

SYNDROME DES ŒUFS A EXTREMITÉ DE VERRE : COMPARAISON DE LOTS DE POULES PONDEUSES VACCINÉES OU NON AVEC UN AUTOVACCIN.

Gautier-Bouchardon A.V.^{1,2}, Ferré S.^{1,2}, Balan O.^{1,2}, Kempf I.^{1,2}

¹Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses), Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Mycoplasmaologie-Bactériologie et Antibiorésistance, Ploufragan, France.

²Université Bretagne Loire, Rennes, France.
anne.bouchardon@anses.fr

RÉSUMÉ

Mycoplasma synoviae (MS) provoque des infections sub-cliniques des voies respiratoires supérieures et des synovites infectieuses chez la poule et la dinde, et le syndrome des œufs à extrémité de verre chez la poule pondeuse. L'injection d'un autovaccin (souche autogène tuée) a été réalisée dans un élevage touché par le syndrome, sur 6000 poules de 39 semaines (lot A) et de 50 semaines (lot B). Des écouvillonnages (trachéaux (ET) et cloacaux (EC)) et des prises de sang ont été réalisés tous les 15 jours pendant 2,5 mois chez les poules vaccinées et non. Le pourcentage d'œufs déclassés a été calculé chaque mois. Les cultures ont été effectuées en milieu FM4 liquide et analysées avec une PCR spécifique de MS. Les sérums ont été testés par agglutination rapide sur lame (ARL) et ELISA. De grandes variations ont été observées au cours du suivi au niveau du pourcentage d'ET ou d'EC positifs, sans différence significative entre les lots A et B et les poules vaccinées et non vaccinées dans chacun de ces deux lots. Une diminution globale significative du nombre d'œufs déclassés a été observée dans les groupes vaccinés. Une différence significative a été observée entre l'ARL et l'ELISA, avec respectivement 16,7 à 93,3% et 73,3 à 100% des poules séropositives par ARL et ELISA. Une dilution systématique au 1/5 et une décomplémentation des sérums avant le test ARL ont éliminé cette différence. Ces résultats suggèrent que la vaccination avec une souche autogène tuée ne permet pas de réduire l'infection par MS chez les poules mais peut permettre de réduire le pourcentage d'œufs déclassés. Les différences observées entre les tests ARL classiques et modifiés montrent l'importance du choix des techniques de diagnostic utilisées pour détecter les infections par MS.

ABSTRACT

Eggshell apex abnormality syndrome: comparison between groups of laying hens vaccinated or not with an autogenous killed strain.

Mycoplasma synoviae (MS) causes subclinical upper respiratory infection and infectious synovitis in broilers and turkeys, and is responsible for eggshell apex abnormalities in layer flocks. Inoculation with an autogenous vaccine was performed in a laying-hen farm after an increase in eggshell breakage was noted in two flocks. Vaccination was performed on 6000 39 week-old hens (flock A) and 50 week-old hens (flock B). Tracheal (TS) and cloacal (CS) swabs and blood samples were collected every two weeks for 2.5 months from vaccinated and unvaccinated hens. The percentage of downgraded eggs was also calculated every month for each group. Cultures were performed in FM4 broth medium. TS, CS and cultures were also analysed by a MS-specific PCR. Blood samples for MS serology were tested by rapid plate agglutination (RPA) and ELISA. MS was isolated from TS and CS, but large variations were observed in the percentage of MS-positive TS and CS at different times during the follow-up, without an overall significant difference between groups. Detection of MS was significantly higher in TS than in CS swabs in the two flocks. However, a marked increase in the number of MS-positive CS was observed in all groups of hens between one and two months after the start of the monitoring. The percentage of downgraded eggs varied over time, but the results showed an overall significant decrease in the number of downgraded eggs in groups of vaccinated hens. A significant difference was observed between results of the two serological tests, with 16.7 to 93.3% and 73.3 to 100% of MS-positive hens by RPA and ELISA, respectively. A systematic 1/5 dilution and decomplexation of all sera before the RPA test eliminated this difference. These results suggest that vaccination with an autogenous killed strain does not reduce MS infection in hens but may reduce the percentage of downgraded eggs. These results show the importance of the diagnostic techniques used to detect MS infections in laying hens.

INTRODUCTION

Mycoplasma synoviae (MS) provoque des infections subcliniques des voies respiratoires supérieures (entraînant des diminutions des performances zootechniques dans les troupeaux) et des synovites infectieuses (arthrites, boiteries) chez la poule et la dinde (Fergusson-Noel et Noormohammadi, 2013). MS est également responsable du syndrome des œufs à extrémité de verre (EAA, pour eggshell apex abnormalities) dans les troupeaux de poules pondeuses. Ce syndrome est à l'origine d'anomalies de l'apex de la coquille de l'œuf (Feberwee *et al.*, 2009a). Les pertes économiques sont principalement dues à la casse, à la dégradation des œufs et à l'augmentation des coûts de main-d'œuvre engendrés par les temps accrus de tri et de nettoyage des installations dans les élevages et les centres de conditionnement (Gautier-Bouchardon, 2012). L'EAA a été signalé dans plusieurs pays (Feberwee et Landman, 2008).

Les traitements antibiotiques (tétracycline ou tylosine) réalisés dans les élevages atteints par l'EAA permettent de faire diminuer significativement le taux d'œufs déclassés de façon transitoire, mais les signes cliniques réapparaissent quelques jours après l'arrêt des traitements. Des autovaccins et des vaccins commerciaux sont également utilisés pour lutter contre l'EAA mais peu d'études sont disponibles. La vaccination avec le vaccin vivant atténué MS-H permet de réduire d'environ 50% le taux d'œufs déclassé (Feberwee *et al.*, 2009b).

Une étude sur le terrain a été menée dans un élevage français de poules pondeuses pour suivre la réponse à un vaccin autogène après des problèmes croissants de fragilité de coquilles avec observation d'œufs à extrémité de verre dans deux lots de cet élevage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Vaccination et prélèvements effectués dans les différents lots

L'autovaccin a été préparé à partir d'une souche de *M. synoviae* isolée dans un élevage à partir d'un écouvillonnage cloacal d'une poule dans un lot atteint par le syndrome EAA.

Une injection unique de l'autovaccin dans le même élevage a été réalisée sur 6000 poules de 39 semaines (lot A) et 6000 poules de 50 semaines (lot B). Toutes les autres poules des deux lots n'ont pas été vaccinées (46000 poules par lot).

Différents prélèvements ont été effectués tous les 15 jours pendant 2,5 mois chez les poules vaccinées et non vaccinées des deux lots. Des écouvillonnages trachéaux et cloacaux ont été réalisés pour effectuer des isollements bactériologiques ou des PCR. Des prises de sang au niveau de la veine alaire ont

également été réalisées pour la recherche d'anticorps anti-*M. synoviae* dans les sérums. Les prélèvements ont été réalisés sur 30 poules prises au hasard dans les différents lots, vaccinés ou non vaccinés.

Le pourcentage d'œufs déclassés a également été calculé chaque mois.

Aucun traitement antibiotique n'a été mis en place durant toute la durée de ce suivi.

1.2. Traitement des prélèvements au laboratoire

Les écouvillonnages trachéaux et cloacaux ont été placés dans 2 mL d'eau peptonée tamponnée et vortexés. Ces suspensions initiales ont ensuite été utilisées pour effectuer en parallèle :

- des mises en culture : quatre dilutions de raison 10 en milieu de culture liquide FM4 (Frey *et al.*, 1968) supplémenté avec des antibiotiques, pour limiter la croissance de contaminants ;

- des tests PCR spécifiques de *M. synoviae* (PCR-MS, Lauerma *et al.*, 1993) après une étape de lyse (Kellog et Kwok, 1990).

La croissance des mycoplasmes en milieu de culture a été détectée par virage du milieu de culture (dû à leur activité métabolique). La présence de *M. synoviae* dans les cultures virées a été confirmée ou infirmée par mise en culture sur milieu FM4 gélosé et par PCR-MS.

Les prélèvements de sang (entre 1 et 2 mL par poule) ont été centrifugés pour récolter les sérums. La présence d'anticorps dirigés contre *M. synoviae* a ensuite été investiguée par différentes méthodes sérologiques :

- la technique d'agglutination rapide sur lame classique (ARL) (OIE, 2008 et norme NF U47-012) : mise en présence de 25 µL de sérum (entre 24 et 72 h après la prise de sang) et 25 µL d'antigène (*M. synoviae*, Soleil SARL ou Biovac) ; les sérums positifs (mise en évidence d'une réaction d'agglutination) ont ensuite été dilués au 1/5 et décomplémentés (30 min à 56 °C ± 1 °C) avant d'être retestés ; seuls les sérums encore positifs après dilution/décomplémentation ont été considérés comme positifs, comme préconisé par l'OIE et par la norme NF U47-012 ;

- une technique ARL modifiée (ARL dilution) : dilution et décomplémentation systématique de tous les sérums avant la mise en présence des sérums et de l'antigène ;

- une technique ELISA (*Mycoplasma synoviae* Kit (Ab), Biocheck) permettant de détecter les anticorps anti-*M. synoviae* mise en œuvre selon les recommandations du fournisseur.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

M. synoviae a été isolé à partir d'écouvillonnages trachéaux et cloacaux dans tous les lots de poules pondeuses, vaccinées ou non. Cependant, de grandes variations ont été observées au cours du suivi au

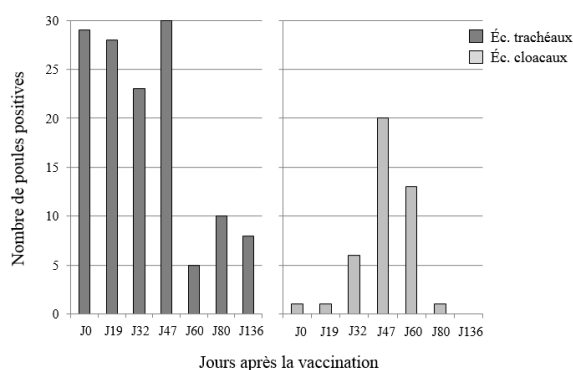
niveau du pourcentage d'écouvillonnages trachéaux ou cloacaux positifs (Figure 1), sans différence significative entre les lots A et B et les poules vaccinées et non vaccinées dans chacun de ces deux lots. *M. synoviae* a été détecté de façon significativement plus élevée dans les écouvillons trachéaux que dans les écouvillonnages cloacaux pour la plupart des dates d'échantillonnage.

Une diminution du nombre d'écouvillonnages trachéaux positifs a été mise en évidence en fin de suivi (à partir de J60, Figure 1), sans relation avec la vaccination (résultats similaires chez les poules vaccinées ou non vaccinées) un traitement antibiotique (pas de traitement administré pendant toute la durée du suivi).

Une augmentation marquée du nombre d'écouvillonnages cloacaux positifs vis-à-vis de *M. synoviae* a été temporairement observée, entre J32 et J60, dans les deux lots, à partir de poules vaccinées ou non (Figure 1).

Ces différents résultats suggèrent que la vaccination avec une souche autogène tuée n'a pas d'effet sur l'infection des poules pondeuses au niveau trachéal ou cloacal par *M. synoviae*. Ils sont en accord avec ceux de Feberwee et collaborateurs (2017) qui ont montré que la quantité de *M. synoviae* excrétée par des poules vaccinées avec le vaccin vivant atténué commercial MS-H et celle excrétée par des poules non vaccinées étaient identiques.

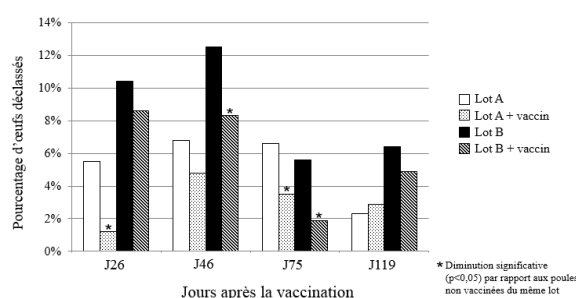
Figure 1. Détection de *M. synoviae* par une PCR spécifique à partir des écouvillonnages trachéaux et cloacaux des poules pondeuses non vaccinées du lot A. Des résultats similaires ont été obtenus pour les poules vaccinées du lot A et pour les poules vaccinées ou non vaccinées du lot B.



Le pourcentage d'œufs déclassés (œufs cassés ou souillés) a varié au cours du temps : entre 1,5 et 12,5 % en fonction des lots, avec un taux de déclassement plus élevé dans le lot B (pour trois des quatre dates de calcul de ce pourcentage au cours du suivi) (Figure 2). Cette différence pourrait être dû au fait que les poules du lot B étaient plus âgées de 11 semaines par rapport au lot A, avec des signes cliniques plus marqués et présents dans ce lot depuis plus longtemps.

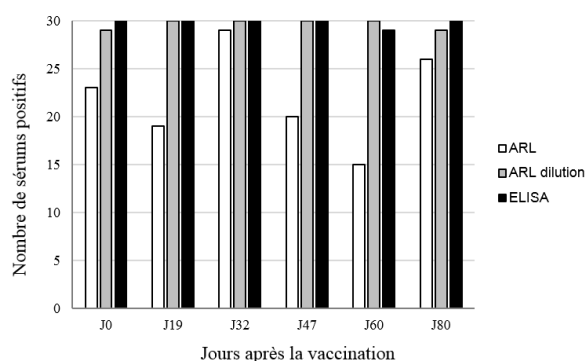
Les résultats ont cependant montré une diminution globale (et significative pour certaines dates du suivi) du nombre d'œufs déclassés chez les poules vaccinées par rapport aux poules non vaccinées dans les deux lots (Figure 2), suggérant un effet de la vaccination. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Feberwee *et al.* (2009b) qui ont montré une diminution d'environ 50 % du pourcentage d'œufs déclassés dans des lots de poules exemptes d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) vaccinées par le vaccin MS-H puis infectées expérimentalement par *M. synoviae* comparées à des poules non vaccinées.

Figure 2. Pourcentage d'œufs déclassés dans les deux lots de poules pondeuses, vaccinées ou non.



La comparaison des différents tests sérologiques a mis en évidence une différence significative, dans tous les lots, chez les poules vaccinées ou non vaccinées, entre les résultats de l'ARL et de l'ELISA, avec respectivement 16,7 à 93,3 % et 73,3 à 100 % des poules séropositives par ARL et ELISA (Figure 3). Une dilution systématique au 1/5 suivie d'une décomplémentation des sérums avant de mettre en œuvre le test ARL ont éliminé cette différence, avec 66,7 à 100 % des poules positives avec ce test ARL modifié (Figure 3).

Figure 3. Comparaison de trois méthodes sérologiques pour détecter des anticorps spécifiques de *M. synoviae* dans les sérums des poules non vaccinées du lot A. Des résultats similaires ont été obtenus dans les deux lots de poules, vaccinées ou non, et avec les deux antigènes disponibles dans le commerce (Soleil SARL et Biovac).



Cette différence entre tests sérologiques a déjà été mise en évidence au sein de notre laboratoire dans d'autres élevages de poules/poulets infectés par *M. synoviae* ou *M. gallisepticum* (Gautier *et al.*, 2017) et pourrait être à l'origine de la non détection d'animaux positifs (faux négatifs) par la méthode ARL sur le terrain. Cette différence pourrait être due à un effet prozone, décrit lorsque des concentrations élevées d'immunoglobulines sont présentes dans le sérum, et qui disparaît en effectuant une dilution des sérums à tester (Butch, 2000).

CONCLUSION

Ces résultats suggèrent que la vaccination avec une souche autogène tuée ne permet pas de réduire l'infection par *M. synoviae* dans des lots de poules pondeuses atteintes par le syndrome EAA, mais peut permettre de réduire le pourcentage d'œufs déclassés. Les différences observées entre les tests ARL classiques et modifiés montrent l'importance du choix des techniques de diagnostic utilisées pour détecter les infections par *M. synoviae*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Butch A.W., 2000. Clin Chem., 46 : 1719–1721.
- Feberwee A., Landman, 2008. World Poultry, 24, 22-23.
- Feberwee A., de Wit J.J., Landman W.J., 2009a. Avian Pathol., 38 (1), 77-85.
- Feberwee A., Morrow C.J., Ghorashi S.A., Noormohammadi A.H., Landman W.J., 2009b. Avian Pathol., 38 (5), 333-340.
- Feberwee A., Dijkman R., Klinkenberg D., Landman W.J., 2017. Avian Pathol., 46 (4) :346-358.
- Fergusson-Noel N., Noormohammadi A., 2013. In Diseases of poultry (Swayne D.E. *et al.*, Eds.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 877-893.
- Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P., 1968. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
- Gautier-Bouchardon A.V., 2012. Le Nouveau Praticien Vétérinaire, 5 (20), 40-43.
- Kellog, D.E., Kwok, S., 1990. In PCR Protocols (Innis M.A. *et al.*, Eds.). Academic Press, San Diego, USA, pp. 337-347.
- Lauerman L.H., Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., Van Santen V.L., 1993. Avian Dis., 37, 829-834.
- Manuel terrestre de l'OIE, 2008. pp 525-541.
- Norme NF U47-012, 2009. AFNOR.