	0
S14/17	4267 femelle	bovin	Poumon	IAV	32,24	0
S15/17	Pm	bovin	Poumon	LOUKKOUS	29,2	0
S16/17	souche oujda 2009	OVIN	Poumon	oujda	33	0
S17/17	souche oujda 2012	OVIN	Poumon	oujda	27,94	0
S18/17	CHADLI 6402	BOVIN	écouvillon	Mazarea	31,19	0
S19/17	CHADLI 9704	BOVIN	écouvillon	Basita I	0	0
S20/17	CHADLI 6	BOVIN	écouvillon	Laarache	33,91	0
S21/17	CHADLI 9694	BOVIN	écouvillon	Basita I	0	0

S22/17	CHADLI 9649	BOVIN	écouvillon	Basita I	28,07	0
S23/17	CHADLI 1	BOVIN	écouvillon	Laarache	34,97	21,96
S24/17	CHADLI 2	BOVIN	écouvillon	Laarache	0	0
S25/17	CHADLI 3	BOVIN	écouvillon	Laarache	0	0
S26/17	CHADLI 4	BOVIN	écouvillon	Laarache	0	0
S27/17	6671	VŒU	écouvillon	Laarache	0	0
S28/17	896	Ovin	écouvillon	Laarache	0	0
S29/17	760	Ovin	écouvillon	Laarache	34,7	12,09
S30/17	696	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S31/17	672	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S32/17	670	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S33/17	526	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S34/17	472	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S35/17	465	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S36/17	463	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S37/17	390	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S38/17	382	Ovin	écouvillon	Tinghir	32,12	0
S39/17	388	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S40/17	381	Ovin	écouvillon	Tinghir	33,17	32,19
S41/17	231	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S42/17	160	Ovin	écouvillon	Errachidia	33,5	0

S43/17	202-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S44/17	198	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S45/17	190	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S46/17	183	Ovin	écouvillon	Errachidia	33,22	0
S47/17	173	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S48/17	169	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S49/17	166'	Ovin	écouvillon	Errachidia	33,22	0
S50/17	166	Ovin	écouvillon	Errachidia	33,22	0
S51/17	161	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S52/17	159	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S53/17	159'	Ovin	écouvillon	Errachidia	33,07	22
S54/17	141	Ovin	écouvillon	Errachidia	32,62	0
S55/17	139-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S56/17	137-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	32,28	0
S57/17	108 Bis	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S58/17	108	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S59/17	112	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S60/17	92	Ovin	écouvillon	Errachidia	32,79	0
S61/17	77	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S62/17	8	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S63/17	72	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0

S64/17	26	Ovin	écouvillon	Errachidia	32,53	0
S65/17	389-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	32,81	0
S66/17	64	Ovin	écouvillon	Errachidia	33,13	0
S67/17	60-02	Ovin	écouvillon	Errachidia	0	0
S68/17	59-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S69/17	58-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S70/17	56-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S71/17	55-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S72/17	54-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S73/17	52-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	28
S74/17	46-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	0	0
S75/17	9218	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S76/17	9204	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S77/17	9295	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S78/17	9200	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S79/17	6989	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S80/17	7082	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S81/17	9297	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S82/17	9277	Vœu	écouvillon	Basita II	0	0
S83/17	1	Ovin	écouvillon	khnéfra	0	0
S84/17	2	veau	écouvillon	khnéfra	0	0

S85/17	3	brebis	écouvillon	khnéfra	0	0
S86/17	4	caprin	écouvillon	khnéfra	0	27
S87/17	5	bélier	écouvillon	khnéfra	22	0
S88/17	6	veau	écouvillon	khnéfra	0	0
S89/17	7	caprin	écouvillon	khnéfra	0	0
S90/17	8	ovin	écouvillon	khnéfra	0	0
S91/17	9	bélier	écouvillon	khnéfra	25	0
S92/17	10	veau	écouvillon	khnéfra	0	0
S93/17	11	caprin	écouvillon	khnéfra	0	30
S94/17	12	caprin	écouvillon	khnéfra	0	25
S95/17	13	Ovin	écouvillon	khnéfra	0	0
S96/17	14	Agneau	écouvillon	khnéfra	0	27
S97/17	15	Ovin	écouvillon	khnéfra	0	0
S98/17	16	Vache	écouvillon	khnéfra	0	0
S99/17	17	Agneau	écouvillon	khnéfra	0	0
S100/17	18	bélier	écouvillon	khnéfra	0	0
S101/17	19	brebis	écouvillon	khnéfra	0	0
S102/17	20	Caprin	Poumon	khnéfra	0	23
S103/17	21	Caprin	écouvillon	khnéfra	0	0
S104/17	22	Caprin	écouvillon	khnéfra	0	0

Annexe 4 : Résultats isolement bactériologique et identification

n° attribué	n° identification	Espèce	Type de prélèvement	Provenance	Coloration	catalase	oxydase
S1/15	9626	Bovin	Poumon	Kénitra	gram-	positive	positive
S4/15	9612	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	gram-	positive	positive
S5/15	795	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	gram-	positive	positive
S6/15	9521	Bovin	Poumon	Kénitra	gram-	positive	positive
S7/15	5312	Bovin	Poumon	Laarche	gram-	positive	positive
S27/15	123	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	gram-	positive	positive
S30/15	119 T	Ovin	écouvillon nasal	Tinghir	gram-	positive	negative
S32/15	896	bovin	Poumon	Kénitra	gram-	positive	negative
S33/15	737	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	gram-	positive	negative
S34/15	371	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	gram-	positive	negative
S41/15	741/1	Ovin	écouvillon nasal	Sidi bettach	gram-	positive	positive
S42/15	742/1	Ovin	écouvillon nasal	Sidi bettach	gram-	positive	negative
S43/15	742/2	Ovin	écouvillon nasal	Sidi bettach	gram-	positive	positive
S1/16	ATFI/1	Bovin	écouvillon nasal	Benslimane	gram-	positive	negative
S2/16	AHMINE/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	negative
S4/16	AHMINE/3	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	negative
S5/16	AHMINE/4	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	negative
S6/16	ALI/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	negative
S7/16	ALI/2	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	positive
S8/16	ALI/3	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	positive
S9/16	ALI/4	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	positive

S10/16	ALI/5	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	positive
S11/16	AZOUZ/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	positive
S12/16	OMAR/1	Bovin	écouvillon nasal	Tit Mellil	gram-	positive	positive
S13/16	OMAR/2	Bovin	écouvillon nasal	Tit Mellil	gram-	positive	negative
S14/16	JALOUL/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	positive
S15/16	JALOUL/2	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	gram-	positive	negative
S2/17	BR/155	Bovin	Poumon	IAV	gram-	positive	positive
S3/17	BR/238	Bovin	Poumon	IAV	gram-	positive	positive
S4/17	BR/241	Bovin	Poumon	IAV	gram-	positive	positive
S6/17	AO/2	Ovin	Poumon	IAV	gram-	positive	positive
S8/17	04_15	vœu	Poumon	IAV	gram-	positive	positive
S10/17	1_2017	Vœu	Ecouvillon	Khmisszmamra	gram-	positive	positive
S11/17	2_2017	Vœu	Ecouvillon	Khmisszmamra	gram-	positive	positive
S12/17	3_2017	Vœu	Ecouvillon	Khmisszmamra	gram-	positive	positive
S13/17	4267 male	Vœu	Poumon	IAV	gram-	positive	positive
S14/17	4267 femelle	Vœu	Poumon	IAV	gram-	positive	negative
S15/17	Pm	Vœu	Poumon	LOUKKOUS	gram-	positive	positive
S16/17	soucheoujda 2009	Ovin	Poumon	oujda	gram-	positive	positive
S17/17	soucheoujda 2012	Ovin	Poumon	oujda	gram-	positive	positive
S18/17	CHADLI 6402	bovin	Ecouvillon	Laarache	gram-	positive	positive
S20/17	CHADLI 6	bovin	Ecouvillon	Laarache	gram-	positive	positive
S22/17	CHADLI 9649	bovin	Ecouvillon	Laarache	gram-	positive	positive
S23/17	CHADLI 1	bovin	Ecouvillon	Laarache	gram-	positive	negative
S29/17	760	Ovin	Ecouvillon	Laarache	gram-	positive	negative
S38/17	382	Ovin	Ecouvillon	Tinghir	gram-	positive	positive

S40/17	381	Ovin	Ecouvillon	Tinghir	gram-	positive	positive
S42/17	160	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S46/17	183	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S49/17	166'	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S50/17	166	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	negative
S53/17	159'	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S54/17	141	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S56/17	137-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	gram-	positive	positive
S60/17	92	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S64/17	26	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S65/17	389-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	gram-	positive	positive
S66/17	64	Ovin	écouvillon	Errachidia	gram-	positive	positive
S73/17	52-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	gram-	positive	negative
S86/17	4	caprin	écouvillon	Khnéfra	gram-	positive	positive
S87/17	5	bélier	écouvillon	Khnéfra	gram-	positive	positive
S91/17	9	bélier	écouvillon	Khnéfra	gram-	positive	negative
S93/17	11	caprin	écouvillon	Khnéfra	gram-	positive	negative
S94/17	12	caprin	écouvillon	Khnéfra	gram-	positive	positive
S96/17	14	Agneau	écouvillon	Khnéfra	gram-	positive	positive
S102/17	20	Caprin	Poumon	Khnéfra	gram-	positive	positive

Annexe 5 : Préparation du gel d'agarose 2%

• **Préparation d'un gel d'agarose 2%**

- Préparer le moule et le peigne appropriés au nombre et au volume des échantillons à séparer ;
- Préparer suffisamment de tampon TAE 1X pour remplir la cuve et préparer le gel ;
- Dans un bécher en verre, peser la quantité d'agarose déterminée (pour obtenir un gel d'agarose à 2 % final, peser 2 g d'agarose, la resuspendre dans 100ml de tampon TAE 1X) ;
- Dissoudre complètement l'agarose dans le tampon, soit au four à micro-ondes, soit encore dans un bain marie d'eau bouillante, soit sur une plaque chauffante et en agitant de temps en temps. L'agarose est totalement dissoute lorsque les grains, initialement visibles sous forme de petites lentilles, ont complètement disparu,
- Mettre sous agitation et laisser refroidir, ou placer dans un bain-marie à environ 50°C (température supportable au toucher). Éventuellement, refroidir plus rapidement en laissant couler un filet d'eau froide le long de la bouteille en agitant constamment,
- Ajouter du Sybr safe à une concentration finale de 0.5 µg/ml ;
- Couler l'agarose dans le moule avec le peigne et laisser refroidir. (Un gel froid et figé prêt à l'emploi se reconnaît par son apparence opalessante lorsqu'il est observé par la tranche, par rapport à un gel encore liquide qui est parfaitement translucide) ;
- Juste avant d'effectuer l'électrophorèse, placer le gel dans la cuve et s'assurer qu'il est recouvert de tampon. Retirer ensuite le peigne.

• **Dépôt et migration des échantillons**

- Surcharger les échantillons à déposer avec du bleu de charge ;
- Charger les échantillons ;
- Faire migrer en appliquant une tension ou un courant adapté.

• **Validation des résultats**

1. Ajouter un témoin négatif d'amplification, pour s'assurer de l'absence de contamination lors de la préparation de mix ;
2. Ajouter un témoin positif d'amplification, à partir d'un échantillon positif (=témoin positif) ;

Ces témoins seront inclus dans la réaction afin de valider l'étape de l'amplification.

Annexe 6 : Résultats de confirmation par PCR Conventionnelle

code	n° identification	espèce	Type de prélèvement	Provenance	PCR Conventionnelle	
					PM	MH
S1/15	9626	Bovin	Poumon	Kénitra	Neg	Neg
S4/15	9612	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	Neg	Pos
S5/15	795	Bovin	Poumon	Moulay Bouslhame	Neg	Pos
S6/15	9521	Bovin	Poumon	Kénitra	Neg	Neg
S7/15	5312	Bovin	Poumon	Laarache	Neg	Neg
S27/15	123	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	Pos	Pos
S30/15	119 T	Ovin	écouvillon nasal	Tinghir	Neg	Pos
S32/15	896	bovin	Poumon	Kénitra	Neg	Pos
S33/15	737	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	Neg	Pos
S34/15	371	Ovin	écouvillon nasal	Ouarzazate	Neg	Pos
S41/15	741/1	Ovin	écouvillon nasal	Sidi bettach	Neg	Pos
S42/15	742/1	Ovin	écouvillon nasal	Sidi bettach	Neg	Pos
S43/15	742/2	Ovin	écouvillon nasal	Sidi bettach	Neg	Pos
S1/16	ATFI/1	Bovin	écouvillon nasal	Benslimane	Neg	Pos
S2/16	AHMINE/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Pos	Pos
S3/16	AHMINE/2	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Pos	Pos
S4/16	AHMINE/3	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Pos	Pos

S5/16	AHMINE/4	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S6/16	ALI/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S7/16	ALI/2	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S8/16	ALI/3	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S9/16	ALI/4	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S10/16	ALI/5	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S11/16	AZOUZ/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S12/16	OMAR/1	Bovin	écouvillon nasal	Tit Mellil	Neg	Pos
S13/16	OMAR/2	Bovin	écouvillon nasal	Tit Mellil	Neg	Pos
S14/16	JALOUL/1	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Pos
S15/16	JALOUL/2	Bovin	écouvillon nasal	Berchid	Neg	Neg
S2/17	BR/155	Bovin	Poumon	IAV	Pos	Neg
S3/17	BR/238	Bovin	Poumon	IAV	Pos	Pos
S4/17	BR/241	Bovin	Poumon	IAV	Pos	Neg
S6/17	AO/2	Ovin	Poumon	IAV	Neg	Neg
S8/17	04_15	vœu	Poumon	IAV	Neg	Neg
S10/17	1_2017	Vœu	écouvillon	Khmiss zmamra	Neg	Neg
S11/17	2_2017	Vœu	écouvillon	Khmiss zmamra	Neg	Neg
S12/17	3_2017	Vœu	écouvillon	Khmiss zmamra	Neg	Neg
S13/17	4267 male	Vœu	Poumon	IAV	Neg	Neg
S14/17	4267 femelle	Vœu	Poumon	IAV	Neg	Neg

S15/17	Pm	Vœu	Poumon	LOUKKOUS	Neg	Pos
S16/17	souche oujda 2009	Ovin	Poumon	oujda	Neg	Neg
S17/17	souche oujda 2012	Ovin	Poumon	oujda	Neg	Pos
S18/17	CHADLI 6402	bovin	écouvillon	Laarache	Neg	Neg
S20/17	CHADLI 6	bovin	écouvillon	Laarache	Neg	Neg
S22/17	CHADLI 9649	bovin	écouvillon	Laarache	Neg	Neg
S23/17	CHADLI 1	bovin	écouvillon	Laarache	Neg	Neg
S29/17	760	Ovin	écouvillon	Laarache	Neg	Neg
S38/17	382	Ovin	écouvillon	Tinghir	Neg	Neg
S40/17	381	Ovin	écouvillon	Tinghir	Neg	Neg
S42/17	160	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S46/17	183	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S49/17	166'	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Pos
S50/17	166	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S53/17	159'	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S54/17	141	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S56/17	137-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	Neg	Neg
S60/17	92	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S64/17	26	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S65/17	389-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	Neg	Neg

S66/17	64	Ovin	écouvillon	Errachidia	Neg	Neg
S73/17	52-02	Ovin	écouvillon	Tinghir	Neg	Pos
S86/17	4	caprin	écouvillon	khnéfra	Neg	Pos
S87/17	5	bélier	écouvillon	khnéfra	Pos	Neg
S91/17	9	bélier	écouvillon	khnéfra	Pos	Neg
S93/17	11	caprin	écouvillon	khnéfra	Neg	Pos
S94/17	12	caprin	écouvillon	khnéfra	Neg	Pos
S96/17	14	Agneau	écouvillon	khnéfra	Neg	Pos
S102/17	20	Caprin	Poumon	khnéfra	Neg	Pos

Annexe 7 : Etude de pouvoir pathogène *Pasteurella*

Lieu de l'expérimentation : Animalerie de Biopharma.

Inoculation de la souche bactérienne :

Dose de l'inoculum : Dépendra de la concentration de la souche isolée

Voie d'injection : intrapéritonéale

a- Déroulement de l'essai

- Groupe A: 5 souris (MH, PM)

-Groupe B: 5 souris Témoins (BCC)

(Voie intrapéritonéale)

b- SUIVI CLINIQUE :

Le suivi de souris inoculées consiste à vérifier quotidiennement l'état général des souris, les signes spécifiques de la maladie de la pasteurellose.

L'enregistrement du suivi clinique est effectué par la notation du score pour les souris inoculées selon l'index du scoring ci-après :

Absence de signes	0
Malade	1
Mort	2

c- SUIVI BACTERIOLOGIQUE ET CONFIRMATION:

-Faire Autopsie des souris

-Répartir le prélèvement en 2 (un destiné pour le ré-isolément et l'autre pour PCR) pour confirmer la bactérie en question.

Annexe 8: Résultats de dénombrement et pouvoir pathogène sur souris

Code souches	Identification	Especes	type de prélèvement	Etude pouvoir pathogène	Date d'inoculation	Date de Mort	Dénombrement
				souris			concentration
S1/15	9626	Bovin	Poumon	4Mort//5	27/09/2017	28/09/2017	3,2 10 ⁸
S4/15	9612	Bovin	Poumon	3Mort//5	27/09/2017	28/09/2017	3,35 10 ⁸
S5/15	795	Bovin	Poumon	0//5	28/09/2017	—	5,65 10 ⁹
S6/15	9521	Bovin	Poumon	0//5	27/09/2017	—	4,55 10 ⁸
S7/15	5312	Bovin	Poumon	04Mort//5	27/09/2017	28/09/2017	6,4 10 ⁸
S27/15	123 (2)	Ovin	écouvillon nasal	04Mort//5	10/10/2017	11/10/2017	1,02 10 ⁹
S30/15	119 T(7)	Ovin	écouvillon nasal	05Mort//5	10/10/2017	11/10/2017	1,06 10 ⁹
S32/15	896	bovin	Poumon	05Mort//5	10/10/2017	11/10/2017	1,00 10 ⁹
S33/15	737 (10)	Ovin	écouvillon nasal	05Mort//5	10/10/2017	11/10/2017	1,21 10 ⁹
S34/15	371(11)	Ovin	écouvillon nasal	05Mort//5	10/10/2017	11/10/2017	1,41 10 ⁹
S41/15	741/1()	Ovin	écouvillon nasal	05Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	9,1 10 ⁸
S42/15	742/1	Ovin	écouvillon nasal	03Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	3,6 10 ⁸
S43/15	742/2	Ovin	écouvillon nasal	05Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	9,0 10 ⁸
S1/16	ATFI/1	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	2,68 10 ⁹
S2/16	AHMINE/1	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	2,01 10 ⁹
S3/16	AHMINE/2	Bovin	écouvillon nasal	04Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,01 10 ⁹
S4/16	AHMINE/3	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,07 10 ⁹
S5/16	AHMINE/4	Bovin	écouvillon nasal	04Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,00 10 ⁹
S6/16	ALI/1	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,07 10 ⁹

S7/16	ALI/2	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,45 10 ⁹
S8/16	ALI/3	Bovin	écouvillon nasal	04Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	8,0 10 ⁸
S9/16	ALI/4	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,17 10 ⁹
S10/16	ALI/5	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	2,05 10 ⁹
S11/16	AZOUZ/1	Bovin	écouvillon nasal	04Mort//5	24/10/2017	25/10/2017	1,05 10 ⁹
S12/16	OMAR/1	Bovin	écouvillon nasal	01Mort 5(26/10) et 03 Mort (27/10)	26/10/2017	26/10/17 et 27/10/17	5,35 10 ⁸
S13/16	OMAR/2	Bovin	écouvillon nasal	04Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	1,035 10 ⁹
S14/16	JALOUL/1	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	1,29 10 ⁹
S15/16	JALOUL/2	Bovin	écouvillon nasal	05Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	1,11 10 ⁹
S2/17	BR/155	Bovin	écouvillon	04Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,445 10 ⁸
S3/17	BR/238	Bovin	écouvillon	05Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,06 10 ⁹
S4/17	BR/241	Bovin	écouvillon	05Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,30 10 ⁹
S6/17	AO/2	ovin	écouvillon	05Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,895 10 ⁹
S8/17	04_15	vœu	écouvillon	05Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,52 10 ⁹
S10/17	1_2017	Vœu	écouvillon	0Mort//5	31/10/2017	–	1,95 10 ⁹
S11/17	2_2017	Vœu	écouvillon	03Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,27 10 ⁹
S12/17	3_2017	Vœu	écouvillon	0 Mort	31/10/2017	–	1,51 10 ⁹
S13/17	4267 male	NI	Poumon	01 malade//5	26/09/2017	27/09/2017	6,35 10 ⁸
S14/17	4267 femelle	NI	Poumon	3//5	26/09/2017	27/09/2017	7,9 10 ⁸
S15/17	Pm	NI	Poumon	5//5	26/09/2017	27/09/2017	5,35 10 ⁸

S16/17	souche oujda 2009	NI	écouvillon	0Mort//5	26/10/2017	–	1,18 10 ⁸
S17/17	souche oujda 2012	NI	écouvillon	05Mort//5	26/10/2017	27/10/2017	5,15 10 ⁸
S18/17	CHADLI 6402	Bovin	écouvillon	0 Mort	31/10/2017	–	8,9 10 ⁸
S20/17	CHADLI 6	Bovin	écouvillon	01Mort//5	31/10/2017	01/11/2017	1,10 10 ⁹
S22/17	CHADLI 9649	Bovin	écouvillon	01Mort//5	02/11/2017	03/11/2017	9,85 10 ⁸
S23/17	CHADLI 1	Bovin	écouvillon	03Mort//5	02/11/2017	03/11/2017	8,00 10 ⁸
S29/17	760	Ovin	écouvillon	0 Mort	02/11/2017	–	1,14 10 ⁹
S38/17	382	Ovin	écouvillon	4mort//5	02/11/2017	03/11/2017	6,2 10 ⁸
S40/17	381	Ovin	écouvillon	0 Mort	02/11/2017	–	5,9 10 ⁸
S42/17	160	Ovin	écouvillon	03Mort//5	02/11/2017	03/11/2017	1,415 10 ⁹
S46/17	183	Ovin	écouvillon	02Mort//5	02/11/2017	03/11/2017	1,91 10 ⁹
S49/17	166'	Ovin	écouvillon	0 Mort	02/11/2017	–	1,16 10 ⁸
S50/17	166	Ovin	écouvillon	0 Mort	02/11/2017	–	1,455 10 ⁹
S54/17	141	Ovin	écouvillon	0 Mort	02/11/2017	–	1,00 10 ⁹
S56/17	137-02	Ovin	écouvillon	05 Malades	19/12/2017	–	à refaire
S65/17	389-02	Ovin	écouvillon	05 malades	19/12/2017	–	5,25 10 ⁷
S86/17	4	caprin	écouvillon	05//5	19/12/2017	20/12/2017	7,15 10 ⁸
S93/17	11	caprin	écouvillon	05//5	19/12/2017	20/12/2017	8,25 10 ⁸
S94/17	12	caprin	écouvillon	05//5	19/12/2017	20/12/2017	2 10 ⁹
S96/17	14	Agneau	écouvillon	05//5	19/12/2017	20/12/2017	5,25 10 ⁸
102/17	20	Caprin	Poumon	05//5	19/12/2017	20/12/2017	5,6 10 ⁸

Annexe 9: Résultats de l'antibiogramme

N°attribué	(A)	(STR)	(DO)	(NA)	(ENF)	(SXT)	(AMC)	(CN)	(FFC)	E	(Sp)	(UB)
S6/15	S (32)	S (21)	R	R	R	S (18)	S (32)	S	R (10)	S (27)	I (21)	R
S7/15	R	S (19)	R (14)	R	R	R	S (23)	S (30)	S (27)	R	R (14)	R
S27/15	R	S (19)	S (20)	R	R (9)	≥ S	S (22)	S (26)	S (25)	R	R	R
S30/15	R	S (22)	R (12)	R	R (10)	R	R	R (13)	I (16)	R	R (9)	R
S32/15	R	S (27)	R (13)	S (22)	S (25)	≥ S	R	R	S (23)	R (10)	R	R
S33/15	R	≥ S	≥ S	S (22)	S (31)	S (26)	R	S (22)	R (13)	R	R	R (20)
S34/15	R	≥ S	≥ S	≥ S	S (32)	≥ S	S (26)	S (23)	S (26)	R	R	S (28)
S41/15	≥ S	R (12)	R (12)	R	R (16)	≥ S	S (35)	S (20)	S (32)	R	R	R
S42/15	S (26)	R	R (12)	R	S (23)	≥ S	≥ S	≥ S	≥ S	R	R	R
S43/15	S (32)	S (32)	R (11)	R	S (30)	>> S	>> S	S (25)	>> S	R	R	R
S1/16	R	R	R (10)	R	R (16)	R	R	S (21)	R	R	R	R
S2/16	I (14)	S (31)	R (12)	R	S (28)	>>S	>> S	>>S	>> S	>> S	S (26)	R
S4/16	S (26)	S (25)	S (26)	R	R(15)	S (29)	>> S	S (20)	S (29)	R	R	R
S8/16	>>S	R	S (28)	R	S (27)	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	R
S10/16	>> S	S (20)	R (18)	R	I (19)	S (29)	>> S	S (19)	I (18)	R	R (12)	R
S12/16	I (20)	S (20)	S (21)	R	R (11)	R	S (25)	R	S (28)	I (21)	I (16)	R
S13/16	R	S (19)	S (20)	R	I (19)	S (27)	R	S (17)	S (28)	R	R	R
S14/16	R	S (27)	R	R	R (16)	S (32)	R	S (20)	>>S	R	R	R
S15/16	R	S (30)	R	S (23)	S (30)	S (33)	S (32)	S (24)	S (30)	R (10)	R	S (32)
S2/17	I (16)	S (25)	R	R	R	R	I (18)	R	R	R	R	R
S3/17	R	S (25)	R	R	S (34)	R	S (22)	S (30)	S (27)	R	R	S (30)-

S4/17	R	R	R	R	R (12)	S (31)	S (31)	R (13)	S (25)	R	R	R (8)
S6/17	$\geq S$	$\geq S$	$\geq S$	R	$\geq S$	S	S	S	S	S	S	S
S8/17	$\geq S$	$\geq S$	R	R	$\geq S$	S	S	S	S	S	S	R
S11/17	S (25)	R	R (13)	R	R	R	>>S	S (17)	S (33)	R	R	R
S13/17	R	S (18)	R	R	R	R	S (19)	S (16)	S (23)	R	R	R
S14/17	R	S (20)	R	R	R	S (25)	S (24)	R (12)	S (20)	R	R	R
S15/17	R	R	R (12)	R	R (15)	R	S (29)	I (15)	I (18)	R	R	R
S16/17	I (20)	S (21)	R (9)	R	R	R	S	S	R (11)	R	S	R
S17/17	S (25)	S (23)	R (13)	S (25)	I (18)	S	S (31)	S (20)	S (28)	I (14)	R (13)	R (11)
S20/17	>> S	R	>> S	R	>> S	R	R	R	R	R	R	R
S38/17	S	R (10)	S	R	S (23)	S (35)	S	I (15)	S	I (21)	S (30)	R
S42/17	S (23)	S (21)	S (30)	R	S (24)	>> S	>>S	R	>>S	>>S	>>S	R
S46/17	S (24)	I (15)	S (25)	R	I (17)	>> S	>>S	R (12)	>>S	>>S	>>S	>>S
S49/17	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	R
S73/17	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> S	>> s	>>S	>> S	>> S	>> S	R
S86/17	R	S (22)	R	S (23)	S (35)	R	>> S	>> S	>> S	R	R	>> S
S91/17	>> S	>> S	>> S	R	I (20)	>>S	>>S	>>S	>>S	>>S	>>S	>>S
S93/17	S (25)	S (26)	S (32)	R	R (13)	>>S	>>S	S (18)	S (29)	>>S	>>S	R
S96/17	I (20)	S (26)	R (14)	R	R	R	S (22)	S (15)	I (15)	R	R (15)	>>S
S102/17	I (15)	S (20)	S (25)	S (26)	R	S (25)	S (24)	I (15)	I (18)	S (24)	I (20)	R (13)

Annexe 10: Test CMI vis-à-vis de la colistine

Préparation de l'inoculum

Inoculum : une suspension équivalente à un standard de 0,5McFarland sera préparée à partir de colonies de 24h.

Inoculation des plaques de microdilution

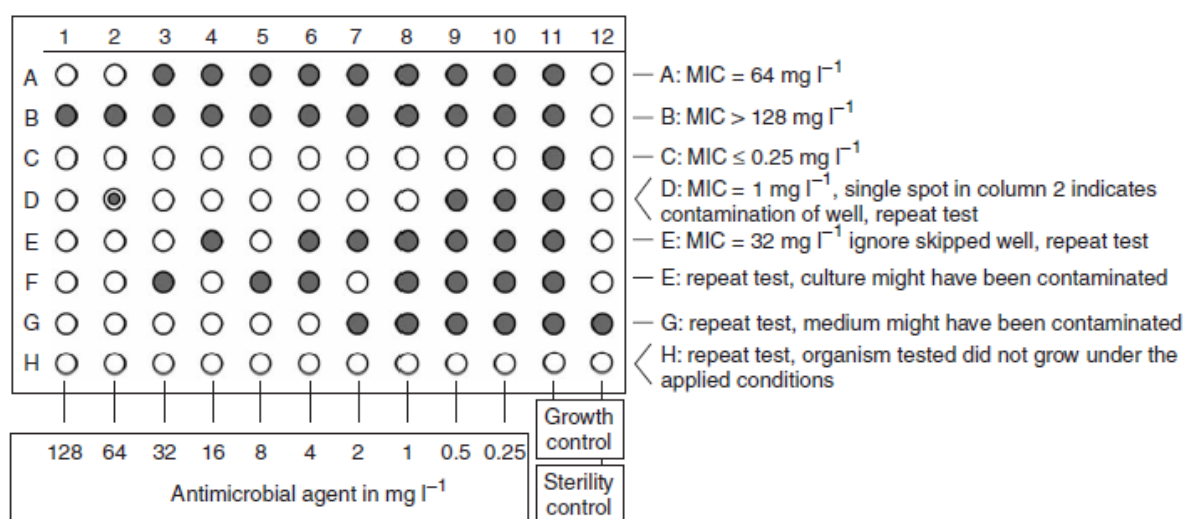
Retirer une plaque à 96 puits de son emballage stérile.

- Etiqueter les plaques stériles de 96 puits en mentionnant les dilutions appropriées de l'antibiotique et le numéro de souches.
- Mettre 100 µl de bouillon dans le puits de contrôle de stérilité (colonne 12) et 50 ml dans le puits de contrôle de croissance (colonne 11).
- Distribuer 50 µl de chaque dilution d'antibiotique aux puits respectifs de la plaque (colonne 1 à 10).
- Ajouter 10µl de l'inoculum équivalent à un standard de 0,5McFarland dans 11ml de MH
- Ajouter 50µl de suspension de MH dans chaque puits contenant la solution antibiotique et le contrôle de la croissance (Colonne 1 à 11).
- Chaque plaque est scellée à l'aide d'un ruban adhésif et placé 20 à 24 heures à 37 ° C.

La lecture

La lecture est facilitée par l'emploi d'un miroir grossissant (loupe), La CMI de l'antibiotique correspond à la dernière cupule dépourvue de culture microbienne visible.

Figure 1: Exemple de lecture:



Critère d'interprétation :

La CMI est définie comme la plus faible concentration d'une gamme de dilutions d'antibiotique de demi en demi, qui entraîne une inhibition de toute croissance bactérienne visible.

Annexe 11: Résultats gène *mcr-1* par Sybr®Green

Well	Well Type	Dye	Target	Tm Product 1 (-Rn'(T))
A1	Unknown	SYBR	SYBR	87,50
A2	Unknown	SYBR	SYBR	87,50
A3	Unknown	SYBR	SYBR	92,00
A4	Unknown	SYBR	SYBR	86,50
A5	Unknown	SYBR	SYBR	87,00
A6	Unknown	SYBR	SYBR	92,00
A7	Unknown	SYBR	SYBR	85,50
A8	Unknown	SYBR	SYBR	92,00
A9	Unknown	SYBR	SYBR	90,00
A10	Unknown	SYBR	SYBR	87,50
A11	Unknown	SYBR	SYBR	77,50
A12	Unknown	SYBR	SYBR	83,50
B1	Unknown	SYBR	SYBR	84,00
B2	Unknown	SYBR	SYBR	87,50
B3	Unknown	SYBR	SYBR	86,50
B4	Unknown	SYBR	SYBR	87,50
B5	Unknown	SYBR	SYBR	93,00
B6	Unknown	SYBR	SYBR	88,00
B7	Unknown	SYBR	SYBR	86,50
B8	Unknown	SYBR	SYBR	87,00
B9	Unknown	SYBR	SYBR	79,50
B10	Unknown	SYBR	SYBR	87,00
B11	Unknown	SYBR	SYBR	87,50

Well	Well Type	Dye	Target	Tm Product 1 (-Rn'(T))
C1	Unknown	SYBR	SYBR	87,00
C2	Unknown	SYBR	SYBR	85,50
C3	Unknown	SYBR	SYBR	86,00
C4	Unknown	SYBR	SYBR	86,50
C5	Unknown	SYBR	SYBR	87,00

Annexe 12 : Experimentation de vaccination et suivi sérologique
--

Lieu de l'expérimentation : SIDI BETTACH.

Vaccination

Dose vaccinale : 1 ml

Voie d'injection : sous cutanée

Date de vaccination : 06/10 /2017

Date de rappel : 02/11/2017

a- Déroulement de l'essai

10 ovins numérotés : 1, 3, 4, 9, 11, 12, 14, 22, 31 et 34

b- SUIVI sérologique :

Prise sur tube sec à J0, J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49, J56, J63 et J77.

c- Test ELISA:

Utilisation du kit Bio-X Diagnostics pour la détection du LPS de *Mannheimia Haemolytica*.

Annexe 13: Mode opératoire ELISA

ELISA Kit for serodiagnosis of *Mannheimia haemolytica*

Indirect test for blood sera and plasma

Diagnostic test for cattle

Monowell

PROCEDURE

1- Bring all components to 21°C +/- 3°C before use. Remove the microplate from its wrapper.

2- DILUTION OF SAMPLES

2.1- Blood sera and plasma preparation

The blood serum and plasma samples must be diluted 1:100. Avoid using haemolysed samples or those containing coagulum.

2.1.1- Dilution in tubes

Distribute 990 µl aliquots of dilution buffer, prepared as instructed in the section “Composition of the Kit”, to 5 or 10 ml tubes. Add 10 µl aliquots of the samples to each of these tubes and mix briefly on a mechanical stirrer (final dilution: 1:100).

2.1.2- Dilution on a microplate

Distribute 20 µl aliquots of each of the samples to the microwells of a dilution plate. Add 180 µl of dilution buffer. Mix five times by pumping and surging or orbital agitation (dilution: 1:10). Distribute 90 µl aliquots of dilution buffer to the wells of the kit's microplate. Transfer 10 µl of the 1:10 prediluted samples. Mix five times by pumping and surging or orbital agitation (final dilution: 1:100).

2.2- Dilution of the kit's reference sera (positive and negative controls)

The positive and negative sera must be diluted 1:100. Do these dilutions in one step in a tube (see Point 2.1.1.) or in two steps on a dilution microplate (see Point 2.1.2.).

3- Distribute the samples (blood serum, plasma) at the rate of 100 µl per well. One well per sample.

- 4- Proceed in the same manner for the reference sera (positive and negative sera). Cover with a lid and incubate the plate at $21^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ for one hour.
- 5- Rinse the plate with the washing solution prepared as instructed in the section “Composition of the Kit”. To do this, eliminate the microplate’s contents by flipping it sharply over a container filled with an inactivating agent. Let the microplate drain upside-down on a sheet of clean absorbent paper so as to eliminate all liquid. Add 300 μl of the washing solution, and then empty the plate once again by flipping it over above the containment vessel. Repeat the entire operation two more times, taking particular care to avoid bubble formation in the wells. After these three rinses, go on to the next step.
- 6- An automatic plate washer may also be used, but in this case particular care must be taken to avoid any contact between the needles and the bottom of the wells to prevent any damage of the reagent layer.
- 7- Dilute the conjugate 1:50 in the dilution buffer (for example, for one plate dilute 250 μl of the conjugate stock solution in 12.250 ml of diluent). Add 100 μl of the dilute conjugate solution to each well. Cover with a lid and incubate the plate at $21^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$ for one hour.
- 8- Wash the plate as described in step 4 above.
- 9- Add 100 μl of the chromogen solution to each well on the plate. The chromogen solution must be absolutely colourless when it is pipetted into the wells. If a blue colour is visible, this means that the solution in the pipette has been contaminated.
- 10- Incubate for 10 minutes at $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ protected from the light and uncovered. This time is given as a guideline only, for in some circumstances it may be useful to lengthen or shorten the incubation time.
- 11- Add 50 μl of stop solution per microwell. The blue colour will change into a yellow colour.
- 12- Read the optical densities in the microwells using a plate reader and a 450 nm filtre. Results must be read fairly soon after the stopping solution has been added since the chromogen may cristallize in wells with strong signals and thereby distort the data.

INTERPRETING THE RESULTS

The test can be validated only if the difference between the optical density readings of the positive control serum and negative control serum (OD positive serum - OD negative serum) at ten minutes is greater than 0,400 and the negative serum yields an optical density that is lower than 0,300.

Calculate each serum's coefficient by means of the following formula:

$$\text{Sample's Coeff.} = \frac{\text{OD sample} - \text{OD negative serum}}{\text{OD positive serum} - \text{OD negative serum}} \times 100$$

Using the following tables, determine each serum's or plasma's degree of positivity.

0		+		++		+++		++++		+++++
Val <=	23 %	< Val <=	87 %	< Val <=	151 %	< Val <=	216 %	< Val <=	280 %	< Val

A reliable diagnosis can be made only if frank seroconversion can be documented using two coupled serum samples taken at 2- to 3-week intervals. The first sample must be taken during the acute phase of the infection. A frank seroconversion is considered to have occurred if the signal increases by two orders of magnitude (two plusses; for example, ++ -> ++++ or + -> +++). A sample must be considered positive if it yields a result that is **greater than or equal to one plus sign (+)**.

Articles joints



Isolation, Molecular, and Pathological Characterization of Infectious Bursitis Virus among Broiler Chickens in Morocco

Maryame Cheggag^{*1,2}, Khalil Zro¹, Mariem Terta⁴, Siham Fellahi², Mohamed Mouahid², Mohammed El Houadfi², Ghizlane Sebbar¹, and Faouzi Kichou²

¹ Division of Pharmacy and Veterinary Inputs, ONESA, Rabat, Morocco

² Hassan II Institute of Agronomy and Veterinary Medicine, Rabat, Morocco

³ Biopharma, Rabat, Morocco

⁴ Faculty of Sciences and Techniques Mohammed VI, Hassan II University, Casablanca, Morocco

⁵ Mouahid's Veterinary Clinic, Tanara, Morocco

*Corresponding author's Email: cheggagmaryame@gmail.com; ORCID: 0000-0002-8093-0149

Received: 20 Jul. 2020

Accepted: 24 Aug. 2020

ABSTRACT

Infectious bursal disease (IBD) is a contagious viral disease of young chickens that causes immunosuppression, mortality, and growth retardation. This pathology has severely affected the Moroccan poultry industry. The objective of the present study was the isolation, molecular characterization, and histopathology examinations of infectious bursal disease virus collected from 49 suspected farms from different regions of the country from 2013 to 2016. The real-time PCR results indicated that 41 out of 49 farm cases were found positive with a prevalence of 41% for classical virulent IBD virus (IBDV) and 59% for very virulent IBDV (vvIBDV). Pathological examinations showed the presence of two types of lesions, including acute to subacute lesions with a prevalence of 86%, and the sub-chronic to chronic lesions with a prevalence of 14%. The nucleotide and deduced amino acid sequences for the hypervariable region of VP2 for 7 vvIBDVs were compared to worldwide IBDV isolates and the findings suggested that it belonged to a group of very virulent strains. Phylogenetically, all the Moroccan vvIBDV field isolates were grouped in the same cluster with Malaysian and European vvIBDV isolates. This report demonstrated the continuous circulation of vvIBDV in commercial poultry farms in Morocco since 2013.

Keywords: Histological investigations, Infectious bursal disease virus, Phylogeny, Morocco, Virulent infectious bursal disease virus, VP2

INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) is an acute and highly contagious viral and immunosuppressive disease of young chickens imposing severe economic losses to the poultry industry (Sassia et al., 2017). Infectious bursal disease virus (IBDV), member of the genus *Avibirnavirus* in family *Birnaviridae*, is a non-enveloped, icosahedral virus with a diameter of 60-65 nm (Nick et al., 1976; Özel and Gelderblom, 1985; Mosley et al., 2017; Pikula et al., 2018). There are two serotypes of IBDV, namely serotypes 1 and 2; the strains of serotype 1 can also be categorized as classical virulent IBDV (cvIBDV), antigenic variant IBDV (avIBDV), attenuated IBDV (atIBDV), and very virulent IBDV (vvIBDV, Jeon et al., 2008; Tsai et al., 2012; Cheggag et al., 2018). The IBDV possesses a bisegmented genome, namely segments A and B. Segment A encodes two open reading frames for the

nonstructural protein, including structural protein VP5 (17 kDa) and the polyprotein pVP2-VP4-VP3 (109 kDa). In contrast, segment B encodes for the RNA-dependent RNA polymerase VP1 (90 kDa). The hypervariable region (HVR) displaying high amino acid variability of the VP2 antigens of IBDV is located on the amino acid residues 206-350 (Bayliss et al., 1990). This region is responsible for antigenic tissue-culture adaptation, variation, and is partly in charge of viral virulence (Escaffre et al., 2013). The clinical or subclinical prevalence of IBD is found in chickens during their first three weeks of age leading to immunosuppression. The phase of chickens' immunosuppression is associated with their age (Sellaoui et al., 2012). The macroscopic characteristic lesions related to this disease consist of enlargement, orange discoloration of kidneys, and dehydration of the muscles with ecchymotic hemorrhages (Brugere-Picoux, 2015).



RESEARCH ARTICLE

Detection of Colistin Resistance in *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* Isolates from Ruminants in Morocco

G. Sebbah^{1,2*}, S. Fellahi², A. Fikri-Mahouf² and B. Belkadi²

¹Society of Veterinary Pharmaceutical and Biological Productions (Biopharma), Rabat, Morocco

²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco

³Avian Pathology Unit, Department of Pathology and Veterinary Public Health, LAV Hassan II Rabat-Institutes, BP 6202, 10000 Rabat, Morocco

*Corresponding author: sebbah.gizlane@umfs.net.ma

ARTICLE HISTORY (20-300)

Received: June 12, 2020
Revised: August 15, 2020
Accepted: August 24, 2020
Published online: September 04, 2020

Key words:

Colistin susceptibility test
Mannheimia haemolytica
mcr-1 gene
MIC
Moroccan ruminants
Pasteurella multocida

ABSTRACT

Colistin is an important drug of last resort against lethal infections with multidrug-resistant gram-negative bacteria; this antibiotic interacts on phosphate groups of lipopolysaccharides present on the outer membrane of gram-negative bacteria. This first mechanism of transferable colistin resistance involves a gene called mcr-1. Here, we described different tools such as Colistin susceptibility test, Minimal Inhibitory Concentration to find the colistin profiles of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* serogroup A Moroccan strain isolated from nasal swabs and lung taken from sheep, goat and cattle with respiratory diseases during January 2015 to December 2017 in six different regions; in addition, we investigated either real time PCR to detect mcr-1 gene. Antimicrobial sensitivity test, was achieved for Forty-one isolates, the resistance rates of isolates from *Pasteurella* species were between 59 and 71%, which respectively correspond to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* serogroup A. The sensitive ratios were between 29 and 41% which respectively correspond to *Pasteurella multocida* serogroup A and *Mannheimia haemolytica*. Also, the MIC test was done against colistin, the results showed a resistant profile with a MIC $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ except for 3 strains from ruminants which have a value $< 2 \mu\text{g/ml}$. The real time PCR screening test was detected with ct values ranging from 23 to 31 and confirmed the results obtained by MIC test. To our knowledge the present study is the first study which reports the resistance to colistin in *Pasteurella* species strains isolated from ruminants in Morocco, our results suggest the necessity and the urgency for establishing a national program for monitoring antibacterial resistance against colistin.

©2020 PVJ. All rights reserved.

To Cite This Article: Sebbah G, Fellahi S, Fikri-Mahouf A and Belkadi B, 2021. Detection of colistin resistance in *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* isolates from ruminants in Morocco. Pak Vet J, 41(1): 127-131. <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2020.077>

INTRODUCTION

Colistin is a polypeptide antibiotic of the polymyxin family, of the polymyxin E group. It's a polycationic and both hydrophilic and lipophilic. Since the discovery of first plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in 2015 (Liu et al., 2016), it has caught universal consideration. These polycationic sites interact with the phosphate groups of the lipopolysaccharides of the bacterial membrane structure, which increases membrane permeability and causes the leakage of intracellular content, resulting in the death of the bacteria (Liu et al., 2016). Resistance to colistin is rare but well described in response to the

emergence of antibiotic resistance (Jeannot et al., 2017), including in multi-resistant Enterobacteriaceae with New Delhi metallo-beta lactamase, and following the recent discovery of a new mechanism of colistin resistance in bacteria (Lu et al., 2017). The European Medicines Agency (EMA), assisted by the European Food Safety Authority (EFSA), updated in 2016 a scientific opinion dated 2013 on the use of the antibiotic colistin in animals. It is recommended that all veterinary use of this drug be discontinued (Rhouma et al., 2016), except for clinical conditions for which there is no other effective treatment. This new form of antibiotic resistance is linked to the mcr-1 gene and has the potential to spread rapidly. On the basis

of the work carried out by Sebbar *et al.* (2019), the presence of MDRs was noted, so the antibiogram panel was completed with colistin, an antibiotic of the polymyxin family, which is one of the last effective medical remedies for the treatment of multi-resistant Gram-negative infections and which has a narrow spectrum of antibacterial activity limited to Gram-bacteria. In addition, the monitoring of using this type of products in Morocco demonstrated that the polypeptides family, especially colistin is the most commonly antibiotic used in ruminants after the tetracyclines family, especially oxytetracycline (Amine, 2018; El Majidi, 2018).

The aim of this study was to determine the colistin profiles of forty-one strains of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* serogroup A using two tools such as Colistin susceptibility test, Minimal Inhibitory Concentration and the detection of *mcr-1* gene by real time PCR in Moroccan isolates outcomes from sick animals using a SYBR® Green technology.

MATERIALS AND METHODS

Isolates: Forty-one strains of *Pasteurella* species thirty-four *Mannheimia haemolytica* (twenty-eight nasal swabs and six lungs) and seven *Pasteurella multocida* (five nasal swabs and two lungs) were isolated from sheep, goat and cattle. The strains used in this study were identified among 162 samples collected from animals with respiratory diseases during January 2015 to December 2017 in six different regions of Morocco (Sebbar *et al.*, 2018, 2019). Strain identification is summarized below in Table 1.

Colistin susceptibility test: Forty-one isolates have been the subject of a colistin susceptibility test (CT, 50 µg), this test was performed using Kirby-Bauer disc diffusion method on Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) plate, described in Chapter 2.1.1 Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing 2009. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control strains. The rules for the technical implementation of the antibiogram in animal health are defined in the AFNOR NF U47-107 standard. The strains were classified as sensitive or resistant, using the zone diameter according to the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (AC-FSM) veterinary recommendations (EUCAST, 2016).

Minimal Inhibitory Concentration (MIC): A standard microdilution technique was used to determine MICs. Antimicrobials were diluted either in sterile water, pH 8.0, microtiter plates were prepared using a dispenser. Each of the *Pasteurella* isolates was inoculated into 3.5 ml of Mueller-Hinton broth and incubated 4-6hr at 37°C to obtain a final concentration equal to a 0.5 McFarland nephelometer standard (10^8 colony-forming units [cfu]/ml). The adjusted culture was then diluted in Mueller-Hinton broth so that after inoculation each well contained approximately 5×10^4 cfu/ml. Plates were sealed and incubated at 37°C for 16-20hr. Then, plates were read with a reflective viewer, and the MIC was recorded as the lowest concentration of antimicrobial that completely inhibited all visible bacterial growth. Each lot of plates was

subjected to internal quality control using a recommended reference strains such as *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) to ensure the validity of the results obtained (CLSI, 2019).

Interpretation of antimicrobial susceptibility was based on the guidelines of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 29th ed. M100. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute;., 2019). Susceptibility to colistin was interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint of >2 µg/ml.

Detection of the resistance Gene (*mcr-1*) by real time PCR: Extraction of bacterial DNA from the overnight cultures was performed using the Nucleospin Tissue Kit (Machery-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The Sybr®Green real time PCR (rt-PCR) assay for *mcr-1* detection was performed with the primers *mcr-1*-FW (5'-AGTCCGTTTGTCTTGTGGC-3') and *mcr-1*-RV (5'-AGATCCTTGGTCTCGGCTTG -3') described by (Rebelo Ana Rita, Bortolaia Valeria, Kjeldgaard Jette S, Pedersen Susanne K, Leekitcharoenphon Pimlapas, Hansen Inge M, Guerra Beatriz, Malorny Burkhard, Borowiak Maria, Hammerl Jens Andre, Battisti Antonio, Franco Alessia, Alba Patricia, Perrin-Guyomard A, 2018). Each 20 µl reaction mixture contained 0.4 µM of each primer, 1x SensiFAST SYBR® Lo-ROX Mix and 5 µl of DNA template. Experiments were performed with Agilent System (AriaMX) and data were analyzed with a first denaturation step (95°C for 2 min), followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 5 s), annealing (60°C for 10 s) and extension (72°C for 20 s) and at the end the step for melting curve was added.

RESULTS

Colistin susceptibility test of *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* isolated from clinical nasal swabs and lung samples in Morocco: In our study according to antimicrobial results, for both *Pasteurellaceae* species, antimicrobial resistance ratios of isolates were between (59-71%) which respectively correspond to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* serogroup A.

The sensitive ratios were between (29-41%) which respectively correspond to *Pasteurella multocida* serogroup A, and *Mannheimia haemolytica*. Results of antimicrobial susceptibility screening test are summarized in Table 2.

Minimal Inhibitory Concentration of colistin among *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* isolated from clinical nasal swabs and lung samples: The Forty-one strains tested by the MIC test against colistin showed a resistant profile with a MIC ≥ 64 µg/ml except for three strains (7%) which have a value <2 µg/ml. Results of MIC test are summarized in Table 3.

Detection of resistance *mcr-1* gene: The results obtained from the SYBR® Green PCR showed a cycle threshold (ct) ranging from 23 to 31 (Fig. 1), this effect confirms those obtained by the Minimal Inhibitory Concentration MIC test.

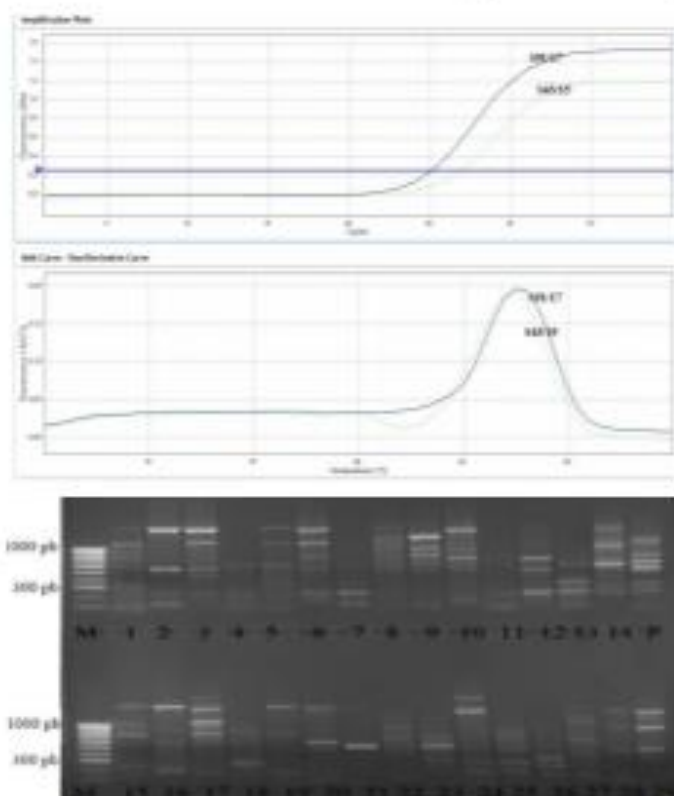


Fig. 1: SYBR green amplification curve and corresponding melting temperature curve. Amplification curves of two isolates (543/15 (green) and 591/17 (blue)); the curves were generated using SYBR Green PCR.

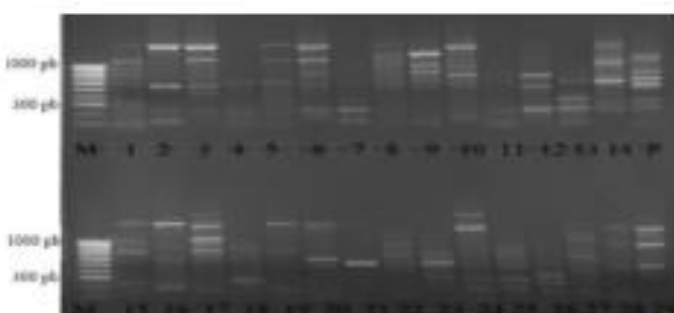


Fig. 2: Confirmation of the mcr-1 gene by gel based. M:Marker (100pb), 1:57/15, 2:52/15, 3:53/15, 4:54/15, 5:54/15, 6:54/15, 7:54/15, 8:51/16, 9:52/16, 10:54/16, 11:58/16, 12:51/16, 13:51/16, 14:51/16, 15:51/16, 16:51/16, 17:54/17, 18:54/17, 19:51/17, 20:51/17, 21:51/17, 22:52/17, 23:52/17, 24:54/17, 25:54/17, 26:57/17, 27:59/17, 28:59/17, 29:59/17.

The measured fluorescence may be from non-specific amplification product. The specificity of the PCR products should therefore be verified. So, the PCR products are migrated to gel to ensure that the size of the amplified fragment is as expected. The product size of the amplicon was 320 bp with a melting temperature of 87°C. Migration on agarose gel based confirmed the presence of the mcr-1 gene in six strains which are (543/15, 512/16, 513/16, 546/17, 573/17 and 591/17) (Fig. 2). The specificity of the primers has been confirmed by both traditional PCR and melting curve analysis.

DISCUSSION

Colistin is one of the few antibiotics still active in veterinary medicine used in the treatment of serious infections caused by multi-resistant bacteria, colistin resistance is complex and highly varied (Jeannot *et al.*, 2017), it has occurred via chromosomal mutations and the recent appearance of mcr-1 plasmid resistance. Concerning plasmid resistance, although it is more prevalent in the animal world, the plasmid has all the characteristics to spread to humans. Colistin resistance is a major public health problem and leads to a therapeutic impasse and an increased risk of mortality. This is why it is essential for laboratories to have reliable and reproducible techniques to properly detect this resistance in order to limit its spread and preserve colistin as an antibiotic of last resort.

The presence of MDRs resistant to at least three classes of antimicrobial agents (Schbar *et al.*, 2019), this prompted us to complete the antibiogram panel with the polymyxin family of antibiotics, specifically colistin, which is one of the last effective medical remedies for the treatment of multidrug-resistant Gram-negative infections and which has a narrow spectrum of antibacterial activity limited to Gram-positive bacteria. The broth microdilution method according to ISO 20776-1 was chosen as the reference method.

Forty-one strains of gram-negative bacteria with variable colistin sensitivity profiles were tested. The results of antibiotic susceptibility testing indicated resistance rates of isolates from *Pasteurella* species between (59-71%) which respectively correspond to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* serogroup A. The sensitive ratios were between (29-41%) which respectively correspond to *Pasteurella multocida* serogroup A, and *Mannheimia haemolytica*, this has been reported in recent years (Hamphries, 2014).

In addition all isolates were subjected to the Minimal Inhibitory Concentration against colistin and the results showed a resistant profile with a MIC >=64 µg/ml except for 3 strains which have a value <2 µg/ml, this has been reported in recent years (Li *et al.*, 2005; Osei Sekyere, 2019; Schbar *et al.*, 2019) and demonstrated in this current study.

Table 1: Identification of isolates tested

Strain code	Organ type	Species	Origin
S6/15	Lung	Bovine	Kenitra
S2/15	Lung	Bovine	Larache
S2/15	Nasal swab	Sheep	Quarzazate
S2/15	Nasal swab	Sheep	Tinghir
S2/15	Nasal swab	Sheep	Quarzazate
S2/15	Nasal swab	Sheep	Quarzazate
S4/15	Nasal swab	Sheep	Quarzazate
S4/15	Nasal swab	Sheep	Coudbiencia
S4/15	Nasal swab	Sheep	Coudbiencia
S4/15	Nasal swab	Sheep	Coudbiencia
S1/16	Nasal swab	Bovine	Bendissane
S2/16	Nasal swab	Bovine	Berrichid
S4/16	Nasal swab	Bovine	Berrichid
S6/16	Nasal swab	Bovine	Berrichid
S1/16	Nasal swab	Bovine	Tx Mellil
S2/16	Nasal swab	Bovine	Tx Mellil
S4/16	Nasal swab	Bovine	Berrichid
S1/16	Nasal swab	Bovine	Berrichid
S2/17	Nasal swab	Bovine	Rabat
S2/17	Nasal swab	Bovine	Rabat
S4/17	Lung	Bovine	Rabat
S6/17	Lung	Sheep	Rabat
S8/17	Nasal swab	Calves	Rabat
S1/17	Nasal swab	Calves	Kenitra
S1/17	Nasal swab	Calves	Rabat
S1/17	Nasal swab	Calves	Rabat
S1/17	Nasal swab	Calves	LOURDOUS
S1/17	Lung	Sheep	Oujda
S1/17	Lung	Sheep	Oujda
S2/17	Nasal swab	Bovine	Larache
S2/17	Nasal swab	Sheep	Tinghir
S4/17	Nasal swab	Sheep	Errachidia
S4/17	Nasal swab	Sheep	Errachidia
S4/17	Nasal swab	Sheep	Errachidia
S7/17	Nasal swab	Sheep	Tinghir
S8/17	Nasal swab	Goat	Khoulfa
S9/17	Nasal swab	Ram	Khoulfa
S9/17	Nasal swab	Goat	Khoulfa
S9/17	Nasal swab	Lamb	Khoulfa
S1/17	Lung	Goat	Khoulfa

± strain.

Colistin sensitivity tests are technically difficult because of several problems. First of all, colistin diffuses very poorly in agar. Second, the polymyxins bind to a range of plastics and glass including plastics most common (polystyrene and polypropylene) used in the trays of micro-dilution of laboratory sensitivity tests, which increases the problems reliability and reproducibility (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). RAPID RISK ASSESSMENT - Plasmid-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae*, 2016; Humphries, 2015).

Currently, the MIC determination techniques (agar diffusion or concentration gradient) are no longer recommended because of the poor diffusion of colistin in agar (Giles *et al.*, 2001). The correlation of MIC's with disc diffusion zone diameters had already been considered to be the problem was identified more than 30 years ago. In addition, many studies have shown significant variability between Minimal Inhibitory Concentration results when

using different methods and the presence of very large errors for some (Hindler and Humphries, 2013; Dolepoulou *et al.*, 2015).

These problems have been extensively studied by the European Committee on antimicrobial susceptibility (EUCAST) and the Clinical Laboratories Standards Institute (CLSI). Both recommended that, as the only method of testing for reliable and reproducible sensitivity, the determination of the MIC by the method of micro-dilution in broth according to ISO 20776-1 standard. They specify to use a cation-adjusted Mueller-Hinton liquid medium, perform the test with colistin sulphate and to use plates of polystyrene titration without pre-treatment. No other additives such as polysorbates should not be used (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. . Disponible sur : <http://www.euacast.org>, 2016).

The High Council of Public Health, in 2016, has therefore taken decisions to detect these colistin-resistant strains associated with the *mcr-1* gene. It is thus recommended to determine the MIC of colistin by the reference method of microdilution in liquid medium according to the recommendations of the CA-SFM/EUCAST 2017. Resistance is expressed most often at low levels with reported MIC values of 2 mg/L.

In parallel, the results obtained by MIC were confirmed by real-time PCR for the detection of the gene responsible for colistin resistance *mcr-1*. The results obtained from the SYBR® Green PCR showed a cycle threshold (ct) ranging from 23 to 31 as proved in previous studies (Poiriel *et al.*, 2016; Enterobacteriaceae, 2019).

These results are in favor of those of the MIC test but do not forget that it is a PCR by an intercalating agent which is inserted between a double-stranded DNA whatever, so to conclude it is necessary to pass by a migration on gel and to see the size of the amplicons. The *mcr-1* gene has been widely reported from all major continents, North America, North Africa, Southeast Asia, and Europe (Wang *et al.*, 2017).

In this study we might say that the first two techniques namely colistin susceptibility test and Minimal Inhibitory Concentration MIC are very heavy and disc susceptibility testing methods are unreliable at detecting colistin resistance (Tan and Ng, 2006). The best is to make a screening test by SYBR® Green PCR and his specificity was confirmed by migration on agarose gel based. According to EUCAST (2016) and CLSI (2019), our study confirmed that *mcr-1*-positive *pasteurella* strains tested are resistant to colistin as demonstrated in previous studies (Poiriel *et al.*, 2016; Enterobacteriaceae, 2019).

Additional studies are underway to confirm the *in vitro* strains by sequencing and comparing sequence homology with *mcr-1* deposited in GenBank nucleotide database.

Table 2: Sensitivity rates of colistin among *Mannheimia haemolytica* & *Pasteurella multocida* isolated from clinical nasal swabs and lung samples from ruminants in Morocco

Antimicrobial agent	Antimicrobial agent	Dose potency (µg)	<i>Mannheimia haemolytica</i> (n=16)		<i>Pasteurella multocida</i> (n=7)	
Polymyxins	Colistin (CT)	10	n (%) of S	n (%) of R	n (%) of S	n (%) of R
			14 (87)	20 (39)	2 (29)	5 (71)

CT: Colistin; R: resistant; S: Sensitive; n: number; %: percentage.

Table 1: Results MIC test of colistin among *Moraxella bovocanis* & *Pasteurella multocida* isolated from nasal swabs and lung samples

	Antimicrobial use (per 4L)	
	n (%)	[Concentration]
MIC (R)	18 (93)	$\geq 64 \mu\text{g/ml}$
MIC (S)	1 (7)	$\leq 2 \mu\text{g/ml}$

MIC: Minimal Inhibitory Concentration; R: Resistant; S: Sensitive; n: number; %: percentage.

Conclusions: In conclusion we reported here the presence of resistance to colistin in Morocco and this study concludes that diffusion gradient tests underestimate MIC values and should therefore be avoided even when quality control results are within the limit values. It is immediately needed to reconsider the appropriate use of colistin in veterinary medicine. Such measures will reduce the zoonotic risk that may represent *mcr-1* gene carrier bacteria especially in ruminants.

Acknowledgments: We thank EL Mehdi BELOUAD for their contributions in MIC test.

Authors contribution: The work presented here was carried out in collaboration between all authors. G.S conceptualized and wrote the article; G.S and S.F did the analysis. All author's reviewed and approved the final manuscript.

Symbols and abbreviations: ATCC: American Type Culture Collection; °C: Celsius degree; CFU: Colony-forming units; DNA: Deoxyribonucleic acid; EMA: European Medicines Agency; CT: Colistin; hr: hour; μg : microgram; μM : micromolar; μL : Microliter; *mcr-1*: Mediated Colistin resistant-1; MDR: multidrug resistant; mL: milliliters; MIC: Minimal Inhibitory Concentration; min: minute; pH: pair base; PCR: Polymorphism chain reaction; pH: pressure hydric; R: Resistant; S: Sensitive; s: second.

REFERENCES

- Anas K, 2018. Tools for collecting data on the use of veterinary antibiotics in Morocco in relation to antibiotic resistance. Descriptive analysis. Veterinary thesis, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, pp: 1-170.
- CLSI, 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. M100. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dafopoulos K, Zarkouli O, Dimitroula E, et al., 2015. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 59:425-30.
- ECDC, 2016. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid risk assessment - Plasmid-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae*.
- El Hajj S, 2018. Inventory and contribution to the implementation of monitoring pilot. Veterinary thesis, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, pp: 1-123.
- EUCAST, 2016. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin B). As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. <http://www.eucast.org>.
- Giles AC, Reis AG and Jones RN, 2001. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines downloaded from. *J Clin Microbiol* 39:180-90.
- Hindler JA and Humphries RM, 2013. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug resistant gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 51:1678-84.
- Humphries RM, 2014. Susceptibility testing of the polymyxins: Where are we now? *Pharmacotherapy* 35:22-7.
- Jouanolh K, Bolard A and Peltier P, 2017. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* 49:526-35.
- Li J, Nation RL, Milne RW, et al., 2005. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 25:11-25.
- Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161-8.
- Lu X, Hu Y, Luo M, et al., 2017. *MCR-1.6*, a new *MCR* variant carried by an IncP plasmid in a Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Senften Typhimurium isolate from a healthy individual. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02632-16.
- Osei Selyere J, 2019. *Mcr* colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *Microbiologopen* 8:1-21.
- Poinel L, Kaffer N, Brink A, et al., 2016. Genetic features of *MCR-1*-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4294-7.
- Ratelle AR, Barroba V, Kjeldgaard S, et al., 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *BioRxiv* 10.1101/280711:1560-7917.v2018.12.6.17-0672.
- Ribeiro M, Beaudry F and Lavelle A, 2016. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents* 48:119-26.
- Selbar G, Zuo K, Kichau F, et al., 2018. Isolation and identification of *Moraxella bovocanis* and *Pasteurella multocida* species from ruminants in six different regions in Morocco. *Arch J Agric Sci Technol* 8:287-94.
- Selbar G, Zuo K, Le K, et al., 2019. Antimicrobial susceptibility screening test of *Moraxella bovocanis* and *Pasteurella multocida* (serogroup A) Moroccan strains isolated from ruminants. *Bulg J Vet Med* 2019(40):10.15184/bjvet.2019-0109.
- Tan TY and Ng LSY, 2006. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. *J Antimicrob Chemother* 58:64-7.
- Wang Y, Tian G-B, Zhang R, et al., 2017. Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet Infect Dis* 17:290-9.



CRYSTALLOGRAPHIC
COMMUNICATIONS

ISSN 2056-9890

research communications

Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and interaction energy, DFT and antibacterial activity studies of (Z)-4-hexyl-2-(4-methylbenzylidene)-2H-benzo[b][1,4]thiazin-3(4H)-one

Ghizlane Sebbar,^{a,*} Brahim Hni,^b Tuncer Hökelek,^c Joel T. Mague,^d Nada Kheira Sebbar,^{b,e} Bouchra Belkadi^a and El Mokhtar Essassi^b

Received 7 April 2020

Accepted 15 May 2020

Edited by J. Ellena, Universidade de São Paulo, Brazil

Keywords: crystal structure; hydrogen bond; benzothiazine; antibacterial activity; Hirshfeld surface.

CCDC reference: 2004559

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/e

^aLaboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco,

^bLaboratoire de Chimie Organique Heterocyclique URAC 21, Pôle de Competence Pharmacochimie, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, Morocco, ^cDepartment of Physics, Hacettepe University, 06800 Beytepe, Ankara, Turkey, ^dDepartment of Chemistry, Tulane University, New Orleans, LA 70118, USA, and ^eLaboratoire de Chimie Appliquée et Environnement, Equipe de Chimie Bioorganique Appliquée, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir, Morocco. *Correspondence e-mail: sebbar.ghizlane@um5s.net.ma

The title compound, C₂₂H₂₅NOS, consists of methylbenzylidene and benzothiazine units linked to a hexyl moiety, where the thiazine ring adopts a screw-boat conformation. In the crystal, inversion dimers are formed by weak C—H_{Mthn}⋯O_{Bnzthz} hydrogen bonds and are linked into chains extending along the *a*-axis direction by weak C—H_{Bnz}⋯O_{Bnzthz} (Bnz = benzene, Bnzthz = benzothiazine and Mthn = methine) hydrogen bonds. A Hirshfeld surface analysis of the crystal structure indicates that the most important contributions for the crystal packing are from H⋯H (59.2%) and H⋯C/C⋯H (27.9%) interactions. Hydrogen bonding and van der Waals interactions are the dominant interactions in the crystal packing. Computational chemistry indicates that in the crystal, the C—H_{Bnz}⋯O_{Bnzthz} and C—H_{Mthn}⋯O_{Bnzthz} hydrogen-bond energies are 75.3 and 56.5 kJ mol⁻¹, respectively. Density functional theory (DFT) optimized structures at the B3LYP/ 6-311 G(d,p) level are compared with the experimentally determined molecular structure in the solid state. The HOMO—LUMO behaviour was elucidated to determine the energy gap. Moreover, the antibacterial activity of the title compound was evaluated against gram-positive and gram-negative bacteria.



CRYSTALLOGRAPHIC
COMMUNICATIONS

ISSN 2056-9890

research communications

Crystal structure, Hirshfeld surface analysis and interaction energy, DFT and antibacterial activity studies of ethyl 2-[(2Z)-2-(2-chlorobenzylidene)-3-oxo-3,4-dihydro-2H-1,4-benzothiazin-4-yl]acetate

Ghizlane Sebbar,^{a,*} Ellouz Mohamed,^b Tuncer Hökelek,^c Joel T. Mague,^d
Nada Kheira Sebbar,^{b,e} El Mokhtar Essassi^b and Bouchra Belkadi^a

Received 5 March 2020

Accepted 24 March 2020

Edited by A. J. Lough, University of Toronto, Canada

Keywords: crystal structure; hydrogen bond; dihydrobenzothiazine; antibacterial activity; Hirshfeld surface.

CCDC reference: 1992626

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/e

^aLaboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco,

^bLaboratoire de Chimie Organique Heterocyclique URAC 21, Pole de Competence Pharmacochimie, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, Morocco, ^cDepartment of Physics, Hacettepe University, 06800 Beytepe, Ankara, Turkey, ^dDepartment of Chemistry, Tulane University, New Orleans, LA 70118, USA, and ^eLaboratoire de Chimie Appliquée et Environnement, Equipe de Chimie Bioorganique Appliquée, Faculté des Sciences, Université Ibn Zohr, Agadir, Morocco. *Correspondence e-mail: sebbar.ghizlane@um5s.net.ma

The title compound, C₁₉H₁₆ClNO₃S, consists of chlorophenyl methyldene and dihydrobenzothiazine units linked to an acetate moiety, where the thiazine ring adopts a screw-boat conformation. In the crystal, two sets of weak C—H_{Ph}···O_{Dbt} (Ph = phenyl and Dbt = dihydrobenzothiazine) hydrogen bonds form layers of molecules parallel to the *bc* plane. The layers stack along the *a*-axis direction with intercalation of the ester chains. The crystal studied was a two component twin with a refined BASF of 0.34961 (5). The Hirshfeld surface analysis of the crystal structure indicates that the most important contributions to the crystal packing are from H···H (37.5%), H···C/C···H (24.6%) and H···O/O···H (16.7%) interactions. Hydrogen-bonding and van der Waals interactions are the dominant interactions in the crystal packing. Computational chemistry indicates that in the crystal, C—H_{Ph}···O_{Dbt} hydrogen bond energies are 38.3 and 30.3 kJ mol⁻¹. Density functional theory (DFT) optimized structures at the B3LYP/ 6-311 G(d,p) level are compared with the experimentally determined molecular structure in the solid state. The HOMO-LUMO behaviour was elucidated to determine the energy gap. Moreover, the antibacterial activity of the title compound has been evaluated against gram-positive and gram-negative bacteria.



Short communication

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY SCREENING TEST OF
MANNHEIMIA HAEMOLYTICA AND *PASTEURELLA*
MULTOCIDA (SEROGROUP A) MOROCCAN STRAINS
ISOLATED FROM RUMINANTS

G. SEBBAR^{1,2}, K. ZRO¹, K. ID SIDI YAHIA³, M. ELOUENNASS⁴,
A. FILALI-MALTOUF² & B. BELKADI²

¹Society of Veterinary Pharmaceutical and Biological Productions (Biopharma), Rabat, Morocco; ²Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco; ³Moroccan Food Safety Office (ONSSA); ⁴Bacteriology Service, Military Hospital Mohammed V, Rabat, Morocco

Summary

Sebbar, G., K. Zro, K. Id Sidi Yahia, M. Elouennass, A. Filali-Maltouf & B. Belkadi, 2019. Antimicrobial susceptibility screening test of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* (serogroup A) Moroccan strains isolated from ruminants. *Bulg. J. Vet. Med.* (online first).

The present study is the first report aimed to determine the antibiotic susceptibility profiles of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* serogroup A Moroccan isolates. Each isolate was tested for sensitivity to amoxicillin (A), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), gentamicin (CN), streptomycin (STR), florfenicol (FFC), doxycycline (DO), erythromycin (E), spiramycin (SP), nalidixic acid (NA), flumequine (UB), enrofloxacin (ENF) and sulfamethoxazole (SXT). All isolates showed resistance to the antibiotics tested at a rate greater than 14%, except for one *P. multocida* isolate which had no resistance profile against AMC. The highest level of resistance was found against NA for *P. multocida* (100%) and against UB (82.4%) for *M. haemolytica*. The sensitivity rates for *P. multocida* were between 0 (against NA) and 85.7% (against STR, AMC, FFC), whereas sensitivity of *M. haemolytica* isolates ranged from 17.6% against UB and 79.4% against AMC. For both *Pasteurellaceae* species, the AMC was the most effective antimicrobial agent, however multi-drug resistance was observed in all isolates raising the interest to monitor the antimicrobial susceptibility of *Pasteurellaceae* species to determine appropriate antibiotic for treatment of pasteurellosis.

Key words: antibiotic susceptibility, *Mannheimia haemolytica*, Moroccan isolates, *Pasteurella multocida*

Pasteurella multocida and *Mannheimia haemolytica* both belonging to the family *Pasteurellaceae*, are known as opportu-

nistic pathogens causing pasteurellosis (Fulton *et al.*, 2009). Because resistance to antibiotics is frequent in *Pasteurella*-

Antimicrobial susceptibility screening test of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* ...

ceae species (Portis *et al.*, 2012; Cameron & McAllister, 2016), therefore antibiotic susceptibility tests are important. The medical and economic importance of "respiratory pasteurellosis" in intensively reared ruminants is at the background of extensive use of anti-infective drugs in veterinary medicine. The progress of antibiotic reinstatement is a constant threat requiring permanent surveillance (Martel *et al.*, 2017). Based on importations and sales of veterinary drugs, Moroccan veterinary competent authorities (ONSSA) started collecting data on the use of antibiotics since 2015. The monitoring of using this type of products showed that the family of tetracyclines, especially oxytetracycline, is the most commonly used antibiotic family in ruminants, followed by polypeptides, especially colistin (Kawtar, 2018; Soukaina, 2018).

The aim of the present study was to determine for the first time the antibiotic susceptibility profiles of forty-one Moroccan isolates, identified as *P. multocida* and *M. haemolytica* from animals with signs of respiratory distress and dead animals.

Forty-one *M. haemolytica* and *P. multocida* strains (Table 1) were isolated from nasal swabs and tissues taken from sheep, goat and cattle. A total of 41 lung and 121 nasal swabs samples were collected from 162 animals with respiratory diseases during 2015 to 2017 in six differ-

ent regions in Morocco (Sebbar *et al.*, 2018).

The antimicrobial susceptibility test on the isolates was performed using Kirby-Bauer disc diffusion method (Hudzicki, 2009). The bacterial suspensions were prepared, left to react for a few minutes and poured on Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) plate. After removal of the excess volume, the plates were allowed to dry for five minutes and the antimicrobial discs were placed on the surface approximately 2 cm apart. Then they were incubated at 37 °C overnight. The inhibition zones were measured with a ruler to the nearest millimetre (Hudzicki, 2009). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control strains (Bauer *et al.*, 1966). Each of the above isolates were subjected to a panel of twelve antibiotics recommended by OIE manual (OIE, 2018): amoxicillin (A, 25 µg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10 µg), gentamicin (CN, 15 µg), streptomycin (STR, 10 UI), florfenicol (FFC, 30 µg), doxycycline (DO, 30 UI), erythromycin (E, 15 UI), spiramycin (SP, 100 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), flumequine (UB, 30 µg), enrofloxacin (ENF, 5 µg) and sulfamethoxazole (SXT, 23.75 µg).

The strains were classified as sensitive, intermediate or resistant, using the zone diameter (Wikins *et al.*, 1972). The ranges for each drug used in this study are

Table 1. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates from clinical nasal swabs and lung samples from ruminants in Morocco.

	<i>Pasteurellaceae</i> species		Total
	<i>Mannheimia haemolytica</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	
Swabs	28	5	33
Lung samples	6	2	8
Number of isolates	34	7	41
Percentage	82.9%	17.1%	100%

G. Sebbar, K. Zro, K. Id Sidi Yahia, M. Elouennass, A. Filali-Maltouf & B. Belkadi

Table 2. Inhibition zone diameter (mm) interpretation chart for the determination of antibiotic sensitivity and resistance

Antimicrobial agent	Disc potency	Resistant	Intermediate	Sensitive
Amoxicillin	25 µg	<14	15–20	≥21
Amoxicillin/clavulanic Acid	20/10 µg	<14	15–20	≥21
Gentamicin	15 µg (10 UI)	<14	15	≥16
Streptomycin	10 UI	<13	14	≥15
Florfenicol	30 µg	<15	16–18	≥19
Doxycycline	30 UI	<17	18	≥19
Erythromycin	15 UI	≤13	14–22	≥23
Spiramycin	100 µg	<16	17–21	≥22
Nalidixic acid	30 µg	<15	16–19	≥20
Flumequine	30 µg	<21	22–24	≥25
Enrofloxacin	5 µg	<17	18–21	≥22
Sulfamethoxazole	23.75 µg	<10	11–15	≥16

given in Table 2 according to the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (AC-FSM) veterinary recommendations (EUCAST, 2019).

A Chi-square test and Fisher exact test were performed to determine the significance of the resistance rates regarding antibiotic families. A P value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the IBM SPSS (version 25) package.

According to antimicrobial results, antimicrobial resistance rates of isolates from both *Pasteurellaceae* species were over 14% in all antibiotic drug classes. This has been reported in recent years (Hendriksen *et al.*, 2008; Jamali *et al.*, 2014). An exception was one strain of *P. multocida* serogroup A which had no resistance to AMC (beta-lactams family), comparably to rates reported previously (Yoshimura *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2004). The highest level of resistance was found against quinolones – NA for *P. multocida* (100%) and against UB (82.4%) for *M. haemolytica* in contrast to the work carried out by Sellyei *et al.* (2009). So, the demonstrated resistance suggests that these antimicrobials should

not be repeatedly used for both control and treatment of pasteurellosis.

The sensitivity rates for *P. multocida* were between 0 (against NA) and 85.7% (against STR, AMC, FFC), whereas sensitivity of *M. haemolytica* isolates ranges from 17.6% against UB and 79.4% against AMC. Similar results have been reported by Onat *et al.* (2010). All results of antimicrobial susceptibility screening test are summarised in Table 3.

The monitoring of the antimicrobial susceptibility of *Pasteurellaceae* species is essential to determine resistance development. Increases in resistance against antibiotics in both *Pasteurellaceae* species have been reported in the last years (Welsh *et al.*, 2004; Catry *et al.*, 2006; Hendriksen *et al.*, 2008) and confirmed in this current study that showed multi-drug resistance, as resistance profiles were established to at least three classes of antimicrobial agents.

Substantial resistance with respect to antibiotic families was obtained for beta-lactams, especially AMC (P=0.009) and macrolides families (P<0.001) which is very close to the results reported previously by Onat *et al.* (2010).

Antimicrobial susceptibility screening test of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* ...

Table 3. Number of isolates tested and sensitivity to tested antibiotics

Antibiotic families	Code	<i>Mannheimia haemolytica</i> (n=34)			<i>Pasteurella multocida</i> (n=7)		
		S (%)	Int (%)	R (%)	S (%)	Int (%)	R (%)
Beta-lactams	A	17 (50)	4 (11.8)	13 (38.2)	2 (28.6)	2 (28.6)	3 (42.9)
	AMC	27 (79.4)	0	7 (20.6)	6 (85.7)	1 (14.3)	0
Aminoglycosides	STR	25 (73.5)	1 (2.9)	8 (23.5)	6 (85.7)	0	1 (14.3)
	CN	24 (70.6)	3 (8.8)	7 (20.6)	5 (71.4)	0	2 (28.6)
Macrolides	E	10 (29.4)	3 (8.8)	21 (61.8)	2 (28.6)	0	5 (71.4)
	SP	10 (29.4)	3 (8.8)	21 (61.8)	2 (28.6)	0	5 (71.4)
Sulfamides	SXT	23 (67.6)	0	11 (32.4)	5 (71.4)	0	2 (28.6)
Quinolones	NA	9 (26.5)	0	25 (73.5)	0	0	7 (100)
	UB	6 (17.6)	0	28 (82.4)	2 (28.6)	0	5 (71.4)
Tetracyclines	DO	14 (41.2)	0	20 (58.8)	3 (42.9)	0	4 (57.1)
Fluoroquinolones	ENF	15 (44.1)	4 (11.8)	15 (44.1)	2 (28.6)	1 (14.3)	4 (57.1)
	FFC	24 (70.6)	5 (14.7)	5 (14.7)	6 (85.7)	0	1 (14.3)

S: Sensitive, Int: Intermediate, R: Resistant; A: Amoxicillin, AMC: Amoxicillin/clavulanic acid, CN: Gentamicin, STR: Streptomycin, FFC: Florfenicol, DO: Doxycycline, E: Erythromycin, SP: Spiramycin, NA: Nalidixic acid, UB: Flumequine, ENF: Enrofloxacin, SXT: Sulfamethoxazole.

Finally, the present study has shown that multi-drug resistance was found in all isolates. Amoxicillin/clavulanic acid was the most effective antimicrobial agent for both *Pasteurellaceae* species.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are very grateful to the staff of Avian unit IAV and Dr Fatiha El Mellouli from the Regional Laboratory for Analysis and Research, National Office of Food Safety (ONSSA) for her technical assistance with antibiograms.

REFERENCES

Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris & M. Turck, 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, **45**, 493–496.

Cameron, A. & T. A. McAllister, 2016. Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **7**, doi:10.1186/s40104-016-0127-3.

Fulton, R. W., K. S. Blood, R. J. Panciera, M. E. Payton, J. F. Ridpath, A. W. Confer & A. Reck, 2009. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21**, 464–477.

Sebbar, G., K. Zro, F. Kichou, A. F. Maltouf & B. Belkadi, 2018. Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* species from ruminants in six different regions in morocco. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, **8**, 387–394.

Hendriksen, R. S., D. J. Mevius, A. Schroeter, C. Teale, D. Meunier, P. Butaye & D. Wasyl, 2008. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens iso-

G. Sebbar, K. Zro, K. Id Sidi Yahia, M. Elouennass, A. Filali-Maltouf & B. Belkadi

- lated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **10**, 1–10.
- Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society of Microbiology, pp. 1–20, <https://www.asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf> (16 December 2019 date last accessed).
- Jamali, H., M. Rezagholipour, S. Fallah, A. Dadrasnia, S. Chelliah, R. D. Velappan & S. Ismail, 2014. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Pasteurella multocida* isolated from bovine respiratory infection. *The Veterinary Journal*, **202**, 381–383.
- EUCAST, 2019. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Recommandations, https://www.sfm-microbiologie.org/wpcontent/uploads/2019/02/CASFM2019_V1.0.pdf (16 December 2019 date last accessed).
- Amine, K., 2018. Tools for collecting data on the use of veterinary antibiotics in Morocco in relation to antibiotic resistance: Descriptive analysis. Veterinary thesis, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, pp. 1–170.
- Martel, J. L., D. Meunier & E. Chaslus-Dancla, 2002. Les pasteurelloses bovines : évolution du groupe bactérien, importance de l'antibiorésistance. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, **155**, 303–312.
- OIE, 2018. Haemorrhagic septicaemia, In: *OIE Terrestrial Manual*, ch. 3.4.10. pp. 1125–1138. https://www.oie.int/fileadmin/Home/FR/Health_standards/tahm/3.04.10_HAEMORRHAGIC_SEPTICAEMIA.pdf (16 December 2019 date last accessed).
- Onat, K., S. Kahya & K. T. Carli, 2010. Frequency and antibiotic susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* isolates from nasal cavities of cattle. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **34**, 91–94.
- Portis, E., C. Lindeman, L. Johansen & G. Stoltman, 2012. A ten-year (2000–2009) study of antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex – *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* – in the United States and Canada. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24**, 932–944.
- Sellyei, B., Z. Varga, K. Szentesi-Samu, É. Kaszanyitzky & T. Magyar, 2009. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. *Acta Veterinaria Hungarica*, **57**, 357–367.
- El Majidi, S., 2018. Inventory and contribution to the implementation of monitoring plans. Veterinary thesis, Hassan II Agronomic and Veterinary Institute, pp. 1–123.
- Welsh, R. D., L. B. Dye, M. E. Payton & A. W. Confer, 2004. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994–2002. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*, **16**, 426–431.
- Wikins, T. D., L. V. Holdeman, I. J. Abramson, & W. E. Moore, 1972. Standardized single-disc method for antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1**, 451–459.
- Yoshimura, H., M. Ishimaru, Y. S. Endoh & A. Kojima, 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, **48**, 555–560.

Paper received 13.09.2019; accepted for publication 05.12.2019

Correspondence:

Ghizlane Sebbar
Society of Veterinary Pharmaceutical and Biological Productions (Biopharma),
B.P. 4569, Rabat, Morocco,
tel.: +212661817771,
e-mail: sebbar.ghizlane@um5s.net.ma



Isolation and Identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* Species from Ruminants in Six Different Regions in Morocco

Ghizlane Sebbar^{1,2}, Khalil Zro¹, Faouzi Kichou³, Abdelkrim Fillali Maltouf² and Bouchra Belkadi²

1. Society of Veterinary Pharmaceutical and Biological Productions (Biopharma), B.P. 4569, Rabat, Morocco

2. Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, 4 Ibn Battouta Ave. BP 1014 RP Rabat, Morocco

3. Institute of Agronomy and Veterinary Medicine Hassan II, B.P. 6202, Rabat, Morocco

Abstract: *Pasteurella* species is considered the principal pathogen of the respiratory tract. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* were investigated and typed from nasal swabs and tissues taken from sheep, goat and cattle. Indeed, 41 lung and 121 nasal swabs samples were collected from animals with respiratory diseases during 2015 to 2017 in six different regions in Morocco. At first, a screening of *Pasteurella* species using the real time-PCR was carried out, then all isolated strains on agar blood were confirmed by PCR gel based assay specific for *M. haemolytica* and *P. multocida*. Pathogenicity was evaluated in mice and histopathological examination was done on some of lung tissue. The results revealed that 34 samples of which 28 (55%) from nasal swabs and six (38%) from lungs were positive for *M. haemolytica* and nine samples of which seven (14%) from nasal swabs and two (13%) from lungs were positive on *P. multocida* serogroup A. Seventy-two percent (72%) isolates were highly pathogenic to mice, which is in accordance with the results obtained by histopathology examination. This is the first report for widespread infections of *Pasteurella* (*M. haemolytica* & *P. multocida*) in ruminants in Morocco. Therefore, measures including development of vaccines are highly required to mitigate the impact of the bacteria in animals.

Key words: Isolation, identification, PCR, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, histopathology, Morocco.

1. Introduction

Pasteurellosis is a febrile and contagious respiratory disease common to a large of ruminants. Clinically, the infection is characterized by very severe general symptoms [1] causing death in a few hours and most often associated with severe bronchopneumonia and enlargement of respiratory lymph nodes and systemic haemorrhagic and/or oedematous lesions. There have been several denominations for the disease, including enzootic pneumonia, enzootic broncho-pneumonia and haemorrhagic septicaemia (in young animals). *Pasteurella* spp has been recognised as the bacterium responsible for this infection. It belongs to the super

kingdom of bacteria, phylum of proteobacteria, class of gammaproteobacteria, pasteurellales order, family of Pasteurellaceae and the genus *Pasteurella* [2]. *Mannheimia haemolytica* and *P. multocida* are the most common etiological agents causing the disease characterized by high morbidity and mortality rates as well as severe economic losses [3-5].

The isolation of bacteria from blood, swabs and tissues of infected animals is the gold standard technique for diagnosis of pasteurellosis. The bacteriological differential diagnosis is based on Gram-staining, growth on blood agar and growth characteristics of pink to red colonies on MacConkey agar [6]. Moreover, hemagglutination, co-agglutination, counter immune-electrophoresis and immune-diffusion tests are also useful for

Corresponding author: Ghizlane Sebbar, Ph.D. student, research fields: microbiology and molecular biology.

confirmatory diagnosis. More recently, molecular techniques, including pulsed field gel electrophoresis, southern blots and polymerase chain reaction (PCR)-based assays are used to differentiate between capsular and somatic serotypes of *Pasteurella*. The PCR techniques are most likely used in endemic areas and can be used with various samples or bacterial cultures. Recently the quantitative real time PCR (RT-PCR) has been developed which is highly sensitive, specific and rapid [7].

In Morocco, little, if any, is reported about the prevalence and economic impact of *Pasteurella* in ruminants. Thus, the aim of this work was to determine for the first time the importance and impact of *Pasteurella* infection in clinically ill ruminants in Morocco.

2. Materials and Methods

2.1 Sample Collection and Preparation

A total of 162 samples were collected from

different species of ruminants (76 bovine, seven goats and 79 sheep) including 121 nasal swabs from animals with signs of respiratory distress and 41 lung tissue samples from dead animals with characteristic respiratory macroscopic changes (congestion, edema, multifocal red and grey hepatisation of lungs and fibrin deposit on lung and pleural surfaces). The survey was conducted from 2015 to 2017 in six different regions of Morocco (Fig. 1). Lung samples were stored in sterile bags and nasal swabs in sterile gel friendly medium and were transported to Biopharma laboratory in appropriate conditions (0-4 °C) within 6 h. Lung tissues with macroscopic changes were sampled from 10 animals (six bovines and four sheep) and fixed in 10% neutral-buffered formalin (NBF) for histopathological investigations.

Pre-enrichment of nasal swabs in brain heart infusion (BHI) broth was performed immediately after sample collection and proceeded for incubation at 37 °C overnight according to Refs. [8, 9]. Specimen

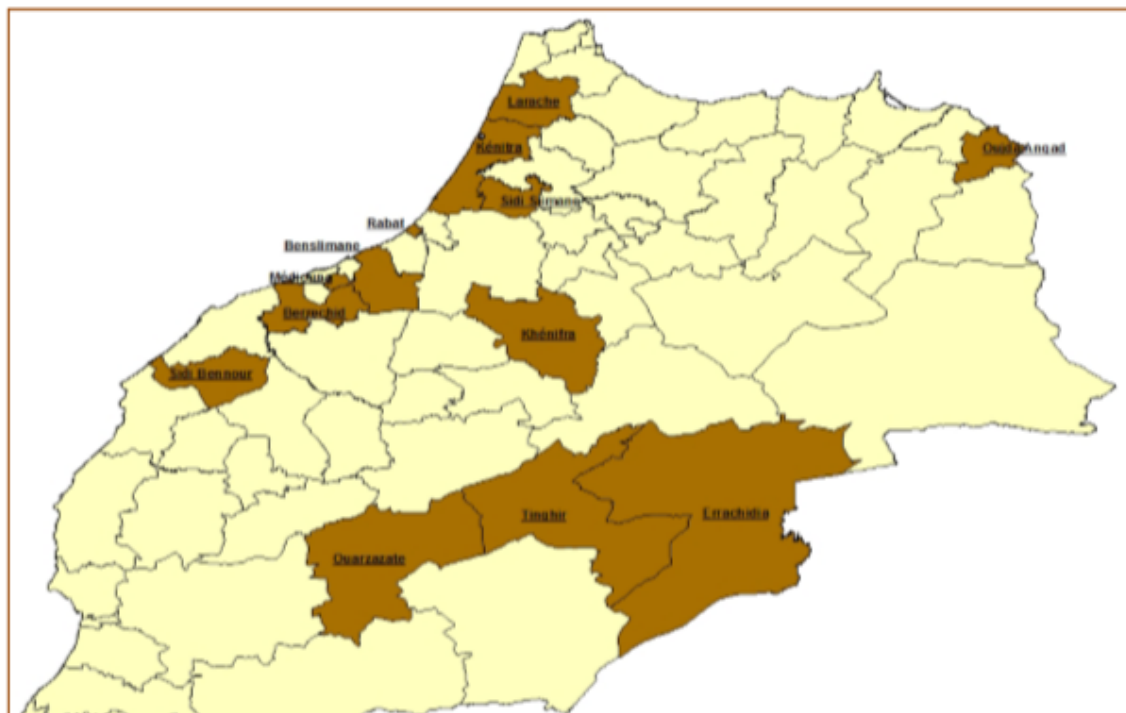


Fig. 1 Geographical distribution of samples collected from six different regions in Morocco in this study.

Isolation and Identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* Species from Ruminants in Six Different Regions in Morocco

389

from lungs were homogenized using an automatic grinder instrument (Bertin Technologies, France). The tissue suspensions were centrifuged at $8,000 \times g$ for 10 min at 4°C and were enriched in BHI overnight as described above.

2.2 RT-PCR Screening

Extraction of bacterial DNA from the overnight cultures (from swabs and lungs) was performed using the NucleoSpin Tissue Kit (Machery-Nagel, Germany) according to the manufacturer's instructions. RT-PCR was carried out using the TaqVetTM triplex *P. multocida* & *M. haemolytica* Kit (Life Technologies, USA) following the producer recommendations. A total of 5 μL DNA was used in a total reaction volume of 20 μL . The assay was carried out on Smartcycler (Cepheid, USA) according to the following cycling profile: DNA polymerase activation 95°C for 15 min followed by 45 cycles of amplification (94°C for 1 min and 60°C for 1 min and 5 s).

2.3 Bacterial Isolation

The positive samples by the RT-PCR were subjected to blood agar culturing [8, 9]. The colonies suggestive of *Pasteurella* were subjected to Gram-staining, catalase and oxidase test and growth on MacConkey agar for further identification [10].

The molecular confirmation of *Pasteurella* species was performed using conventional PCR with specific primers targeting *sodA* gene fragment [11]. *SodA* gene encode the manganese-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD); this gene has been proven to be a powerful target for differentiating related species within the *Mannheimia* and *Pasteurella* [12]. PCR reaction for *M. haemolytica* was performed in a total volume 25 μL containing 0.1 μM from each primer, 10 mM dNTPs, $10\times$ PCR buffer, 50 mM MgCl_2 , 5 U/ μL from Taq DNA polymerase and 5 μL from the isolated DNA. All reagents were supplied by Invitrogen. Taq DNA polymerase recombinant was purchased from Life Technologies, USA. The DNA

was amplified under the following conditions in TC512 thermocycler (Techne, USA): a primary denaturation step at 94°C for 3 min, 35 cycles using the following settings: initial denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 64°C for 30 s and extension at 72°C for 90 s, followed by 10 min at 72°C .

PCR assay for *P. multocida* was confirmed by the same test with specific primers of Ref. [13], it was performed in a total volume of 25 μL as described above. The cycling conditions were as follows: DNA polymerase activation 94°C for 3 min followed by 30 cycles of amplification (94°C for 45 s, 55°C for 30 s and 72°C for 90 s) followed by 10 min at 72°C .

The PCR products were analysed on 2% agarose gel stained with Syber Safe (Invitrogen, USA). The DNA fragments were visualized by Omega Lum G instrument (Aplegen, USA). One hundred base-pair DNA ladder (Invitrogen, USA) was used to determine the size of the amplified fragments (amplicon 143, 460 and 1,044 bp) of *M. haemolytica*, *P. multocida* and *P. multocida* serogroup A, respectively.

2.4 Histopathological Examination

Ten percent NBF-fixed tissues were processed for histopathological examination according to standard methods. They were dehydrated in serial baths of alcohol and embedded in paraffin wax. Five micrometers-thick sections were stained with hematoxylin and eosin and examined under light microscope for histopathological changes.

2.5 Mice Bioassay

Identified strains were inoculated in BHI broth and incubated in a shaking incubator at 100 rpm at 37°C overnight. The number of colony forming unit (CFU/mL) of inoculum was calculated by spread plate method in BHI agar plates [14]. Groups of five mice (one-month, male, average weight of 22 g) were injected via the intra peritoneum. One group of mice was left as a control group and injected only with fresh BHI broth. Injected mice were observed for 24 h

for the fatality rates. Liver and lung samples from the dead mice were streaked onto sheep blood agar and incubated as described above for bacterial isolation. Furthermore, colonies were confirmed by conventional PCR specific for *M. haemolytica* [11] and *P. multocida* [13].

3. Results

3.1 Screening of *Pasteurella* Species Using RT-PCR

The analysis of 162 samples from different species (sheep, bovine and goats) by RT-PCR showed that: 67 samples (41%) were positive, namely 51 swabs (76%) and 16 lungs (24%). The distribution of samples by species and their results are presented in Table 1.

3.2 Bacterial Isolation and PCR Confirmation

A positive sample by RT-PCR was further confirmed using classic bacteriological and biochemical techniques. Gram-negative, catalase (+), oxidase (+) and distinct pink to red colonies on MacConkey agar were characteristic of *M.*

haemolytica.

Confirmation of the bacterial colonies was done using conventional PCR. *M. haemolytica* was detected in 34 out of 67 strains examined. A total of 28 (55%) strains were from nasal swabs and six (38%) strains were from lungs (Table 2 and Fig. 2). The molecular identification of the 34 strains with the specific primers in *sodA* gene revealed positive amplification of 143 bp fragment (Fig. 2).

Absence of bacterial growth MacConkey agar was characteristic of *P. multocida*, the confirmation was done using PCR gel based; nine samples (seven swabs and two lungs) were positive representing respectively 14% and 13% from all samples tested (Table 2, Figs. 3 and 4).

3.3 Histopathological Findings

Histopathological changes encountered in most lungs of examined animals included severe edema of the interlobular spaces and its infiltration with polymorphonuclear (PMNs) and macrophages and fibrin

Table 1 Rate of isolation of *Pasteurella* from different species of animals suffering from respiratory distress and/or lesions.

Types of samples	Animals	Number of samples	Number of positive	
			Number	Percentage (%)
Nasal swabs	Sheep	75	26	35
	Goat	6	3	50
	Bovine	40	22	55
	Total	121	51	42
Lung tissues	Sheep	4	3	75
	Goat	1	1	100
	Bovine	36	12	33
	Total	41	16	39

Table 2 Rate of isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* from different species of isolated strains.

Types of samples	Species	Number of samples	Number of positive (<i>M. haemolytica</i>)		Number of positive (<i>P. multocida</i>)	
			Number	Percentage (%)	Number	Percentage (%)
Nasal swabs	Sheep	26	11	42	4	15
	Goat	3	3	100	0	0
	Bovine	22	14	64	3	14
	Total	51	28	55	7	14
Lung	Sheep	3	1	33	0	0
	Goat	1	1	100	0	0
	Bovine	12	4	33	2	17
	Total	16	6	38	2	13

Isolation and Identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*
Species from Ruminants in Six Different Regions in Morocco

391

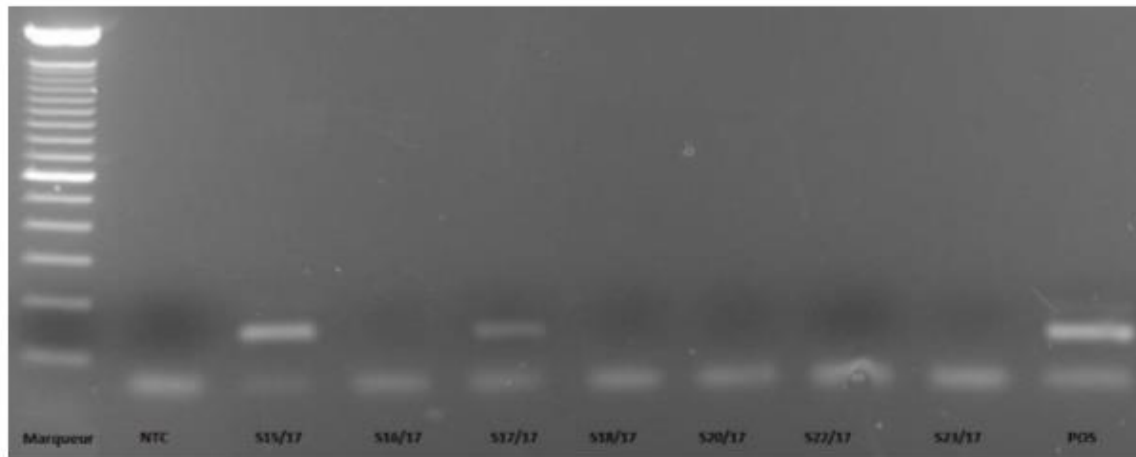


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis showing amplification of 143 bp fragments specific for *Mannheimia haemolytica*.

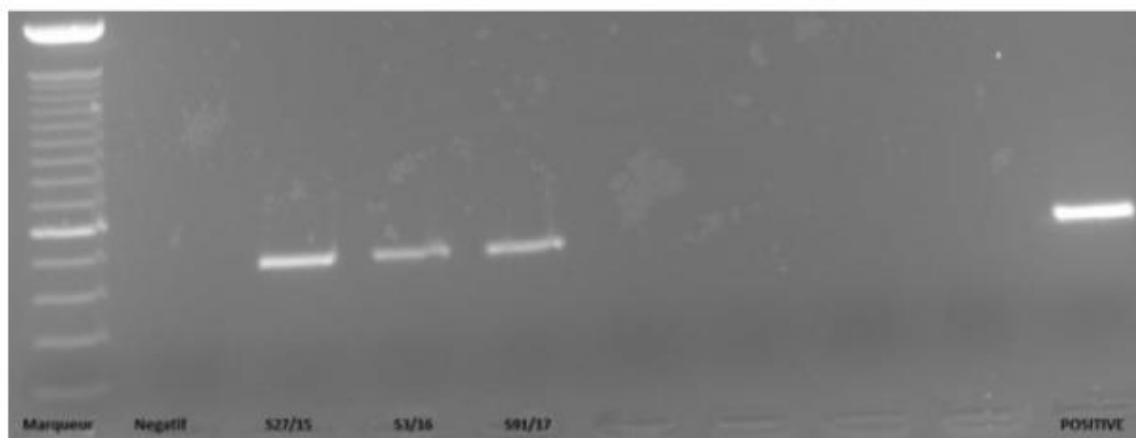


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis showing amplification of 460 bp fragments specific for *Pasteurella multocida*.

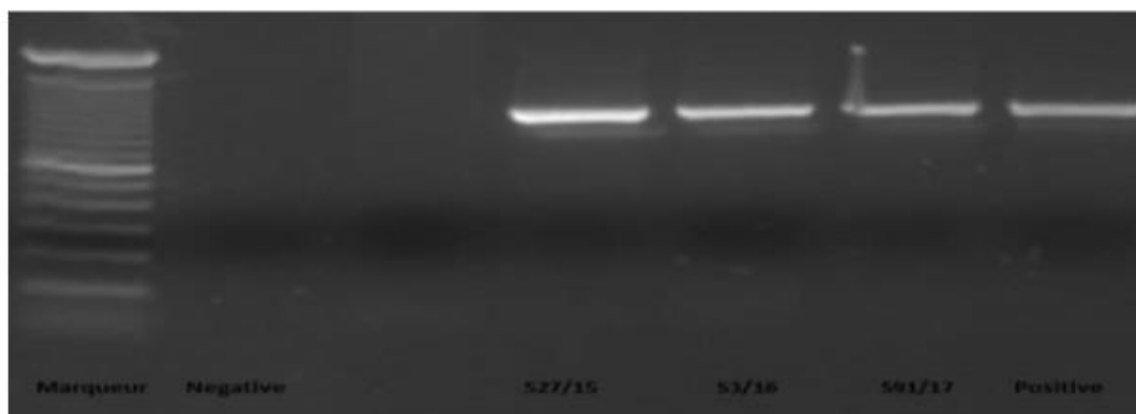


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis showing amplification of 1,044 bp fragments specific for *P. multocida* serogroup A.

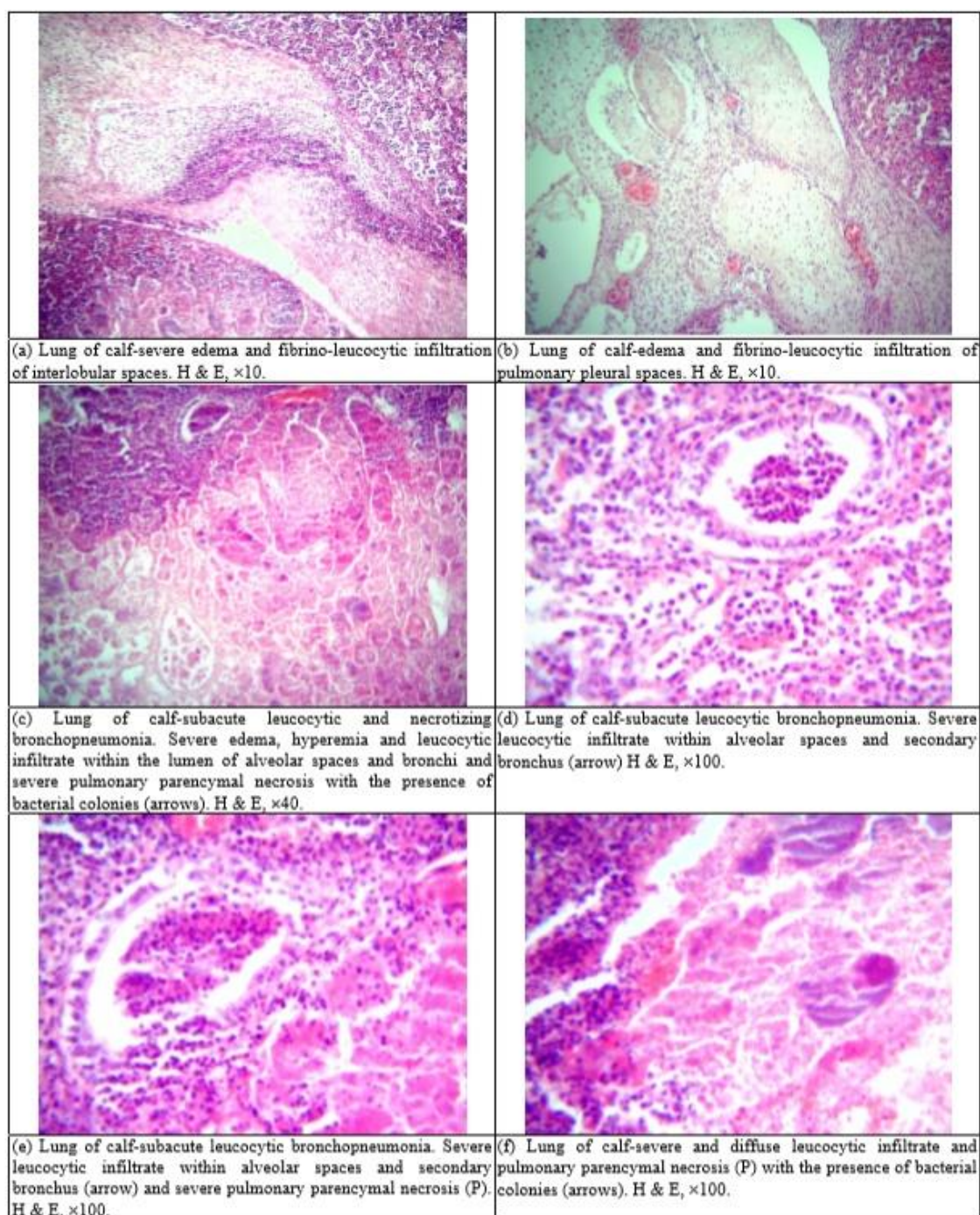


Fig. 5 Histopathology microphotograph from lung.

Isolation and Identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* Species from Ruminants in Six Different Regions in Morocco

393

flames deposits (Figs. 5a and 5b). There was also a heavy PMNs and macrophages load of the bronchial lumen and alveolar spaces associated in some areas with multifocal and severe respiratory parenchymal necrosis (Figs. 5c and 5d). These changes were consistent with a diagnosis of very severe acute bronchopneumonia. In all cases, several bacterial colonies were identified *in situ* and appeared as dark blue granular rods (Figs. 5e and 5f).

3.4 Mice Bioassay

The study of pathogenicity of all *Pasteurella* strains isolated and identified showed that 26 strains caused a 100% mortality rate in mice within 12-18 h, the other strains showed mortality rate greater than 60% within 19 h and 24 h. Whereas, no mortality was recorded in all five mice used as control and injected with BHI broth culture even after 2 d post injection.

4. Discussion

High losses in animals with respiratory distress is not always associated with (primary) viral infections [15, 16]. *M. haemolytica* and *P. multocida* are the important bacteria involved in respiratory infections as a primary or secondary pathogen associated with high fatality rate in ruminants [16].

In Morocco, scientific study data on respiratory diseases caused by *Pasteurella* are very scarce, except a few scattered data linked to intensive cattle breeding. Farmers and veterinarians often declare outbreaks of respiratory distress among cattle and sheep in the country and submission of field cases for diagnosis.

In the present study, investigations were conducted in six different regions of the Kingdom of Morocco in breeding animals with respiratory clinical signs such as high fever, nasal discharge, respiratory distress, polypnoea and death within few days [1]. In some areas, 100% of the collected samples were positive for bacterial involved in pasteurellosis disease in Oujda, Benslimane and Berrchid, and a minimum of 24%

positive samples were recorded in a one region Laarache.

M. haemolytica was isolated and confirmed by PCR test in all farms investigated. This bacteria was found in 34 out of 67 samples (51%). This prevalence rate is higher than those described by Eshetu [17] and Nurhusein [18] with respective prevalence rates of 13% and 8.7%. However, *P. multocida* was found only in nine out of 67 samples (13%). PCR group and PCR for capsular type detection was found to be a rapid and sensitive method, as reported earlier by Townsend *et al.* [13] and Al-Maary *et al.* [19].

From the results obtained on the confirmation assay gel based PCR it clearly appears that *M. haemolytica* 51% is the dominant bacterium in all samples analysed in the six regions investigated versus *P. Multocida* which represents only 13%.

Among these, 43 strains induced a mortality rate greater than 50% in challenged mice. This observed pathogenicity rate shows that the isolated strains have major pathogenic power, which caused the death of inoculated mice in 24 h. These findings are in accordance with histopathological changes consisting of severe acute bronchopneumonia shown in lung tissues collected from field affected animals either cattle or sheep. Such tissue changes were described in cattle infected with these bacteria by Zecchinon *et al.* [1] and Lopez [20].

5. Conclusions

This is the first study in Morocco, which reports the circulation of *M. haemolytica* in ruminants in the field. About 21% of samples collected from sick animals were positive. The bacteria were detected in samples obtained from six localities in Morocco indicating widespread epidemics. Isolates were highly pathogenic to mice. This study constitutes a crucial and a necessary step allowing preventive and veterinary medicine to support pasteurellosis disease controls in the country.

Acknowledgments

Thank you very much for Dr. M. Chadli and for all of the people who collaborated in this study particularly the private veterinary for participating in samples collection and also many thanks to Abdellah Loudiyi (Biopharma animal house) & Nazih (IAV animalhouse) for doing Mice bioassay.

References

- [1] Zecchinon, L., Fett, T., and Desmecht, D. 2005. "How *Mannheimia haemolytica* Defeats Host Defence through a Kiss of Death Mechanism." *Vet. Res.* 36 (2):133-56.
- [2] Trevisan. 1887. "Taxonomy of the Genus *Pasteurella*." <http://doi.namesforlife.com/10.1601/tc.3371>.
- [3] Confer, A. W. 2009. "Update on Bacterial Pathogenesis in BRD." *Anim. Health Res. Rev.* 10 (2): 145-8.
- [4] Fulton, R. W. 2009. "Bovine Respiratory Disease Research (1983-2009)." *Anim. Health Res. Rev.* 10 (2): 131-9.
- [5] McVey, D. S. 2009. "BRD Research Needs in the Next 10-20 Years." *Anim. Health Res. Rev.* 10 (2): 165-7.
- [6] Smith, G. R., and Philips, J. E. 1990. "*Pasteurella* and *Actinobacillus*." In *Principales of Bacteriology, Virology and Immunology*, 8th ed. Vol. 2. B. C. Decker Inc., USA, 383-99.
- [7] Kishimoto, M., Tsuchiaka, S., Rahpaya, S. S., Hasebe, A., Otsu, K., and Sugimura, S. 2017. "Development of a One-Run Real-Time PCR Detection System for Pathogens Associated with Bovine Respiratory Disease Complex." *J. Vet. Med. Sci.* 79: 517-23.
- [8] Gentry, M. J., Confer, A. W., and Craven, R. C. 1987. "Effect of Repeated *In Vitro* Transfer of *Pasteurella haemolytica* A1 on Encapsulation, Leukotoxin Production and Virulence." *J. Clin. Microbiol.* 25: 142-5.
- [9] Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., and Bisgaard, M. 1999. "Taxonomic Relationships of the *Pasteurella haemolytica* Complex as Evaluated by DNA-DNA Hybridizations and 16S rRNA Sequencing with Proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 67-86.
- [10] Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B., and Carter, G. R. 1994. "Bacterial Pathogens: Microscopy, Culture and Identification." In *Clinical Veterinary Microbiology*, edited by Sharma, S. N., and Adlakha, S. C. London, England: Wolfe Publishing.
- [11] Guenther, S., Schierack, P., Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Wieler, L. H., and Ewers, C. 2008. "Real-Time PCR Assay for the Detection of Species of the Genus *Mannheimia*." *J. Microbiol. Methods* 75: 75-80.
- [12] Gautier, A. L., Dubois, D., Escande, F., Avril, J. L., Trieu-Cuot, P., and Gaillot, O. 2005. "Rapid and Accurate Identification of Human Isolates of *Pasteurella* and Related Species by Sequencing the *SodA* Gene." *J. Clin. Microbiol.* 43: 2307-14.
- [13] Townsend, K. M., Boyce, J. D., Chung, J. Y., Frost, A. J., and Adler, B. 2001. "Genetic Organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System." *J. Clin. Microbiol.* 39: 924-9.
- [14] Goldman, E., and Green, L. H. 2008. *Practical Handbook of Microbiology*, 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- [15] Grissett, G. P., White, B. J., and Larson, R. L. 2015. "Structured Literature Review of Responses of Cattle to Viral and Bacterial Pathogens Causing Bovine Respiratory Disease Complex." *J. Vet. Intern. Med.* 29: 770-80.
- [16] Panciera, R. J., and Confer, A. W. 2010. "Pathogenesis and Pathology of Bovine Pneumonia." *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26 (2): 191-214.
- [17] Eshetu, M. 1991. "Pneumonic Pasteurellosis in Sheep Slaughtered at Addis Ababa Abattoir." Debre-Zeit: DVM thesis, FVM, AAU.
- [18] Nurhusein, Y. 2005. "Aerobic Bacterial Flora in the Respiratory Tract of Apparently Healthy Sheep Slaughtered in Dessie Abattor." Debre-Zeit: DVM thesis, FVM, AAU.
- [19] Al-Maary, K. S., Dawoud, T. M., Mubarak, A. S., Hessain, A. M., Galal, H. M., and Kabli, S. A. 2017. "Molecular Characterization of the Capsular Antigens of *Pasteurella multocida* Isolates Using Multiplex PCR." *Saudi J. Biol. Sci.* 24: 367-70.
- [20] Lopez, A. 2001. "Respiratory System, Thoracic Cavity and Pleura." In *Thomson's Special Veterinary Pathology*. Mosby Inc., USA, 125-96.



Diagnosis of Clinical Cases of Infectious Bursal Disease Using a Modified Rapid Taq Man-MGB Real-Time RT-PCR Assay

Maryame Cheggag¹, Khalil Zro², Ghizlane Sebbar², Naoufal Rahmatallah³, Mohamed Mouahid³, Mohammed EL Houadfi¹ and Faouzi Kichou¹

1. Unit of Histology and Pathological Anatomy, Department of Veterinary Pathology and Public Health, Institute of Agronomy and Veterinary Medicine Hassan II, B.P. 6202, Rabat, Morocco

2. Society of Veterinary Pharmaceutical and Biological Productions (Biopharma), B.P. 4569, Rabat, Morocco

3. Veterinary Clinic Temara, Morocco

Abstract: Infectious bursal disease (IBD) is an important contagious viral infection of immune system of poultry. This infection possesses a permanent threat to the profitability of poultry industry worldwide. The aim of this work was to modify the Taq Man-MGB real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR) in one step involving two fluorogenic Taq Man labeled probe and using this protocol for detection of infectious bursal disease virus (IBDV) collected from suspected cases distributed in different regions of the country during the period 2013-2016. The intralaboratory validation of modified method was realized for specificity, linearity, repeatability, sensitivity and reproducibility. It allowed reducing the test running time by six folds. This method was applied on 102 pools of bursa of fabricius (BF) samples collected from affected broiler farms suspected to be infected by IBDV. Birds showing macroscopic lesions including muscle petechial hemorrhages, hypertrophy and hemorrhage of BF, were subjected to molecular analysis using modified protocol "Taq Man-MGB rRT-PCR". The validation satisfied all criteria and the assay developed could be a useful tool for a very rapid diagnosis of IBDV and permit to detect and to discriminate in one-step very virulent (vv) from non-vv (classic and variant) IBDV strains. Out of 84 IBDV positive samples, a prevalence of 39% for vv strains and 61% for classical strains was noted. These results indicate that despite the vaccination against IBDV, the vv form of this pathologic continues to cause serious problems for Moroccan broiler chickens. The obtained results indicate the successfully detection of IBDV and differentiated all vvIBDV strains from non-vvIBDV strains; Avian infectious agent RNA viruses tested are negative, demonstrating great specificity of the assay. The results obtained indicate that this method is suitable as a routine laboratory test for the rapid detection and differentiation of IBDV strains in samples of avian origin.

Key words: IBDV, one-step rRT-PCR, Taq Man-MGB, macroscopic lesions.

1. Introduction

Infectious bursal disease (IBD) first described in 1962 [1], is a highly contagious [2] and immunosuppressive disease of young chickens [3] caused by infectious bursal disease virus (IBDV) which belongs to the genus *Avibirnavirus* of the Birnaviridae family. There are two serotypes of IBDV

(serotypes 1 and 2) [4]. IBDV replicates in differentiating lymphocytes of the bursa of fabricius, causing the immunosuppressive and often fatal condition [5]. The strains of serotype 1 IBDV are infectious for chickens [5], and are further classified as classical virulent IBDV (cvIBDV), antigenic variant IBDV (avIBDV), attenuated IBDV (atIBDV) and very virulent IBDV (vvIBDV) [6]. These later vvIBDV strains were reported to break through high levels of maternal antibodies in commercial flocks, causing up to 60%-100% mortality rates in chickens

Corresponding author: Maryame Cheggag, Ph.D., research fields: histology and pathology anatomy veterinary and molecular biology.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Isolation and identification of group A rotaviruses among neonatal diarrheic calves, Morocco

Imane Ennima^{1*}, Ghizlane Sebbar², Bachir Harif², Saaid Amzazi¹, Chafiq Loutfi² and Nadia Toul^{3*}

Abstract

Background: Group A rotaviruses (RVA) are the main cause of neonatal calve diarrhea (NCD) in Morocco. In this study, we isolated RVA strains from NCD clinical samples in order to support RVA disease control in Morocco. This isolation process constitutes a first step toward vaccine development.

Methods: Thirteen fecal samples were obtained from calves with a single episode of neonate calf diarrhea at three different dairies and two samples were collected from field during a severe NCD outbreak. Diagnosis of RVA infection was based on fecal immune-chromatographic rapid test and further evaluated for their hemagglutination (HA) activity. RVA isolation was carried out on MA104 cells after inoculates were treated with different concentrations of trypsin TPCK. All RVA isolates were confirmed by LSI VetMAX™ Triplex Ruminant Rotavirus & Coronavirus Real-Time PCR kit. G and P typing were determined by direct sequencing of the VP4 and VP7 amplicons.

Results: RVA isolation was achieved for nine clinical samples following one or two passages (60 %) and was properly depended on HA activity and trypsin treatment of inoculates. The first sign of CPE detected consisted of increased cell granularity, obscure cell boundaries, cell rounding, and eventual degeneration and detachment of cells. At lower TPCK concentration (3–10 µg/inoculum), no changes at the cellular level were observed, while cells activated with 25–30 µg of trypsin/inoculum, they degenerated and trypsin cytotoxicity was enhanced. Appreciable changes in cell's morphology were detected with optimal trypsin concentration of 15–20 µg trypsin/inoculum. Data from qRT-PCR confirmed that unsuccessful cultivations have No-Ct, and all nine isolates have Ct values ranged between 12.17 and 24.69. Analysis sequencing revealed that field isolates were of G6 P[5] serotype and isolates from the dairy NCD samples were of G10 P[14] serotype.

Conclusions: To our knowledge, this is the first study in Morocco which reports the circulation of G10P[14] in NCD on dairy farms and G6P[5] in the field. Our study constitutes a crucial and a necessary step allowing preventive and veterinary medicine to support RVA disease controls in the country.

Keywords: Bovine rotavirus, Isolation, G6 P[5], G10 P[14], Morocco

Background

Group A rotaviruses (RVA) are a member of the family *Reoviridae*, genus *Rotavirus*. RVA infect both animals

[18] and humans [5], and cause an acute gastroenteritis (AGE) accompanied by abdominal pain, fever, nausea, and vomiting. The genome of these viruses is composed of 11 segments of dsRNA and is surrounded by three concentric layers of proteins [9]. The outermost layer is formed by two proteins, VP4 and VP7. Dimers of VP4 form spikes that extend from the virus surface and have essential functions in the virus life-cycle, including receptor binding and cell penetration [9].

*Correspondence: Ennima.imane@gmail.com; ntoul2003@gmail.com

¹ Laboratory of Biochemistry and Immunology, Department of Biology, Faculty of Sciences, 4 Avenue Ibn Batouta, B.P. 1014 RP, Rabat, Morocco

² Equipe de Recherche en Virologie Moléculaire et Onco-Biologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université Mohamed V, Av. Mohamed Belarbi El Alaoui, Rabat, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Ennima et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Comparison of SYBR green I real-time RT-PCR with conventional agarose gel-based RT-PCR for the diagnosis of infectious bronchitis virus infection in chickens in Morocco

Siham Fellahi^{1,2}, Mehdi El Harrak³, Jens H. Kuhn⁴, Ghizlane Sebbar³, El Arbi Bouaiti⁵, Khadija Khataby², Ouafae Fassi Fihri¹, Mohammed El Houadfi^{1†} and My Mustapha Ennaji^{2*†}

Abstract

Background: A rapid, sensitive, and specific molecular method for the diagnosis of infectious bronchitis virus (IBV) infection is important in curbing infectious bronchitis outbreaks in Morocco and other countries.

Methods: In this study, an easy-to-perform SYBR green I real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) targeting the nucleocapsid gene of IBV was developed and compared with conventional agarose gel-based RT-PCR for the detection of IBV infection.

Results: We found that the SYBR green I real-time RT-PCR was at least 10 times more sensitive than the agarose gel electrophoresis detection method. The assay exhibited high specificity for IBV infection. All negative controls, such as Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus, and avian influenza virus, were not detected.

Conclusion: The SYBR green I real-time RT-PCR test described herein can be used to rapidly distinguish IBV from other respiratory pathogens, which is important for diagnosis and control of infectious bronchitis outbreaks in Morocco. The test is a valuable and useful method as a routine assay for diagnosis of clinical IBV infection in commercial chickens.

Keywords: Coronavirus, Gammacoronavirus, IBV, Infectious bronchitis virus, SYBR green, Real time RT-PCR, RT-PCR

Background

Infectious bronchitis (IB), an acute, highly contagious viral upper respiratory disease of chickens, is one of the most economically significant diseases hampering the intensive poultry industry worldwide. IB affects chickens of all ages, causing respiratory, reproductive, and renal manifestations [1]. Although control of IBV infection is primarily achieved through live attenuated vaccines, the

infection is difficult to contain because immunization with different serotypes of the virus do not necessarily cross-protect against other serotypes [2]. Within an infected poultry flock, quick and accurate detection of the presence of the virus is imperative to properly vaccinate uninfected flocks. In addition, rapid differentiation of IBV infection from other upper respiratory tract diseases (e.g., avian influenza, Newcastle disease, infectious laryngotracheitis, avian mycoplasmosis) is important so that appropriate measures can be taken in a timely manner [3].

IB is a disease that negatively impacts the poultry industry of developing countries. For instance, in Morocco, IB continues to be an uncontrolled problem [4–6] due to the lack of in-country diagnostic capabilities that can be performed quickly and interpreted easily

*Correspondence: m.ennaji@yahoo.fr

†Mohammed El Houadfi and My Mustapha Ennaji contributed equally to this work

² Laboratory of Virology, Microbiology and Quality/Ecotoxicology & Biodiversity, Faculty of Sciences and Techniques-University Hassan II Mohammedia, PO Box 146, Quartier Yasmina-Mohammedia, 20650 Casablanca, Morocco

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Fellahi et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Accepted Manuscript

Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco

Nadia Amrani, Costantina Desario, Ahlam Kadiri, Alessandra Cavalli, Jaouad Berrada, Khalil Zro, Ghizlane Sebbar, Maria Loredana Colaianni, Antonio Parisi, Gabriella Elia, Canio Buonavoglia, Jamal Malik, Nicola Decaro

PII: S1567-1348(16)30131-9
DOI: doi: [10.1016/j.meegid.2016.04.005](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.005)
Reference: MEEGID 2703

To appear in:

Received date: 26 December 2015
Revised date: 2 April 2016
Accepted date: 6 April 2016

Please cite this article as: Amrani, Nadia, Desario, Costantina, Kadiri, Ahlam, Cavalli, Alessandra, Berrada, Jaouad, Zro, Khalil, Sebbar, Ghizlane, Colaianni, Maria Loredana, Parisi, Antonio, Elia, Gabriella, Buonavoglia, Canio, Malik, Jamal, Decaro, Nicola, Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco, (2016), doi: [10.1016/j.meegid.2016.04.005](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.005)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



ORIGINAL ARTICLE

Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in Africa

Siham Fellahi^{1,2,3}, Mariette Ducatez^{4,5}, Mehdi El Harrak², Jean-Luc Guérin^{4,5}, Nadia Touil⁶, Ghizlane Sebbar², El Arbi Bouaiti⁶, Khadija khataby³, My Mustapha Ennaji³, and Mohammed El-Houadfi^{1*}

¹Unité de Pathologie Aviaire, Département de Pathologie et Santé Publique Vétérinaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco, ²Société de Produits Biologiques et Pharmaceutiques Vétérinaires, Rabat, Morocco, ³Laboratoire de Virologie, Microbiologie et Qualité/ETB, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan II-Casablanca, Mohammedia, Morocco, ⁴INRA UMR 1225 IHAP, Toulouse, France, ⁵Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225 IHAP, Toulouse, France, and ⁶Ecole Royale du Service de Santé Militaire, Rabat, Morocco

The aim of this study was to investigate the prevalence and diversity of infectious bronchitis virus (IBV) genotypes in poultry flocks in 16 areas of Morocco between 2010 and 2014. A total of 360 chicken flocks suspected of being infected by IBV were screened for the IBV N gene using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Flocks were classified into four groups according to their IBV vaccination programme. Group 1 contained unvaccinated birds. Group 2 received a single application of live H120 vaccine. Groups 3 and 4 birds received one or two booster vaccination(s), respectively, mostly using the H120 vaccine. The real-time RT-PCR results showed that 51.7% of the flocks were positive for the IBV genome with geographical disparities. Molecular characterization of IBV was performed on 50 RT-PCR positive samples by partially sequencing the S1 gene, including the hypervariable regions (nucleotides 705–1097). Two predominant genotypes were detected, with the Massachusetts type dominating (66%), among which 25% of the samples were identical to the H120 vaccine. The second most common genotype (present in 32% of the flocks) was surprisingly Italy 02, revealing the first detection of this genotype in Morocco and also in Africa. 793B, the predominant genotype in the late 1990s in Morocco, was only detected on one occasion and was identical to the 4/91 vaccine strain. This study highlights the high prevalence of IBV in poultry farms in Morocco and confirms its continuous dynamic changes and evolution.

Introduction

Infectious bronchitis (IB) is an acute and highly contagious viral disease affecting chickens of all ages, causing respiratory distress, nephritis, reduction in egg production and quality and increasing mortality rate. The disease is probably endemic in all regions where poultry are reared intensively. The causative agent is infectious bronchitis virus (IBV) belonging to the Gammacoronaviruses within the *Coronaviridae* family (Cavanagh, 2007). IBV has a single-stranded, positive sense RNA genome (Bourne et al., 1987), which encodes three major structural proteins, the nucleocapsid protein (N), the membrane protein (M) and the spike glycoprotein (S) which is post-translationally cleaved into two subunits S1 and S2 (Cavanagh, 1983a, b).

A large number of IBV serotypes and variants have been described worldwide (De Wit et al., 2011). Many of them do not completely cross-protect (Gelb et al., 1991; Cook et al., 2012). In North Africa, most of the information on IBV comes from Egypt, Morocco and Tunisia, where both

indigenous and classical IBV variants appear to be present (De Wit et al., 2011). In Western Africa, a high prevalence (26%) of IBV in poultry was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and a novel IBV variant “IBADAN” has been described (Ducatez et al., 2009).

In Morocco, the first isolation and characterization of IBV from poultry flocks was reported by El-Houadfi and Jones (1985). Five isolates designated D, E, F, H and M were related serologically to the Massachusetts (Mass) serotype, while a new genotype, G strain was reported to differ from the Mass serotype and other European serotypes known at that time. The authors demonstrated under experimental conditions that Mass vaccines provided poor protection against the G strain (El-Houadfi et al., 1986). Interestingly, S1 sequence data have shown that IBV G and 4/91 strains are very closely related, probably sharing a common origin (Jones et al., 2004).

In 2004, a study investigated the relationships between IBV and outbreaks of nephropathogenic disease observed in

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: elhoadfimoammed@yahoo.fr
Both My Mustapha Ennaji and Mohammed El-Houadfi contributed equally to this work.
(Received 15 October 2014; accepted 26 February 2015)

© 2015 Houghton Trust Ltd

Résumé

Pasteurella est considérée comme le principal pathogène des voies respiratoires chez les ruminants. *Mannheimia haemolytica* et *Pasteurella multocida* ont été étudiées et typées à partir d'écouvillons nasaux et de tissus prélevés sur des moutons, des chèvres et des bovins. En effet, 41 échantillons de poumons et 121 écouvillons nasaux ont été collectés sur des animaux suspects de la pasteurellose entre janvier 2015 et décembre 2017 dans six régions différentes du Maroc. Les échantillons ont été soumis à un test de criblage par PCR en temps réel dont les positifs ont fait l'objet d'une culture sur gélose au sang. Les isolats identifiés ont été confirmés par PCR conventionnelle. Le pouvoir pathogène des isolats a été évalué chez la souris et un examen histopathologique a été réalisé sur certains tissus pulmonaires. Ensuite, un test de sensibilité antimicrobienne (AST) a été réalisé pour 41 isolats sur un panel de 13 antibiotiques les plus utilisés en médecine vétérinaire. Une multirésistance aux antibiotiques a été observée même pour la colistine préservée comme antibiotique de dernier recours. Pour confirmer ces résultats, nous avons déterminé le profil de la colistine par la recherche de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et nous avons procédé à la détection du gène *mcr-1* par PCR en temps réel. A notre connaissance, la présente étude est la première étude au Maroc qui rapporte des infections par *Pasteurella* (*M. haemolytica* & *P. multocida*) chez les ruminants. Pour les deux espèces de *Pasteurella*, l'Amoxicilline/Acide Clavulanique était l'agent antimicrobien le plus efficace, la résistance à la colistine a été confirmée. Aussi, nos résultats suggèrent la nécessité et l'urgence d'établir un programme national de surveillance pour déterminer l'antibiotique approprié pour le traitement de la pasteurellose. Par conséquent, la production de vaccin inactivé à partir des souches autochtones, est hautement nécessaire pour atténuer l'impact de la bactérie chez les animaux. Pour cela un lot expérimental de vaccin inactivé a été produit à partir d'une souche sélectionnée dont sa protection a été évalué sur le plan sérologique.

Mots clés : *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, PCR, histopathologie, pathogénicité, antibiorésistance, vaccin, Maroc.

Abstract

Pasteurella is considered the major pathogen of the respiratory tract in ruminants. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* were studied and typed from nasal swabs and tissues collected from sheep, goats and cattle. Indeed, 41 lung samples and 121 nasal swabs were collected from suspected animals with pasteurellosis between January 2015 and December 2017 in six different regions of Morocco. The samples were submitted under a screening test by real time PCR, then the samples coming out positive were subject to culture on blood agar, after which the identified isolates were confirmed by PCR gel based. The pathogenicity of the isolates was evaluated in mice and histopathological examination was performed on selected lung tissues. Then, an antimicrobial susceptibility test (AST) was performed for forty-one isolates on a panel of 13 antibiotics most commonly used in veterinary medicine. A multiresistance to antibiotics was observed even for colistin preserved as an antibiotic of last resort. To confirm that we used different tools such as minimum inhibitory concentration (MIC) to determine the profile of colistin, in addition, we studied real-time PCR to detect the *mcr-1* gene. To our knowledge, the present study is the first study in Morocco reporting *Pasteurella* (*M. haemolytica* & *P. multocida*) infections in ruminants. For both *Pasteurella* species, Amoxicillin/Acid clavulanic was the most effective antimicrobial agent, colistin resistance was confirmed. Thus, our results suggest the need and urgency to establish a national surveillance program to determine the appropriate antibiotic for the treatment of pasteurellosis. Therefore, the production of inactivated vaccine from indigenous strains is highly necessary to mitigate the impact of the bacteria in animals. For this purpose, an experimental batch of inactivated vaccine was produced from a selected strain whose protection was evaluated serologically.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, PCR, histopathology, pathogenicity, antibiotic resistance, vaccine, Morocco.