

RENCONTRES INTERPROFESSIONNELLES DE PATHOLOGIE AVIAIRE

Rennes

Juin 2002

Organisées par :

Synthèse Élevage - Groupe Chêne-vert

Rue Marie Curie

BP 39

35 137 PLEUMELEUC

Tél. 02 99 06 10 06

e-mail : syntheseelevage@chene-vert.com

Sommaire

- Page 3** **LES BASES REGLEMENTAIRES DE L'AMM ET SES CONSEQUENCES SUR LE TERRAIN**
Jean-François SOU – responsable gamme aviaire VIRBAC.
- Page 8** **LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES : dans le cadre de leur utilisation chez les animaux de production destinés à la consommation humaine**
Françoise PICHARD – responsable gamme aviaire PHARMACIA SANTE ANIMALE.
- Page 12** **LES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES : (in)compatibilités thérapeutiques, physiques et chimiques**
Dr. Claire JACQUINET – responsable gamme aviaire CEVA SANTE ANIMALE.
- Page 22** **LA CELLULITE CHEZ LE POULET À GRILLER**
Dr. Martine BOULIANNE – professeur à L'UNIVERSITE DE MONTREAL.
- Page 27** **UTILISATION DE LA SEROLOGIE POUR LE SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE DES TROUPEAUX DE VOLAILLES.**
Dr. Yannick GARDIN – consultant en pathologie aviaire, SOLEIL SARL.
- Page 44** **LA DECROISSANCE DES ANTICORPS MATERNELS GUMBORO CHEZ LES SOUCHES A CROISSANCE INTERMEDIAIRE.**
Dr Anne-Christine DUFAY, responsable gamme aviaire INTERVET.
- Page 51** **PRESENTATION DE L'ETUDE PCR-IMAGERIE MEDICALE, RESULTATS ET CARTOGRAPHIE VIROLOGIQUE.**
Dr. Françoise BIET, responsable gamme aviaire FORT DODGE.
- Page 52** **LA PREVENTION VACCINALE DES COCCIDIOSES UTILISATION DES PARACOX**
Dr. Yannick FREMOND, responsable gamme aviaire SCHERING-PLOUGH VETERINAIRE.
- Page 57** **DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A PNEUMOVIRUS AVIAIRE PAR PCR**
Dr. Stéphane LEMIERE, responsable gamme aviaire LABORATOIRE MERIAL.

Les bases réglementaires de l'AMM et ses conséquences sur le terrain

J-F. SOU – VIRBAC. RIPPA - juin 2002

Les critères d'enregistrement des nouveaux médicaments antibiotiques vétérinaires évoluent. Conséquence la plus visible pour l'utilisateur, la plus grande précision mais en même temps la limitation des indications thérapeutiques et espèces cibles. Connaître les nouvelles exigences réglementaires à la base de ces changements pour l'enregistrement des médicaments antibiotiques vétérinaires permet au prescripteur et à ses clients de mieux en comprendre les enjeux pour faire un choix éclairé.

1- Bases légales et réglementaires générales

Un médicament ne peut être mis sur le marché qu'après avoir reçu une autorisation par une autorité compétente qui en valide la qualité, la sécurité et l'efficacité sur la base d'un dossier fourni par la firme pharmaceutique.

L'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est délivrée soit par l'Agence Nationale du médicament dans le cadre d'une procédure nationale ou européenne de reconnaissance mutuelle soit directement par l'Agence Européenne du médicament dans le cadre d'une demande d'AMM européenne centralisée.

Un médicament ne peut être délivré et utilisé sur le territoire national que s'il satisfait à l'une ou l'autre des conditions. Il existe toutefois des médicaments non soumis à AMM :

Les préparations extemporanées ;

Les aliments médicamenteux (mais les usines d'aliment doivent être agréées et doivent utiliser des prémélanges médicamenteux disposant d'une AMM) ;

1- Les autovaccins (mais les fabricants doivent être autorisés par l'AFSSA) ;

2- Les médicaments homéopathiques destinés aux espèces non productrices de denrées alimentaires.

Conséquence

A l'exception des quelques médicaments ayant reçu une AMM centralisée, il n'y a pas de libre circulation des médicaments disposant d'une simple AMM nationale dans la CEE (sauf cas particulier de l'exercice transfrontalier de la médecine vétérinaire). Cette exception à l'accord de Shengen s'explique par l'hétérogénéité historique des niveaux d'exigences à l'enregistrement des médicaments entre les différents pays de l'union. Cette situation tendra à s'harmoniser progressivement puisque ce sont maintenant des directives européennes retranscrites en droit national qui gouvernent les exigences techniques à l'enregistrement national des nouveaux produits.

2- L'architecture d'un dossier d'AMM

Un dossier d'AMM est constitué de plusieurs parties :

Partie I : Résumé du dossier

Il contient les renseignements administratifs, les rapports d'expertises et le résumé des caractéristiques du produit (RCP).

Partie II : Qualité

Elle donne la composition qualitative et quantitative du médicament et toutes les informations relatives à la maîtrise de la fabrication et des contrôles. Elle contient également les protocoles et les résultats des essais de stabilité qui justifient la durée de validité du médicament.

Partie III : Sécurité.

Cette partie est composée de deux sous-parties :

- Innocuité : elle précise les données pharmacologiques et toxicologiques pour l'espèce cible, évalue les dangers pour l'utilisateur ou l'environnement (écotoxicité).
- Résidus : elle décrit les méthodes et essais ayant permis la détermination du délai d'attente.

Partie IV : Efficacité.

Elle contient les éléments permettant de justifier l'efficacité du médicament avec le schéma posologique retenu (dose, rythme d'administration, durée).

Pour l'utilisateur, **la seule partie pratique et visible de l'AMM** est représentée par le résumé des caractéristiques du produit ou « RCP » qui décrit « les modalités d'emploi explicites, correspondant aux justifications apportées par la documentation contenue dans le dossier » [Pr. L. Pinault]. En clair, il s'agit principalement des informations pharmacologiques, des indications thérapeutiques, des contre-indications, des espèces cibles, du schéma posologique, du délai d'attente, des précautions pour les animaux et l'utilisateur, des effets secondaires et de la validité. Pour le prescripteur, le RCP constitue un repère essentiel en terme d'information sur un produit. L'utilisation d'un médicament en conformité avec son RCP est une sécurité puisqu'elle n'engage pas sa responsabilité civile professionnelle en cas de problème. Mais l'utilisation d'un produit hors RCP est bien entendu possible à condition qu'elle puisse être justifiée.

3- Evolution du cadre réglementaire à l'enregistrement - conséquences

L'aspect très structuré de l'organisation d'un dossier d'AMM ne doit pas occulter les exigences techniques croissantes relatives à son contenu. On perçoit facilement cette évolution lorsque l'on compare les RCP de deux spécialités originales renfermant pourtant le même principe actif, mais validées à quelques années d'intervalle (cf. tableau). Cette évolution ne concerne évidemment pas les génériques (à l'exception de la partie qualité de leur dossier) dont le principe est de simplement démontrer la bioéquivalence à une spécialité ancienne (en général 10 ans) pour être enregistré par l'autorité compétente et bénéficier alors du même RCP.

	Suramox 10 % POS <i>Poudre Orale</i>	Suramox 50 % <i>Poudre Orale Volaille</i>
Date d'enregistrement	1987	2000
Espèces cibles	Volailles, porcs, veaux	Poulets de chair

Posologie	10 mg/kg/jour La posologie peut être augmentée dans les cas graves	20 mg/kg/jour
Indication thérapeutique	Affections à germes sensibles	Poulet : prévention en milieu infecté des colibacilloses respiratoires
Délai d'attente	2 jours	7 j

Retenons de cet exemple qu'il est représentatif de la situation actuelle où coexistent des spécialités anciennes bénéficiant d'indications thérapeutiques larges, de nombreuses espèces cibles et de délais d'attentes courts et des spécialités plus récentes mieux évaluées mais moins larges dans leurs indications. Cette situation génère une réaction de perplexité voire de rejet de la part des utilisateurs qui tendent parfois à privilégier les anciennes spécialités tant il est évident qu'elles sont plus confortables à gérer sur le terrain. Mieux comprendre les raisons de cette évolution permet toutefois de saisir les risques de son refus. Voici les plus importantes.

3.1- Evolution en matière de prévention des résidus dans la filière

Rappelons d'abord que le but de la réglementation est ici de garantir la sécurité du consommateur vis-à-vis des résidus de médicament. Deux facteurs majeurs expliquent l'évolution actuelle et à venir des délais d'attente :

- La fixation des Limites Maximales de Résidus (LMR) définitives pour chaque espèce cible et tissu cible ;
- Les nouvelles méthodes de calcul du délai d'attente appliquées à chaque espèce qui font appel à des calculs statistiques pour extrapoler à l'échelle d'une population les résultats individuels obtenus sur un échantillon d'animaux.

• Les Limites Maximales de Résidus

Historiquement, la détermination d'un délai d'attente était basée sur l'absence de résidus, donc étroitement lié à la limite de détection des méthodes analytiques disponibles. Avec les progrès constants des techniques d'analyses qui repoussaient en permanence les seuils de détection, il était devenu incontournable de quantifier les limites en résidus acceptables dans les denrées animales issues d'animaux traités. Ainsi, pour chaque principe actif autorisé, ont été fixées des LMR (Limites Maximales de Résidus) valables pour tous les pays de l'Union européenne sur la base d'études toxicologiques. Un médicament autorisé dispose forcément d'une LMR provisoire ou définitive pour l'espèce concernée.

Par exemple, les LMR définitives de l'amoxicilline telles qu'elles figurent en annexe I du règlement LMR 2377/90/CEE n°508/99 sont :

- Pour la viande et les abats, quelle que soit l'espèce : 50 µg/kg
- Pour le lait : 4 µg/kg

L'étape suivante consiste alors à déterminer combien de temps il est nécessaire d'attendre après la fin d'un traitement pour s'assurer qu'une population d'animaux traités présente des taux résiduels inférieurs à la limite fixée.

- **Le calcul du délai d'attente**

L'étude de « déplétion tissulaire » ou étude de résidus fournit des valeurs individuelles de résidus présents à différentes dates après la fin du traitement pour chaque tissu contrôlé.

Jour après arrêt du traitement	Muscle	Foie	Rein	Peau + graisse
1	< 20* - 86	< 20* - 72	< 20* - 48	132 - 348
2	< 20* - 49	< 20* - 43	< 20* - 26	< 20* - 81
3	< 20* - 39	< 20* - 43	< 20* - 28	< 20* - 86
5	< 20* - 34	< 20* - 31	< 20*	< 20* - 48

Valeurs extrêmes des concentrations tissulaires en amoxicilline ($\mu\text{g}/\text{kg}$) chez le poulet de chair après administration de Suramox 50 dans l'eau de boisson à la posologie de 20 mg/kg/j pendant 5 jours.

* inférieur à la limite de quantification

La dispersion des valeurs obtenues permet de se rendre compte de la variabilité individuelle de l'élimination d'un médicament qui doit être prise en compte dans le calcul du délai d'attente. Même si l'échantillon est représentatif, il donne une valeur proche de la réalité pour la *moyenne* mais pas pour les *extrêmes* susceptibles d'être rencontrés sur le terrain. En effet, la probabilité de rencontrer des valeurs éloignées de la moyenne est liée à la taille de l'échantillon. La gestion des risques de résidus à l'échelle d'une filière de production met en jeu des effectifs importants. **Par conséquent il n'est pas recevable de décider que le délai d'attente est le temps nécessaire pour que tous les échantillons présentent des taux résiduels en dessous de la LMR.** Dans notre exemple, cela reviendrait à définir 2 jours de temps d'attente pour le muscle ou 5 jours pour la peau et graisse...

La ligne directrice européenne fixe comme objectif que 95 % des échantillons de la population totale traitée doivent présenter des concentrations résiduelles inférieures aux LMR. Dans notre exemple, le délai d'attente calculé selon ces nouvelles lignes directrices est de 6 jours pour le muscle, alors que 2 jours après l'arrêt du traitement tous les échantillons présentent des taux résiduels inférieurs aux LMR.

Cette méthode peut être mise en œuvre uniquement si la modélisation des données est possible selon un modèle de régression linéaire.

Lorsque les hypothèses portant sur la déplétion tissulaire ne sont pas vérifiées (selon un modèle de régression linéaire), ce qui est le cas dans notre exemple pour les tissus peau et graisse, la ligne directrice européenne recommande alors un coefficient de 30 % à rajouter au temps à partir duquel les échantillons ont une concentration inférieure à la LMR. Soit dans notre étude : 5 jours* x 1,3 = 6,5 jours arrondi à **7 jours** (* peau + graisse).

3.2- Evaluation de l'efficacité

Les exigences relatives à la démonstration de l'efficacité ont aussi considérablement évolué. Elles limitent le nombre d'espèces et d'indications thérapeutiques qu'il est possible de valider dans l'AMM pour des raisons de coût. En effet, toute indication revendiquée sur l'étiquetage d'un produit doit, pour les nouveaux dossiers, être parfaitement démontrée et documentée. Des investigations *in vitro* et *in vivo* doivent être engagées pour chaque couple espèce animale / germe visé afin de justifier le

schéma posologique retenu (dose, rythme et durée d'administration) et son efficacité sur le terrain. En conséquence, à l'exception des nouveaux produits génériques, les mentions du type « affections à germes sensibles » sont bien d'une autre époque.

Mais l'évolution ne s'arrête pas là. Depuis peu, l'antibiorésistance entre dans le champ de l'évaluation des nouveaux dossiers. Ainsi, le schéma posologique retenu doit être non seulement efficace (voir plus haut) mais doit également minimiser l'émergence de résistances sur les bactéries pathogènes de l'espèce cible ainsi que sur les germes zoonotiques ou commensaux susceptibles d'être transmis à l'homme.

Au bilan, la volonté légitime de maîtriser de façon toujours plus sûre les risques liés à l'utilisation des produits conduit inéluctablement à limiter les indications et espèces cibles validées dans les nouvelles AMM. Si cette situation est légitime et indolore lorsqu'il s'agit d'un principe actif original qui n'a jamais été utilisé auparavant, elle est en revanche beaucoup plus délicate à gérer sur le terrain dans le cadre d'une réactualisation des données concernant une molécule déjà largement utilisée et qui bénéficie toujours d'indications larges et de délais d'attentes plus courts dans des spécialités anciennes. Derrière la praticité d'un délai d'attente court mais non réactualisé et l'apparente sécurité que procure au prescripteur le RCP, se cache en réalité une insécurité pour la filière, évaluée sur le critère totalement actualisé du respect des LMR. Le vétérinaire prescripteur, garant de la défense du consommateur donc en premier lieu du respect des LMR doit alors retrouver un rôle central dans l'information de ses clients pour les sensibiliser à l'actualisation des connaissances.

La résistance aux antibiotiques

*dans le cadre de leur utilisation
chez les animaux de production destinés à la consommation humaine*

**Dr Françoise Pichard,
PHARMACIA Santé Animale**

Introduction

Les antibiotiques sont des outils essentiels dans la lutte contre les maladies infectieuses. Cependant, dès leur découverte au début du XX^{ème} siècle, il est apparu des phénomènes de résistances parmi les populations bactériennes. Ce constat a conduit à établir des règles d'utilisation dites " de bonnes pratiques " visant à réduire ce risque, tant en médecine humaine qu'en médecine animale. Cependant depuis quelques années un troisième type de risque fait l'objet de débats et de polémiques : la sélection et la transmission de souches bactériennes de l'animal destiné à la consommation humaine à l'Homme et responsables d'infections incurables chez l'Homme.

Les conférences internationales sur l'antibiorésistances organisées par l'OIE, l'AFFSSA et l'Organisation Mondiale de la Santé en 1999 et 2001 se sont fixé une mission de surveillance, d'information, de coordination, de proposition de mesures, et d'harmonisation.

Elles se sont conclues par la nécessité de faire connaître cette information à toutes les parties prenantes, en particuliers, les laboratoires de diagnostic, les laboratoires pharmaceutiques, les prescripteurs (médecins et vétérinaires), et les patients (malades et propriétaires d'animaux).

C'est l'objectif de cette présentation.

Nous commencerons par rappeler quel est le problème et expliquer l'intérêt croissant pour ce sujet. Nous verrons ensuite les bases de l'antibiorésistances et nous terminerons par les recommandations de l'OIE.

1. Quel est le problème ?

L'utilisation des antibiotiques en médecine humaine comme en médecine vétérinaire peut être à l'origine de sélection de bactéries résistantes chez le patient, ces bactéries étant à l'origine de la maladie ou non, pathogènes ou non, présentes dans l'organisme du malade. Celui-ci peut transmettre ces bactéries porteuses de résistances à un membre de son entourage de son espèce ou non (d'un malade à un autre à l'hôpital, dans une même famille, etc...). Les bactéries animales peuvent être transmises à l'Homme. On parlera de zoonoses si des bactéries pathogènes pour l'Homme sont transmises de l'animal à l'Homme et de toxi-infections alimentaires si elles ont été acquises par la consommation d'aliments contaminés. Enfin, les aliments sont aussi susceptibles de transmettre au consommateur des bactéries pathogènes ou non,

porteuses de résistances multiples et responsables d'infections non traitables et fatales pour le patient.

Les animaux de production sont le réservoir de 4 germes pathogènes provoquant des zoonoses : *Salmonella*, *E coli O 157 :H7*, *Campylobacter*, *Enterococcus*.

Les intestins de la plus part des animaux et l'environnement (l'eau) en sont les réservoirs, les produits carnés et laitiers, l'eau et les fruits et légumes sont la source de contamination.

Pourquoi est-ce un problème croissant ?

Les raisons en sont multiples.

- Les goûts et habitudes alimentaires évoluent (regain des produits frais consommés crus).
- La “ mondialisation ” atteint les écosystèmes bactériens : les pays échangent des denrées alimentaires, des animaux et des voyageurs, pour motif professionnel ou tourisme.
- Les populations à risques augmentent : très jeunes prématurés, personnes âgées, immunodéprimés, séjours hospitaliers longs, chirurgie complexe.
- Les attentes des consommateurs évoluent de même que la notion de risque et de prise de responsabilités.
- Nous sommes à l'ère de la communication, les accidents sont communiqués immédiatement et globalement.
- L'informatique et l'Internet permettent d'accélérer la connaissance de données statistiques et le chiffrage du coût économique pour la société.
Ainsi par exemple, 2 millions de patients sont hospitalisés chaque année aux USA pour des infections bactériennes dont 50 à 60% sont dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques et 60 000 à 100 000 décès par an sont attribués à des infections nosocomiales (acquises à l'hôpital). De plus, les durées d'hospitalisation sont plus longues pour les patients atteints d'infections liées à des bactéries résistantes aux antibiotiques.
- Enfin, l'amélioration des techniques d'étude et de suivi des bactéries résistantes a permis de faire progresser les connaissances dans ce domaine.

Si ce problème existe et est important, il faut cependant faire une distinction entre danger et risque.

On définit comme danger ce qui peut causer un dommage aux êtres humains, animaux, plantes ou à l'environnement. On appelle risque la probabilité qu'un danger se produise. L'utilisation des antibiotiques en production animale est un thème d'actualité depuis 1970 et si le risque ne peut être ignoré, il doit être quantifié. Dans l'attente de savoir quantifier le risque associé aux dangers de transfert des bactéries résistantes de l'animal à l'Homme, des mesures de précaution ont été mises en place, connues sous le “ principe de précaution ”.

Ce risque est la résultante de l'accumulation des risques successifs : risque de maladie animale, de traitement, de sélection de résistance, de contamination de carcasse, risque lié à la conservation et au transport des aliments, risque lié à la quantité de bactéries nécessaires pour initier l'infection, etc... qui doivent eux aussi être déterminés et pris en compte.

1. Les bases de la résistance aux antibiotiques.

C'est un événement naturel qui a précédé l'utilisation des antibiotiques et existe pour toutes les espèces bactériennes associées aux animaux et aux plantes. C'est un processus constant, amplifié par la pression de sélection due à l'utilisation des antibiotiques.

Il faut distinguer la résistance innée (certaines souches sont par nature résistantes à certaines familles d'antibiotiques) de la résistances acquise, par mutation ou par transfert génétique.

Il existe 5 mécanismes possibles : l'inactivation, l'imperméabilité, l'efflux, le by-pass et la modification de la cible.

La mutation est une erreur de recopie lors de la réplication du brin d'ADN qui n'est pas un phénomène parfait. Ces mutations surviennent spontanément avec une fréquence variable selon les souches, les conditions du milieu et l'antibiotique. Parfois, la résistance n'apparaît qu'à la suite d'une succession de plusieurs mutations, c'est le cas de la résistance de Salmonella aux fluoroquinolones.

Le transfert est un échange de matériel génétique entre 2 bactéries de même type ou non, par l'intermédiaire de virus, les phages ou par le transfert direct d'un fragment d'ADN, le plasmide-R ou le transposon.

Les germes à l'origine des toxi-infections alimentaires ne sont souvent que des "passants innocents" et la circulation des résistances suit un circuit complexe, entre les animaux, les plantes, l'environnement, les malades hospitalisées et les humains.

2. Les recommandations de l'OMS et de l'OIE

- Evaluer les risques et les quantifier :

C'est un processus long et complexe, actuellement en cours et qui donne lieu à de nombreuses controverses.

- Surveiller les résistances

La recommandation est de suivre les variations des CMI, Concentrations Minimales Inhibitrices, déterminées selon des méthodes de références. Il faut également suivre les résistances cliniques, qu'il ne faut pas confondre avec les variations de CMI ni avec les concentrations inhibitrices critiques. Faire des réseaux de surveillance, entre laboratoires ayant les mêmes méthodes de travail et faire des suivis statistiques réguliers par région, hôpital, secteurs, pays, etc...

- Faire une utilisation adéquate des antibiotiques

Depuis quelques années, le public et le monde médical soulèvent plusieurs problèmes :

- L'utilisation de nouvelles classes d'antibiotiques réservées à la médecine humaine
- L'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance
- Les traitements antibiotiques de groupe
- Les traitements antibiotiques préventifs

C'est pourquoi les recommandations actuelles sont les suivantes :

Ne pas traiter sans faire de diagnostic

Traiter complètement et suffisamment longtemps

Ne pas traiter plus longtemps que nécessaire

Chacun doit promouvoir l'utilisation adéquate des antibiotiques à tous les niveaux : médecine humaine/vétérinaire

LES ASSOCIATIONS D'ANTIBIOTIQUES: (in)compatibilités thérapeutiques, physiques et chimiques

Dr. Claire JACQUINET, CEVA Santé Animale - RIPPA - juin 2002

Les associations d'antibiotiques: contexte

L'utilisation rationnelle d'un antibiotique repose, d'une part, sur l'étude de son activité *in vitro* vis-à-vis du germe en cause (c'est l'antibiogramme) et d'autre part, sur la connaissance de la cinétique des antibiotiques chez l'animal malade qui dicte le traitement à prescrire : produit contenant le principe actif, posologie, durée et rythme d'administration.

Or le développement d'antibiotiques très puissants et à très large spectre tels que les fluoroquinolones de 3ème génération, ont rendu moins nécessaire la démarche d'utilisation raisonnée des antibiotiques, avec pour conséquence un développement accru des résistances et une réduction progressive de l'arsenal thérapeutique.

L'usage de ces molécules en médecine vétérinaire restant enfin très controversé, les associations d'anti-infectieux apparaissent comme une alternative intéressante pour une optimisation de l'utilisation des anti-infectieux « basiques ».

Dans quel cas associer 2 anti-infectieux?

① Pour élargir le spectre antibactérien :

Lors d'infection poly microbienne (germes aérobies + anaérobies, G+ G-)

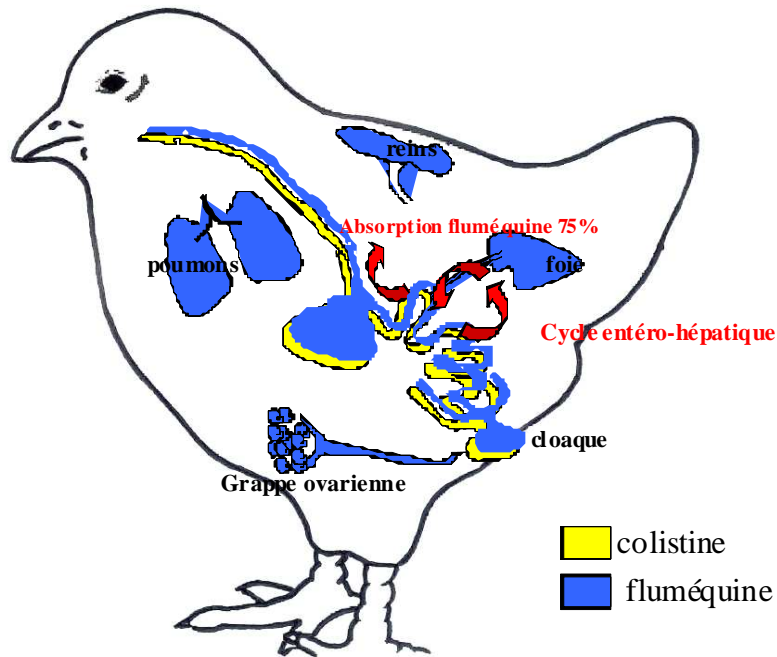
Exemples:

- érythromycine (G+, *Clostridium*, *spirochètes*) + colistine (G-, *Salmonella*, *E coli*)
- amoxicilline (G+) + colistine (G-)
- fluméquine (*E.coli*) + tétracycline (*Ornithobacterium*)

② Pour élargir la diffusion à différents sites infectieux:

- **association triméthoprime (intracellulaire) + sulfamides (extracellulaire, sang)**
- **colistine (intestin) + anti-infectieux absorbé (appareil respiratoire) comme triméthoprime- sulfamide/ fluméquine/ doxycycline/ oxytétracycline**

		COLISTINE	FLUMEQUINE	AMOXICILLINE	DOXYCYCLINE	ERYTHROMYCINE	TMP+ SULFADIAZINE
gram -	<i>Escherichia coli</i>	+++	++ (dose-dep)	+ (dose-dep)	+	- (anti-adhésine)	++
	<i>Salmonella sp</i>	+++	+++ (dose-dep)	++	+	-	++
	<i>Campylobacter sp</i>	++	++	++	+	+++	+
	<i>Pasteurella multocida</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++
	<i>Pasteurella haemolytica</i>	+++	++	++	++	+	++
	<i>Riemerella anatipestifer</i>	-	++	+++	+++	+	++
	<i>Ornithobacterium rhinotrach</i>	-	+/-	++	+++	+	-
gram +	<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	+++	++	+++	(+)
	<i>Staphylococcus sp</i>	-	++	+++	++	++	+++
	<i>Streptococcus sp</i>	-	+	+++	+	++	++
	<i>Erysipelothrix rhusopathiae</i>	-	-	+++	-	++	-
autres	<i>Mycoplasma sp</i>	-	-	-	+++	++	-
	<i>spirochètes</i>	-	-	-	-	++	-
	<i>Chlamydia sp</i>	-	-	-	+++	++	-
coccidies	<i>Eimeria sp</i>	-	-	-	-	-	(+)



Spectre de quelques anti-infectieux

- **③ Pour obtenir un effet synergique:**

Les premiers travaux concernant les associations d'antibiotiques remontent aux principes publiés par JAWETZ et GUNNISON en 1952. Malgré les nombreuses études réalisées depuis, on dispose encore de peu de données sur les associations d'antibiotiques actives sur les bactéries pathogènes rencontrées en pratique vétérinaire.

- La théorie: définition de la synergie (Jawetz et Gunnison 1952)

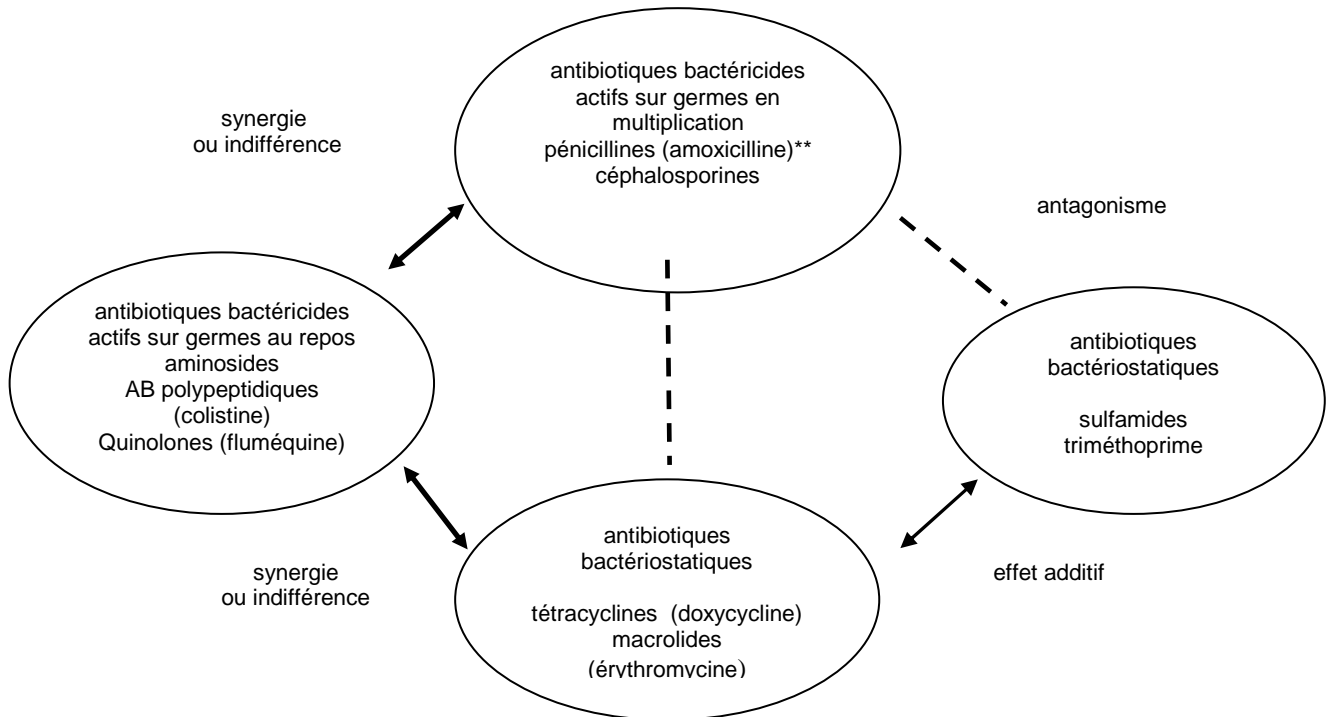
- Synergie : l'effet de l'association est significativement supérieur à l'effet de l'antibiotique le plus actif utilisé seul.
- Indifférence : l'activité de l'un des antibiotiques n'est pas affectée par la présence de l'autre.
- Addition : l'effet de l'association est égal à la somme des effets de chaque antibiotique étudié isolément à la même concentration que dans l'association.
- Antagonisme : l'association diminue l'activité de l'un ou l'autre des antibiotiques. Son activité est inférieure à l'effet de l'antibiotique le plus actif.

En fonction du mode d'action de l'antibiotique, les règles de JAWETZ sont énoncées comme suit :

- bactéricide + bactéricide = effet très souvent synergique, quelquefois indifférent, jamais antagoniste
- bactériostatique + bactériostatique = effet additif ou indifférent (pas de synergie ou antagonisme)
- bactéricide + bactériostatique = 2 sous-groupes
 - Bactéricide sur germes en multiplication et au repos: aminosides, polymyxine-colistine, fluoroquinolones, nitroimidazoles = effets généralement bénéfiques
 - Bactéricide sur germes en multiplication uniquement: bêta-lactamines (ampicilline, amoxicilline = effets généralement antagonistes (in vitro) (rôle antagoniste du bactériostatique unidirectionnel)

• **Quelques exceptions aux lois de Jawetz :**

- Synergie parfois inconstante dans une espèce bactérienne
- Sulfamides ne semblent pas exercer un effet antagoniste sur les pénicillines
- Notion relative des effets bactériostatiques ou bactéricides: un même antibiotique selon sa concentration et selon l'espèce bactérienne concernée peut exercer l'un ou l'autre effet sur la population bactérienne (érythromycine, doxycycline)
- Synergie de bactériostatiques: macrolides-tétracyclines (P. multocida), doxycycline (tétracyclines) - tiamuline sur mycoplasmes
- Antagonismes chloramphénicol-macrolides, macrolides – lincosamides



Associations d'antibiotiques (lois de Jawetz) (Puyt, 1993)

** pas d'effet antagoniste entre sulfamides et pénicillines (Loussouarn,98)

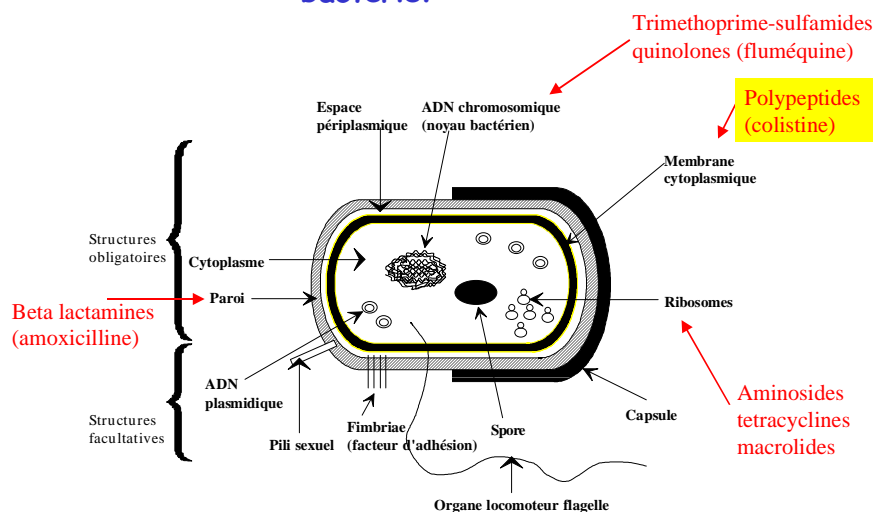
La synergie....quels mécanismes au niveau de la bactérie?

- Augmentation de la pénétration dans la bactérie des aminosides grâce aux bêta-lactamines par augmentation de la perméabilité de la paroi bactérienne: exemple association pénicilline-streptomycine (intramacrolide)
- Augmentation de la pénétration dans la bactérie de la fluméquine grâce à la colistine par déstabilisation de la membrane bactérienne
- Double blocage d'une même voie métabolique de la bactérie, à 2 niveaux successifs : exemple association triméthoprime + sulfamide, métronidazole + macrolide

Exemple de la colistine

- En théorie: augmentation de la pénétration dans la bactérie d'un antibiotique grâce à la colistine par déstabilisation de la membrane bactérienne (gram-).
- La colistine associée à d'autres antibiotiques : quelques études.
 - amoxicilline :synergie association sur *Salmonella typhimurium* (Espinasse), sur *Pasteurella haemolytica* (Ganière), sur *E. coli* (Loussouarn)
 - fluméquine : facilité l'entrée de la fluméquine dans les bactéries + absorption intestinale
 - o association synergique sur *E coli* chez le porc (FIC index<0,5), aucun effet sur *P.multocida* ou *Bordetella bronchiseptica* (données internes 1993)
 - aminosides : apramycine + colistine vis à vis de Salmonelles et colibacilles d'origine porcine (Ganière)
 - triméthoprime: synergie sur *E. coli* (potentialisation de la colistine par le TMP) (1970), sulfamides et TMP-sulfaméthoxazole: potentialisation de la colistine sur les souches sensibles (1970)
 - macrolides (érythromycine, tiamuline): érythromycine + colistine sur veaux (étude terrain, Ann rech vet)
 - tétracyclines : synergie oxytétracycline + colistine sur *P. multocida* (Loussouarn), synergie doxycycline + colistine sur *E.coli* et *S. pullorum* (1995)

ALE La synergie....quels mécanismes au niveau de la bactérie?



Cadres d'utilisation d'une synergie

- Bactéries peu sensibles: CMI et CMB élevées à la limite des concentrations critiques et proches des concentrations obtenus dans l'organisme
- Infections sévères chez les individus immunodéprimés
- Localisations infectieuses où la diffusion des antibiotiques est plus difficile:
 - Germes intracellulaires: Mycoplasmes, Chlamydiae...

La synergie: intérêts pour des applications terrain?

- Obtenir un effet bactéricide plus fort in vitro que celui de chaque antibiotique testé séparément, à des concentrations inférieures à la CMB de chaque antibiotique
 - une association synergique telle que fluméquine + colistine présente un grand intérêt dans le contrôle des colibacilloses et salmonelloses digestives du jeune âge afin de réduire efficacement le réservoir intestinal de ces germes pathogènes, de limiter leur dissémination dans l'environnement et par la suite la recontamination des volailles.
- Obtenir un effet bactéricide plus rapide que celui de chaque antibiotique testé séparément (phase précoce ou tardive): mesures « dynamiques » de la cinétique de bactéricidie
 - intérêts lors d'infections sévères (rapidité d'action), chez sujets immunodéprimés...
- Obtenir un effet bactéricide durable: inhibition des recroissances bactériennes: mesure « dynamique »
- ... Pour limiter le risque d'apparition de résistances pendant le traitement???
Intérêt pour des antibiotiques présentant un taux élevé de mutations bactériennes (égal ou supérieur à 10^8) provoquant seuls une résistance chromosomique rapide: fluoroquinolones, rifampicine, triméthoprime, streptomycine
 - l'utilisation d'une association synergique dans le jeune âge (par exemple fluméquine + colistine vis à vis des colibacilles) permet de réserver des molécules de très large spectre comme l'enrofloxacin pour un usage ultérieur si nécessaire, et ainsi d'en préserver l'efficacité au cours du temps.

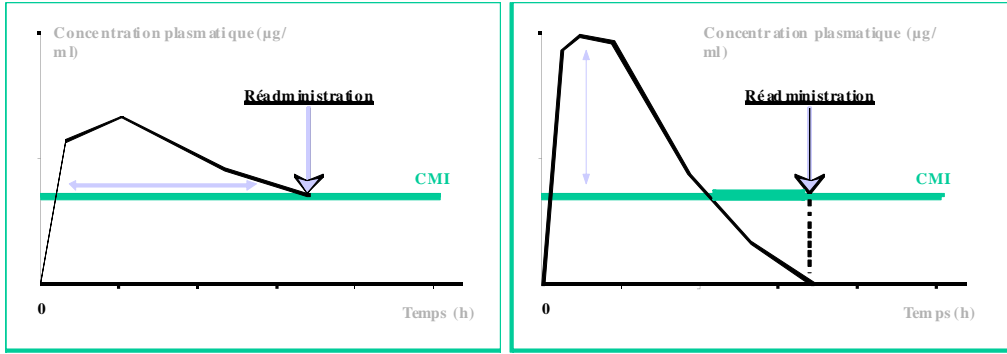
Cinétique de bactéricidie

Cette méthode permet de suivre l'activité antibactérienne dans le temps. Elle consiste à analyser l'évolution d'une population bactérienne dans le temps en fonction de différentes concentrations d'antibiotiques.

L'activité antibactérienne des antibiotiques isolés et associés est déterminée par numération à intervalles de temps définis (de 0 à 6 heures et à 24 heures) du nombre de bactéries survivantes. Les concentrations choisies de chacun des antibiotiques sont en général des multiples de la CMI préalablement déterminée ou des concentrations correspondant à celles obtenues in vivo.

La cinétique est représentée graphiquement par une courbe indiquant le logarithme (base 10) du nombre d'unités formant colonies par ml (UFC/ml) de culture bactérienne en fonction du temps.

En pratique...



Antibiotiques "temps -dépendants"

BACTERIOSTATIQUES (Tétracyclines, macrolides, pénicillines, sulfamides)
AMOXICILLINE / Pasteurelles,

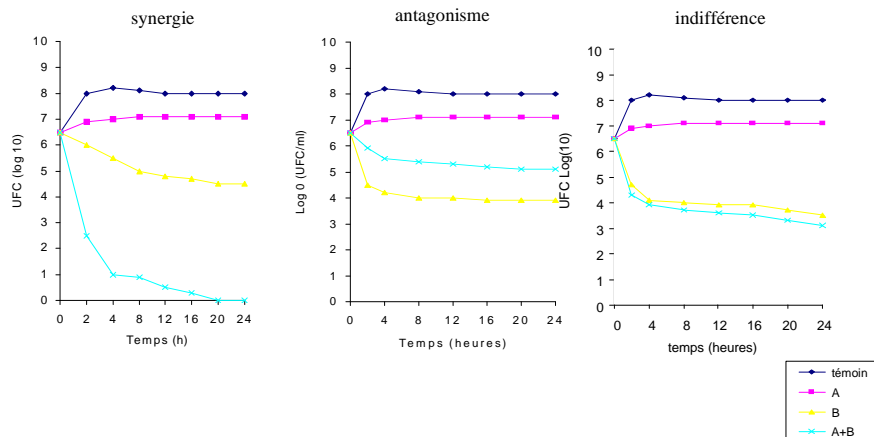
Antibiotiques "dose -dépendants"

AMINOSIDES (Gentamicine...)
FLUOROQUINOLONES dernière génération / Gram -
FLUMEQUINE / Colibacilles, Salmonelles
AMOXICILLINE, COLISTINE / Colibacilles

Une association est dite synergique quand le pourcentage de survivants est inférieur à celui obtenu avec l'antibiotique le plus actif. Cette différence étant considérée comme significative seulement lorsqu'un écart de 2 log est présent entre les deux valeurs.

A
ALE

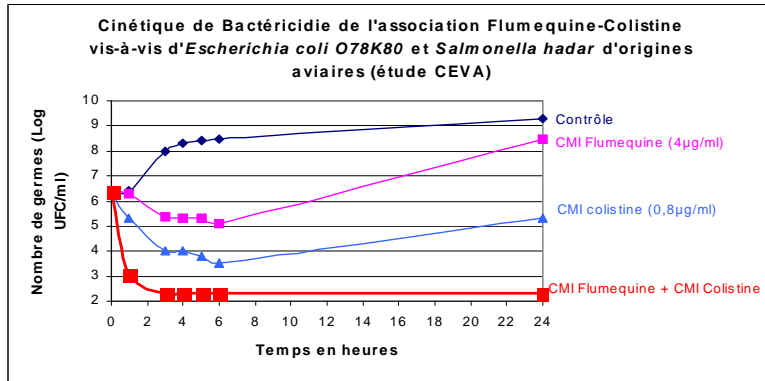
Exemples d'associations



Synergie

différence > 2 logarithmes (10² bactéries/ml) = association 100 fois plus bactéricide que l'antibiotique le plus actif

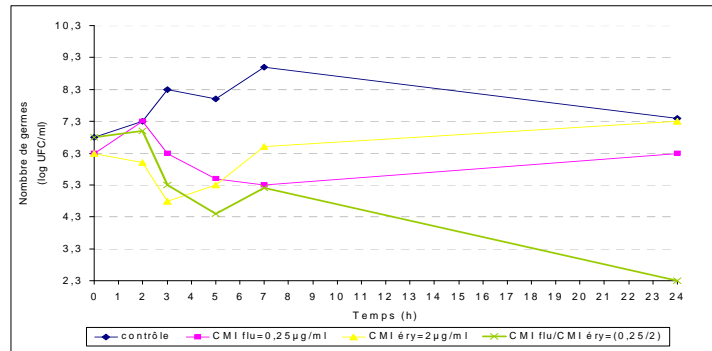
Exemples d'associations



1 antibiotique / 1 bactérie: synergie

Exemples d'associations

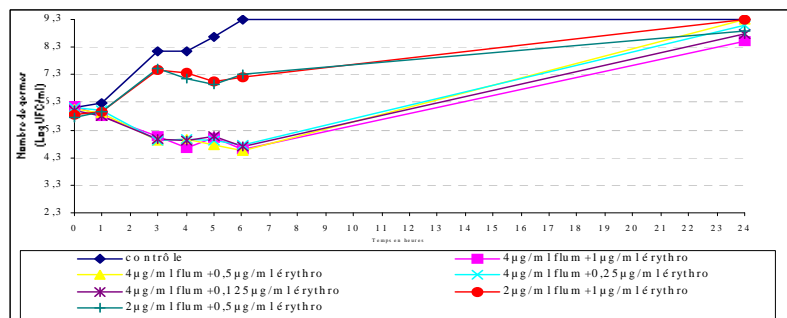
Cinétique de bactéricidie de la fluméquine et de l'érythromycine associées vis-à-vis de *Pasteurella multocida* d'origine aviaire :



1 antibiotique / 1 bactérie: synergie

Exemples d'associations

Cinétique de bactéricidie de l'association fluméquine/érythromycine vis-à-vis d'*Escherichia coli* (Expérimentation 1).



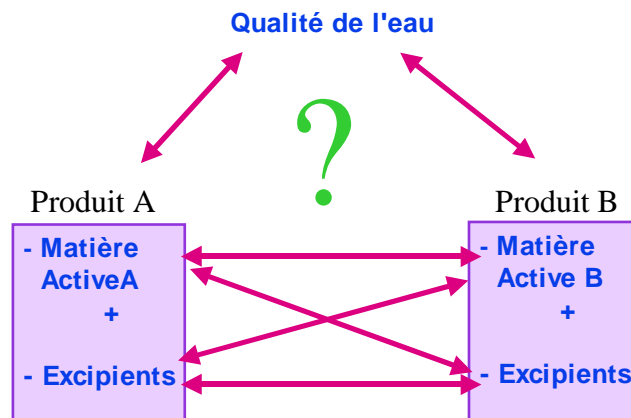
1 antibiotique / 1 bactérie: indifférence

Limites des associations synergiques

Bien souvent, l'utilisation des associations se fait empiriquement et le bien fondé de telles associations est rarement prouvé par des études *in vitro* démontrant l'effet synergique ou tout au moins additif entre les antibiotiques utilisés. De même, rares sont les essais cliniques mettant en évidence l'efficacité de ces associations. Il est donc important dans ce cadre, d'en connaître les limites.

- Connaissance essentielle : résorption des antibiotiques, diffusion des antibiotiques et taux sanguins et tissulaires des molécules
- risque d'effets antagonistes: ne pas jouer aux « apprentis sorciers » (règles de Jawetz)
- effet d'une association d'antibiotiques/ un germe particulier: notion de couple
 - Synergie *in vitro* ne correspond pas toujours à une efficacité *in vivo*
 - Inversement: antagonismes *in vitro* ne se retrouvent pas *in vivo*
- risque accru d'effets toxiques ou allergisants (reins)
- Coût de traitement à évaluer
- Incompatibilités physiques et/ou chimiques de 2 « produits » contenant les anti infectieux

A
ALE

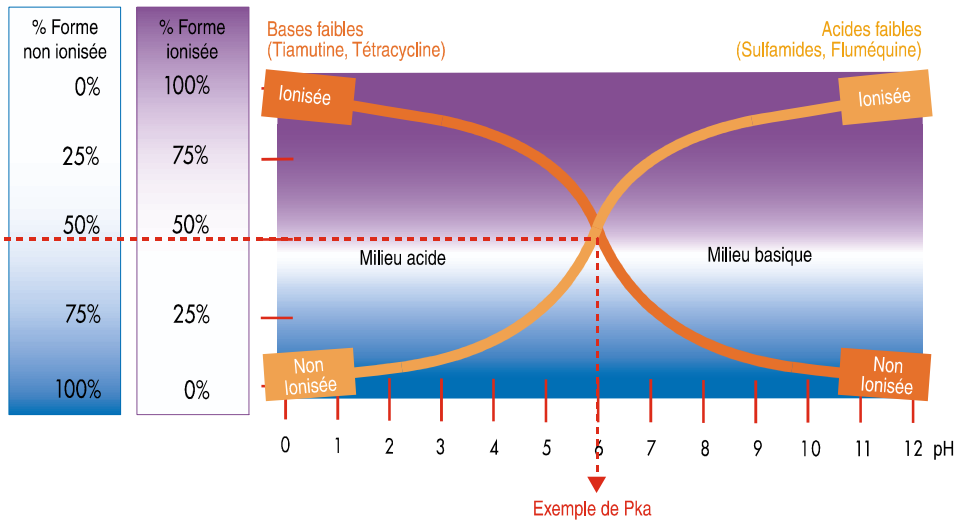


Solubilité et stabilité lors de mélange ??

L'EAU DE BOISSON EN ELEVAGE INDUSTRIEL

L'eau, vecteur thérapeutique

**Caractère acido-basique des molécules
(Formes chimiques prédominantes en fonction du pH du milieu)**



Exemple : Une molécule à caractère acide (Sulfamide...) se solubilise mieux dans une eau basique car elle y est sous forme ionisée.

**Natures et propriétés des médicaments
(principe actif)**

Classification en fonction de leur caractère acido-basique

ACIDES FAIBLES	BASES FAIBLES
Préférence pour les eaux basiques (pH>7)	Préférence pour les eaux acides (pH<7)
Amoxicilline	Colistine (base forte)
Ampicilline	Erythromycine
Quinolones	Néomycine
Fluméquine	Spiramycine
Sulfamides	Triméthoprime
Vitamine C	Oxytétracycline
Aspirine	Tiamuline

Les molécules en solution interagissent avec le milieu dans lequel elles sont

Recommandations lors d'associations de produits :

- Respecter les lois de Jawetz
- Ne pas mélanger plus de 2 produits
- **Vérifier préalablement la solubilité des mélanges avec de petites quantités de produits**
- Eviter de mélanger 2 produits dont la solubilité est médiocre (aspirine, sulfadiméthoxine...)
- Eviter l'utilisation de solubilisants, et ne jamais mélanger 2 produits avec des solubilisants différents
- N'utiliser que des mélanges testés : Le tableau suivant indique la **solubilité** et la **stabilité chimique pendant 24 heures des molécules contenues dans les spécialités CEVA. Les mélanges sont testés pour une dureté de 22°TH et 3 niveaux de pH (5,5 – 6,5 - 7,5). Ces données ne sont pas extrapolables à d'autres spécialités.**
- Les lois de Jawetz indiquent le degré d'intérêt des associations d'antibiotiques. Au plan pratique, seules les associations synergiques ou indifférentes présentent un intérêt dans les tests de solubilité et stabilité. Par conséquent, les associations antagonistes n'ont pas été testées.

LE MELANGE DES SPECIALITES CEVA – D'après des études de solubilité et de stabilité

Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations généralement utilisées dans un bac de traitement.	FLUMISOL®	VETRIMOXIN®	ERYTHROVET®	COLIVET Solution®	DOXYVIT®	Interactions ionophores		
	fluméquine	amoxicilline	érythromycine	colistine	doxycycline	TIAMUTINE 12,5%* tiamuline	PRIMASOL® sulfadiazine + triméthoprime	AMIDURENE® sulfadiméthoxine
FLUMISOL® 1,2 ml/litre		☹	☹	😊	⚠	☹		😊
VETRIMOXIN® 2 g/litre	☹			😊			😊	☹
ERYTHROVET® 1 g/litre	☹			😊	😊			😊
COLIVET Solution® 0,5 ml/litre	😊	😊	😊		😊	😊	😊	☹
DOXYVIT® 2 g/litre	⚠		😊	😊		😊	☹	⚠
Interactions ionophores TIAMUTINE 12,5%* 1 ml/litre	☹			😊	😊		😊	☹
PRIMASOL® 2,5 ml/litre		😊		😊	☹	😊		
AMIDURENE® 2 ml/litre	😊	☹	😊	☹	⚠	☹		

BONNES PRATIQUES DE REALISATION D'UN MELANGE

- N'utiliser que des mélanges testés.
- Vérifier préalablement la solubilité des mélanges avec de petites quantités de produits.
- Ne pas mélanger plus de 2 produits.
- Eviter de mélanger 2 produits dont la solubilité est médiocre.
- Eviter l'utilisation de solubilisants, et ne jamais mélanger 2 produits avec des solubilisants différents.
- Faire dissoudre le produit le plus soluble en premier et éventuellement diluer séparément les 2 produits.
- Suivre les recommandations de notre laboratoire.



Pas de problème de solubilité et de stabilité



Mélange déconseillé en eau basique (pH ≥ 7,5) : dégradation possible



Mélange déconseillé en eau acide (pH ≤ 5,5) : précipitation possible



Mélange déconseillé : précipitation possible

Décaler dans le temps la distribution des antibiotiques

* Incompatible avec monensin, narasin, salinomycine.

Ces mélanges ont été testés, pendant 24 heures, dans les conditions suivantes :
> eaux de pH 5,5 - 6,5 - 7,5
> dureté 22° TH
Ces données ne sont pas extrapolables à d'autres spécialités.

LA CELLULITE CHEZ LE POULET À GRILLER

Dre Martine Boulianne, DMV, PhD, Dip ACPV
Professeure agrégée, Titulaire de la Chaire en Recherche Avicole
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal
St-Hyacinthe, Québec, Canada

Introduction

L'an dernier, la consommation de poulets à griller a atteint des sommets encore jamais inégalés au Canada : 30 kg *per capita*. La production de poulets au pays étant régie par un système de gestion de l'offre, l'augmentation de la production planifiée à l'échelle nationale est proportionnelle à l'augmentation de la consommation, un faible pourcentage du marché étant destiné à l'exportation. Naturellement, la présence de nos voisins américains influence fortement les types de poulets disponibles, le consommateur nord-américain prisant la viande blanche et donc un poulet avec un fort rendement en poitrine. Le poulet à griller canadien est donc abattu à l'âge de 38 jours à 1,7-1,9 kg et 2,1-2,3 kg pour les femelles et les mâles respectivement. Ces oiseaux sont élevés à l'intérieur, dans des bâtiments fermés à deux ou trois étages, chauffés, isolés et bien ventilés, sur des surfaces de ciment (au premier étage), ou de bois (deuxième et troisième étages), recouvertes de copeaux de bois ou de paille coupée.

Lorsque l'on discute avec les différents intervenants de l'industrie avicole canadienne, producteurs, techniciens, nutritionnistes, médecins vétérinaires, tous s'entendent pour dire que la cellulite chez le poulet à griller est la plus importante cause de pertes économiques au Canada. Affectant près de 1% de tous les lots de poulets à griller abattus, certains troupeaux subissent jusqu'à 6 et même 8% de saisies pour cette cause. On peut obtenir ces données très précises à l'abattage, chaque lot abattu étant inspecté par un inspecteur qui mettra de côté les carcasses présentant des lésions. Ces lésions seront par la suite diagnostiquées et colligées par un médecin vétérinaire de l'Agence Canadienne d'inspection des aliments.

Qu'est-ce que la cellulite?

La cellulite chez les poulets à griller n'est détectée qu'à l'abattage, une fois la carcasse plumée et échaudée. L'inspecteur remarquera d'abord une zone de peau jaunie et épaissie sur la partie inférieure de l'abdomen. La lésion est presque toujours unique et se situe dans la région péricloacale. Les oiseaux abattus en Europe présentent le plus souvent des lésions sur le dos et la face latérale des cuisses. Un examen plus poussé révélera la présence d'une plaque de pus sous la peau, de dimension variant entre 3 et 10 cm de diamètre dans la majorité des cas. De plus, les muscles sous-jacents présenteront souvent de petites hémorragies. Le degré d'inflammation et la taille de la lésion varient considérablement d'une carcasse à l'autre, certaines présentant des lésions chroniques, localisées et bien circonscrites de la taille

d'un pois, et d'autres, une zone d'inflammation séropurulente étendue couvrant la majeure partie des muscles de l'abdomen et de la poitrine.

La bactérie *Escherichia coli* est celle la plus fréquemment isolée de ces lésions. On retrouve une forte diversité génétique parmi les diverses souches isolées des lésions. A l'abattage, lorsque les lésions de cellulite sont de petite taille et bien définies, la carcasse sera parée, quoique fort généreusement. En effet, une étude a démontré la présence de la bactérie causale jusqu'à une distance de 2 cm de la plaque purulente. Ceci explique probablement ce pourquoi la carcasse sera la plupart du temps tout simplement rejetée. En effet, à cause de la présence d'*Escherichia coli*, les risques de contamination de la carcasse sont considérés comme une menace pour la santé publique par l'Agence Canadienne d'inspection des aliments, d'où la saisie de la carcasse entière lors de présence de lésions de taille importante.

Épidémiologie et pertes économiques engendrées par la cellulite

Cette affection a été rapportée pour la première fois en Grande-Bretagne en 1984. En France cette infection semble être mieux connue sous le nom de dermite nécrotique. C'est en 1986 que le terme cellulite est apparu pour la première fois dans les rapports de saisies des carcasses de l'Agence canadienne d'inspection des aliments. Cette année-là, la cellulite figurait au 10^e rang des causes de condamnation enregistrées au Canada, 160 405 poulets (0,048% des poulets à griller abattus) étant saisis pour cette raison. Dix ans plus tard, 2,6 millions de poulets atteints de cellulite (0,56% de tous les abattages) ont échoué l'inspection canadienne, soit une fréquence 12 fois supérieure. La cellulite est aujourd'hui la première cause de condamnation de poulets à griller au Canada et, par conséquent, est responsable de lourdes pertes économiques. Cette tendance à la hausse a aussi été observée par nos voisins américains. Pourquoi la fréquence de la cellulite a-t-elle fait un bond si prodigieux au cours de la dernière décennie? Pour répondre à cette question, il est d'abord nécessaire de comprendre comment la cellulite apparaît.

Pathogénie de la cellulite

La plupart des études ont démontré que la cellulite apparaît à la suite d'une égratignure de la peau qui s'infecte. Il s'agit d'une infection survenant tardivement dans la vie du poulet et qui n'a rien à voir avec une mauvaise cicatrisation du nombril des poussins. Le poulet à griller moderne nord-américain se distingue par un abdomen très proéminent, et donc sujet aux égratignures. En outre, la génétique moderne a introduit sur le marché nord-américain un poulet à emplumement lent et tardif, caractère qui réduit la protection de l'oiseau contre les dommages à la peau. Ceci explique pourquoi les poulets mâles sont deux fois plus à risque de développer la cellulite que les femelles, et ce sans égard au poids corporel de l'oiseau. Par exemple, un poulet mâle de 1,9 kg est tout aussi à risque qu'un mâle de 2,2 kg. D'autres facteurs de risque d'égratignures, conjugués à la contamination bactérienne à l'intérieur du poulailler favorisant l'infection de ces blessures, peuvent augmenter les risques de cellulite dans un troupeau d'oiseaux. La recherche a déjà permis d'identifier divers facteurs de risque

associés à la cellulite et de mesurer le temps nécessaire au développement des lésions.

Facteurs de risque associés à la cellulite

A. Emplumement

Lors d'une étude observationnelle prospective, l'emplumement à 28 jours était le facteur de risque le plus significatif associé à la cellulite. En effet, tous les troupeaux chez lesquels une forte prévalence de cellulite a été enregistrée présentaient un faible degré d'emplumement, c'est-à-dire du duvet dans les régions de la tête et du cou, et des épaules dénudées. Il est probable, qu'un faible emplumement accroît la vulnérabilité de la peau aux agressions mécaniques, facilitant l'invasion bactérienne des tissus sous-cutanés. Dans cette étude, les poulets à griller gardés à une température plus élevée entre les jours 17 et 35 ont été plus sujets à la cellulite. Ce facteur de risque est possiblement relié à l'emplumement, considérant qu'à une température plus élevée, le plumage se développe généralement moins rapidement et que, par conséquent, la peau demeure sans protection plus longtemps. Par contre, on doit se rappeler qu'une température trop basse augmente les risques d'ascite. Il est donc important de faire preuve de grande prudence en ce qui concerne les températures excessivement basses. La température à l'intérieur du poulailler ne devrait jamais chuter sous 21°C.

B. Densité

Une densité de population élevée dans les parquets et autour des mangeoires et abreuvoirs est un autre facteur de risque significatif. Il est possible que plus les animaux soient serrés, plus grands soient les risques d'égratignures et de bris de plumes. Ceci expliquerait pourquoi la prévalence de la cellulite serait plus élevée dans les troupeaux nerveux, considérant que les brusques mouvements de masse à l'intérieur d'un parquet entraînent des dommages à la peau et aux plumes. Il est donc important de garder les oiseaux calmes dans un environnement confortable.

C. Contamination bactérienne du milieu

L'encroûtement et un taux d'humidité élevé de la litière au cours des dernières semaines de la période de croissance sont aussi associés à une hausse de la prévalence de la cellulite. Les risques de développement de l'affection ont été moindres dans les poulaillers munis d'abreuvoirs à pipettes et dans ceux où l'eau était traitée à l'aide de chlore. Parce que la litière humide est un milieu idéal pour la prolifération bactérienne, l'application de toute mesure visant à réduire la contamination bactérienne du milieu devrait avoir des répercussions positives sur l'incidence de la cellulite. Ceci explique également la plus faible prévalence de cellulite enregistrée dans les poulaillers désinfectés avant l'arrivée des poussins et dans ceux où le cycle de production comporte une période de vide sanitaire de plus de 15 jours.

D. La souche d'*Escherichia coli* en cause

Parmi les sérotypes de *E. coli* isolés des lésions de cellulite, le O78 domine, suivi du O2. De nombreux autres sérotypes ont aussi été identifiés, mais environ le tiers n'est pas typable. Les biotypes et les profils d'antibiorésistance montrent aussi une grande diversité, bref des résultats similaires à ceux rapportés dans les cas de colibacillose. Cependant, lors de diverses études portant sur la cellulite, il a été noté que certaines souches étaient plus virulentes que d'autres et causaient des lésions plus sévères qui perduraient comparativement à celles occasionnées par d'autres souches d'*Escherichia coli*. Parmi les facteurs de virulence étudiés, mentionnons la capacité à adhérer et à s'attacher au tissu sous-cutané.

Temps nécessaire au développement de la lésion de cellulite

Diverses infections expérimentales par injection, abrasion ou badigeonnage avec la bactérie *Escherichia coli* ont pu reproduire la cellulite. Les lésions se forment très rapidement après l'infection. La température corporelle du poulet se maintient autour de 40-41°C, ce qui non seulement offre des conditions idéales pour la multiplication des bactéries, mais en plus accroît de beaucoup la vitesse des réponses inflammatoires. C'est pourquoi nous avons pu, à l'aide de techniques de thermographie médicale, observer des signes d'inflammation un jour seulement après l'infection expérimentale, un pic inflammatoire deux jours après l'infection et une diminution progressive de la taille de la lésion et de la réaction inflammatoire par la suite. Parce que très peu de lésions sous-cutanées étaient macroscopiquement apparentes six jours après l'infection expérimentale, nous croyons que la plupart des égratignures subies au cours des semaines précédant l'abattage ont le temps de cicatriser et de disparaître.

Conclusions

L'augmentation de l'incidence de la cellulite observée au cours des dernières années est probablement due à divers facteurs. Il y a d'abord l'utilisation plus fréquente de poulets à emplumement lent et à rendement élevé caractérisés par un abdomen proéminent, jumelée à l'élevage à haute densité. Malheureusement, l'augmentation de la densité d'oiseaux n'est pas toujours accompagnée de l'ajout des équipements nécessaires, tels que mangeoires et abreuvoirs supplémentaires. Les mesures préventives doivent par conséquent être orientées vers les divers facteurs de risque associés à la cellulite, et sont particulièrement importantes au cours de la dernière semaine de la période de croissance. Le pire des scénarios est que les poulets manquent de nourriture dans les quelques jours précédant l'expédition des oiseaux à l'abattoir.

Malheureusement, il n'existe aucun ingrédient magique pour réduire la cellulite dans un troupeau. Une compagnie canadienne, dans les cas extrêmes, a utilisé l'amputation des phalanges chez les poussins d'un jour à l'aide d'un appareil micro-ondes de même type que celui utilisé pour les dindonneaux. Cette mesure nécessite de la main d'œuvre supplémentaire et n'était économiquement justifiable que lorsque le

taux de cellulite à l'abattoir dépassait les 2,8%. Avant d'en arriver à cette solution, d'autres alternatives peuvent être envisagées...

La cellulite est une maladie multifactorielle qui doit être combattue sur plusieurs fronts à la fois. Il ne nous est pas possible de changer la morphologie du poulet moderne, mais en améliorant le taux d'emplumement par une bonne gestion de la température dans les poulaillers et en adoptant des mesures pour diminuer les risques d'égratignures et la charge bactériologique du milieu de production, nous devrions observer une diminution de l'incidence de la cellulite.

UTILISATION DE LA SEROLOGIE POUR LE SUIVI EPIDEMIOLOGIQUE DES TROUPEAUX DE VOLAILLES.

Dr. Yannick Gardin, Soleil s.a.r.l.- Rippa 2002

INTRODUCTION :

L'infection des troupeaux de volailles par des micro-organismes (virus, bactéries, etc.) peut être à l'origine de maladies accompagnées de conséquences économiques variables. Pour ce faire, il faut que les micro-organismes concernés soient pourvus d'une capacité à induire le mal (on parle de pouvoir pathogène) et que les troupeaux de volailles y soient sensibles.

En d'autres termes, il n'y a maladie que s'il y a infection, mais le fait qu'il y ait infection n'implique pas forcément qu'il y ait maladie !

Connaître les micro-organismes qui infectent plus ou moins régulièrement les troupeaux permet de sélectionner les mesures spécifiques de prévention de l'infection ou de la maladie, et donc susceptibles de réduire les pertes économiques, si il y en a.

Dans un assez grand nombre de cas, la sérologie permet de dresser la liste des micro-organismes (on parle de « contaminants ») qui ont infecté les troupeaux testés. Il appartiendra ensuite à l'éleveur d'évaluer l'importance des pertes économiques associées et de décider de l'opportunité de la mise en place de mesures préventives ou curatives adaptées.

A. EPIDEMIOLOGIE ET SEROLOGIE :

« L'épidémiologie est la science qui étudie la fréquence et la répartition des maladies, dans le temps et dans l'espace...au sein de populations » (M. Goldberg).

La sérologie est la science qui s'intéresse (entre autres) à la mise en évidence des anticorps qu'un organisme vivant supérieur fabrique suite à une stimulation de son système immunitaire par un antigène, qui, dans le cadre qui nous intéresse, est un micro-organisme (virus, bactérie ou parasite).

Ces anticorps sont des protéines extrêmement spécifiques de l'antigène qui en a induit la synthèse, à tel point que leur mise en évidence chez un individu permet d'affirmer, à de rares exceptions près, qu'il a été infecté par tel ou tel micro-organisme

Utiliser la sérologie dans un but épidémiologique consiste donc à rechercher, au sein d'un échantillon d'oiseaux supposé représentatif du troupeau, la présence d'anticorps dirigés contre un certain nombre de micro-organismes considérés comme potentiellement pathogènes, pour finalement établir la liste de ceux qui ont infecté le troupeau.

Il est important de considérer que :

- Les informations recueillies seront d'autant mieux valorisées que la démarche sera conçue et appliquée globalement, au sein d'une organisation ou mieux, au niveau d'une région, au travers d'un réseau d'élevages choisis en fonction de critères géographiques ou autres. Dans ce sens, les conclusions tirées seront à priori extrapolables aux élevages environnants, conduits de façon similaire
- Les conséquences tirées de ces études, seront surtout profitables aux bandes suivantes (et aux élevages voisins) et bien peu aux troupeaux testés dans la mesure où l'information recueillie sera relative au passé. Le but n'est pas d'établir un diagnostic relatif à des troubles antérieurs, mais bien de connaître la situation épidémiologique afin d'améliorer les performances technico-économiques et la rentabilité future des élevages.
- Le tableau de situation que l'on aura dressé n'a rien de figé et la démarche n'aura de vraie valeur que si elle s'inscrit dans la durée, tout en veillant à la maintenir souple et économiquement acceptable.

On pourrait ainsi parler avec justesse **d'épidémiologie - surveillance sérologique** pour qualifier la méthode, et souligner son caractère nécessairement évolutif, et c'est cette appellation ou celle de **séro – épidémiologie**, que, pour des raisons de simplicité, nous retiendrons dans cet exposé.

B. L'ANALYSE SEROLOGIQUE :

La séro – épidémiologie repose en tout premier lieu sur le recours à un outil : l'analyse sérologique qu'il convient de connaître un peu afin de mieux l'exploiter.

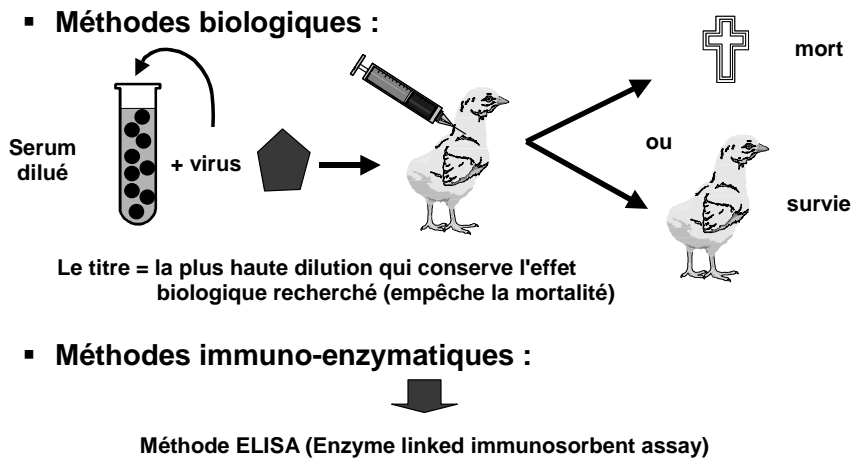
B 1. LES TECHNIQUES D'ANALYSE SEROLOGIQUE :

Les anticorps ont la capacité de pouvoir se lier étroitement à l'antigène qui leur a donné naissance. C'est cette propriété qui est mise à profit dans les différentes techniques de détection appelées techniques ou tests sérologiques.

On peut globalement les classer en deux groupes :

- **Les techniques dites « biologiques »** : la formation du complexe antigène – anticorps supprime une propriété biologique de l'antigène et ceci sert de révélateur à la présence d'anticorps dans le sérum.
Exemple : réaction de séro-neutralisation (SN), réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), etc.
- **Les techniques dites enzymatiques** dans lesquelles l'attachement des anticorps à l'antigène est révélé par l'action d'enzymes qui hydrolysent un substrat (le chromogène) en modifiant sa couleur : ce sont les techniques que l'on regroupe sous le terme général d'ELISA (voir encadré).

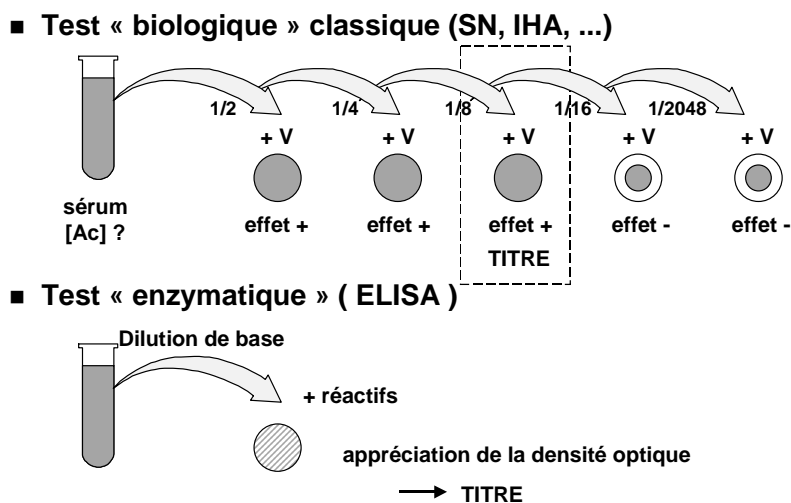
LES PRINCIPALES TECHNIQUES SEROLOGIQUES



Il est important de réaliser que, dans les techniques classiques, on apprécie la **quantité d'anticorps** dans le sérum en diluant celui-ci. Par convention, le **titre** est la plus haute dilution qui conserve l'effet recherché (dans le cas figuré ci-dessus, les anticorps neutralisent le virus et l'empêchent d'induire la mortalité chez le poussin qui en reçoit le mélange en injection).

Dans les techniques immuno-enzymatiques, le sérum n'est dilué qu'une seule fois, et c'est la quantité d'anticorps présents dans cette dilution qui provoque une réaction colorimétrique d'autant plus intense que cette quantité est importante. Fondamentalement, le test est basé sur une réaction chimique de type enzymatique, et il n'y a plus linéarité parfaite entre la quantité d'anticorps présente dans le sérum et la mesure. Il sera important d'en tenir compte dans l'interprétation des résultats.

L'ANALYSE SEROLOGIQUE



L'ELISA est aujourd'hui, et de très loin, et essentiellement pour des raisons économiques et pratiques justifiées, la technique la plus employée en aviculture. C'est aussi celle que nous préconisons pour la séro – épidémiologie telle qu'elle est présentée dans cet article (ce qui ne veut pas dire qu'une autre technique ne pourrait pas convenir).

B 2. LES QUALITES D'UN TEST SEROLOGIQUE :

Un test sérologique permet de mettre en évidence la présence d'anticorps dans un liquide physiologique. C'est une technique qui est, comme toute autre technique, imparfaite.

Les principaux critères d'appréciation de la qualité d'un test sérologique sont les suivants :

- La **spécificité** qui caractérise sa capacité à ne donner une réponse positive que si les anticorps recherchés sont effectivement présents. Le risque d'un test peu spécifique est de fournir des résultats incluant des « faux-positifs ».
- La **sensibilité** est fondamentalement la capacité d'un test à différencier deux échantillons renfermant des quantités d'anticorps différents. C'est une qualité très importante si l'on désire effectuer une évaluation précise du niveau d'anticorps présents. On peut lui reconnaître un aspect particulier qui est la détectabilité, c'est à dire la capacité à détecter de faibles taux d'anticorps (il s'agit en fait de la sensibilité dans les basses concentrations en anticorps). Un test peu sensible (ayant une détectabilité médiocre) risque de fournir des résultats incluant des « faux – négatifs »).
- La **consistance**, est la capacité d'un test à toujours fournir la même réponse, d'un jour à l'autre, d'un laboratoire à un autre, d'un technicien à un autre, etc. La consistance regroupe les notions de répétabilité, répliquabilité, etc.

Les propriétés d'un test varient en fonction de sa nature, et il y a souvent opposition entre spécificité et sensibilité, mais ces propriétés peuvent être mises à profit, voire accentuées par le fabricant, en fonction du domaine d'application et / ou du but recherché.

Par exemple, le test d'agglutination rapide sur lame utilisé pour détecter les oiseaux porteurs d'anticorps anti-mycoplasme, est un test très sensible (rapidité de détection), mais peu spécifique, ce qui est ennuyeux en routine (fréquence des faux positifs) mais précieux car la raison d'être du test est d'informer précocement le producteur d'une possible contamination, en acceptant le risque de crier au loup pour rien, car le vrai danger serait de laisser passer un troupeau positif !

La spécificité est souvent une qualité mise en avant par les « puristes » mais au détriment de l'intérêt pratique du test et en oubliant qu'en aviculture, l'analyse sérologique est appliquée à des troupeaux et non à des individus, et qu'elle s'insère dans un raisonnement diagnostique ou épidémiologique global. Nul ne contredit l'importance de la spécificité d'un test utilisé dans le cadre du dépistage du SIDA chez l'homme, mais qu'importent quelques faux positifs dans le cadre d'une analyse visant à confirmer la prise vaccinale contre l'encéphalomyélite avant l'entrée en ponte ?

Dans le contexte d'une étude séro-épidémiologique, la sensibilité / détectabilité du test revêt une grande importance.

La consistance des résultats résulte du test lui-même mais aussi, voire surtout, du laboratoire qui le met en œuvre.

B 3. LES DEUX GRANDS TYPES D' ANALYSE SEROLOGIQUE :

La sérologie peut être **qualitative**, si elle se borne à affirmer la présence ou l'absence de tel type d'anticorps, ou bien **quantitative** si elle fournit une évaluation chiffrée de la concentration en un type donné d'anticorps.

En fonction du type de résultat que l'on désire obtenir, les qualités qui seront demandées au test sérologique seront différentes. La spécificité est importante pour une démarche sérologique qualitative car on veut savoir s'il y a eu contact ou pas. Pour une démarche de type quantitative, c'est la sensibilité qui est essentielle car on cherche alors à apprécier s'il y a eu augmentation significative de la quantité d'anticorps présents.

B 4. L'INTERPRETATION D'UN RESULTAT D' ANALYSE SEROLOGIQUE :

L'élevage avicole s'intéressant non pas à l'individu mais au troupeau, composé de plusieurs milliers d'animaux, l'analyse sérologique se réalise sur un échantillon d'une vingtaine de sujets et les notions de titre moyen, d'homogénéité et d'hétérogénéité, qui permettent de décrire une population, prennent toute leur importance, de même qu'apparaît le besoin de représentation graphique (histogrammes, etc.).

En règle générale, le résultat d'une analyse sérologique en aviculture s'apprécie pour l'essentiel à l'aide des critères suivants :

- le titre moyen (titre arithmétique ou géométrique),
- le coefficient de variation,

Dans le contexte d'un suivi séro – épidémiologique, 3 autres éléments se révèlent très utiles ; ce sont :

- la proportion de sujets positifs,
- le titre maximal relevé,
- l'histogramme de répartition des titres.

1) Le titre arithmétique moyen (TAM) :

Le titre moyen (TAM) tel qu'indiqué, est, par défaut, le résultat d'un calcul arithmétique (addition des valeurs des titres individuels, puis division par le nombre d'échantillons).

Le titre moyen arithmétique donne une appréciation du niveau moyen d'immunité qui est "représentative", tant que l'on s'adresse à des populations homogènes.

2) Le titre géométrique moyen (TGM) :

La moyenne géométrique est calculée en passant par les valeurs logarithmiques des titres. Les logarithmes décimaux ($\log 10$) de chacun des titres individuels sont calculés, puis additionnés. Le total est ensuite divisé par le nombre d'échantillons, pour obtenir la valeur logarithmique moyenne (=LM), puis l'on repasse à la valeur arithmétique correspondante (égale à 10^{LM}).

La moyenne géométrique donne une appréciation du niveau moyen d'immunité qui est plus "représentative" que la moyenne arithmétique lorsque l'on s'adresse à des populations hétérogènes.

Les valeurs de titre moyen et de moyenne géométrique sont proches l'une de l'autre dans le cas de populations homogènes, et différentes dans le cas de populations hétérogènes.

3) Le coefficient de variation (CV) :

Le coefficient de variation (ou "CV") est calculé en divisant l'écart type de la population (de titres ELISA individuels) concernée, par la moyenne, puis en multipliant par 100 la valeur obtenue pour exprimer un pourcentage.

Le coefficient de variation a pour ambition de fournir une évaluation chiffrée de l'homogénéité (ou de l'hétérogénéité) d'une population. Plus il est faible, plus la population est homogène.

Il est cependant important de considérer qu'il est, du fait de son mode de calcul, lié à la moyenne, et qu'ainsi, "naturellement", plus la moyenne est élevée, plus le CV est faible. La comparaison des homogénéités de deux populations, selon les valeurs de leurs CV, ne devrait donc théoriquement se faire que si les titres moyens des deux populations sont semblables.

Par ailleurs, le kit ELISA utilisé, et (en particulier sa sensibilité) a un impact essentiel sur la valeur du CV ; plus le test est sensible, plus le CV sera élevé. A l'extrême, un kit de qualité médiocre, (qui sature rapidement par exemple) fournira des valeurs de CV plus faibles qu'un kit plus performant, et une image de la population testée moins précise. La valeur du CV doit donc également être appréciée en fonction du kit utilisé.

Après un passage de virus sauvage (par définition peu atténué mais il existe des exceptions) ou après injection d'un vaccin inactivé, le CV est généralement plus faible qu'après une vaccination à virus vivant atténué.

4) La proportion de sujets positifs :

Même si le titre moyen reste très faible, la présence d'un ou plusieurs sujets positifs permet de conclure à l'infection. En effet, le laps de temps nécessaire à la séroconversion varie d'un animal à l'autre, et, par ailleurs, les faibles taux d'anticorps correspondants au début de celle-ci sont mal détectés.

Le risque de faux-positif écarté (en général par la constatation d'au moins deux positifs au sein de l'échantillon prélevé) la présence de quelques positifs traduit une infection récente. Un second prélèvement qui serait réalisé quelques jours plus tard confirmerait dans tous les cas cette conclusion.

5) Le titre maximal :

La présence d'animaux ayant un titre en anticorps très élevé apporte une information comparable à la précédente, dans le cas de troupeaux vaccinés. En effet, des titres en anticorps nettement plus élevés que ceux habituellement observés (d'où l'intérêt d'avoir un référentiel de valeurs ou « baseline ») permet de conclure à l'infection.

6) L'histogramme de répartition des titres :

Afin de donner une image globale aisément accessible des résultats de l'analyse, les titres ELISA obtenus sont figurés sur un histogramme. Les titres individuels sont ainsi répartis au sein de différents « groupes de titres » (numérotés de 0 ou 1 à environ 20) correspondant à des classes d'intervalles de valeurs de titres individuels. Les bornes de ces classes varient d'un fabricant de kit à un autre, mais aussi parfois, pour un même kit, d'un laboratoire à un autre. De ce fait, la comparaison des résultats, d'un laboratoire à un autre est peu facile.

En règle générale, le groupe figuré à gauche regroupe les valeurs négatives, et plus le groupe est situé à droite, plus les titres correspondants sont élevés.

La hauteur de la barre correspond au nombre de sérums présentant un titre compris dans l'intervalle de valeurs de titres correspondant.

Ainsi, un simple coup d'œil permet, au travers du « **profil sérologique** » ainsi obtenu, d'appréhender le niveau d'anticorps général du groupe (plus les barres sont déplacées vers la droite, et plus les titres sont élevés), son homogénéité, ainsi que la présence de sujets négatifs.

C. L'EPIDEMIO – SURVEILLANCE SEROLOGIQUE EN PRATIQUE :

La démarche mise en place repose donc sur le principe que si des anticorps spécifiques sont détectés, il est possible de conclure à l'infection.

En pratique, un certain nombre de points importants de discussion méritent d'être abordés au préalable afin d'éviter certains écueils et de mettre en place une méthodologie efficace et économique.

C 1. LES POINTS DE DISCUSSION IMPORTANTS :

1) La présence d'anticorps ayant une origine autre qu'infectieuse :

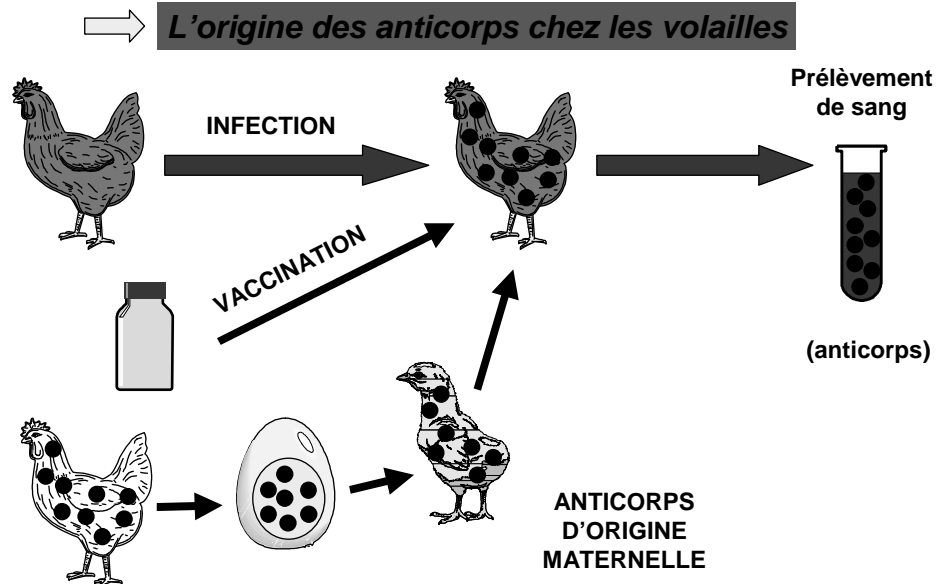
Il est important de savoir que des anticorps spécifiques autres que ceux induits par une infection naturelle peuvent se rencontrer chez les volailles : ils sont d'origine maternelle, soit d'origine vaccinale.

- **Les anticorps d'origine maternelle** sont transmis aux jeunes, poussins ou dindonneaux, par les reproductrices ayant été en contact soit de façon naturelle, soit au travers de vaccinations, avec l'agent infectieux considéré. Cette transmission se réalise via le jaune (vitellus) de l'œuf. En pratique, ces anticorps, dits passifs, s'éliminent au fur et à mesure que le jeune grandit, et n'interfèrent

pas avec la démarche séro – épidémiologique, car ils ne sont généralement plus détectables au-delà de 3 à 4 semaines.

- **Les anticorps d'origine post-vaccinale** : résultent d'une stimulation volontaire du système immunitaire des oiseaux par des vaccinations. L'interprétation des résultats obtenus à travers un plan de surveillance séro - épidémiologique devra impérativement en tenir compte. En pratique, il sera fondamental de bien connaître le type de réponse anticorps induite par les vaccins (et tous les vaccins présentent des particularités qui en font autant de cas particuliers), et d'y adapter les modalités de l'enquête, afin de proprement interpréter les résultats collectés. Il sera ainsi indispensable de différencier le cas d'animaux n'ayant reçu que des vaccins à virus vivants atténués, de celui d'animaux ayant subi l'injection de vaccins inactivés. En effet, les vaccins inactivés induisent des taux d'anticorps élevés et persistants dont il faudra impérativement tenir compte dans la démarche séro – épidémiologique et l'interprétation des résultats.

SERO - EPIDEMIOLOGIE



2) La notion d'anticorps locaux et d'anticorps circulants :

En aviculture, dans la très grande majorité des cas, les analyses sérologiques sont réalisées à partir de prélèvements de sang, c'est à dire que la présence d'anticorps est recherchée dans le sérum (d'où le terme de séro-logie), et les anticorps ainsi détecté sont qualifiés de « circulants » ou « sériques ». Il est important de savoir que l'image qu'on en retire peut être incorrecte, dans la mesure où des anticorps, et en particulier des anticorps induits par des vaccins vivants atténués (c'est à dire par des virus peu invasifs, c'est à dire peu stimulants) peuvent être présents dans d'autres liquides de l'organisme de l'oiseau, tels que les larmes ou les sécrétions trachéales (anticorps dits « locaux »), sans avoir initié de réponse « générale ». En d'autres termes, un examen sérologique classique donne souvent une image sous-estimée de l'immunité (de la protection) d'origine vaccinale

Dans le cadre du suivi épidémiologique des troupeaux de volailles tel qu'il nous intéresse, les anticorps recherchés sont d'origine infectieuse, c'est à dire qu'ils ont été induits par des virus plus agressifs donc plus immunogènes, et de ce fait, si cette infection a eu lieu, il sera toujours possible d'en détecter des traces dans le sérum.

3) L'importance de l'intervalle de temps infection – détection :

Le problème du temps de latence...

Suite à une infection, les anticorps spécifiques n'apparaissent dans la circulation sanguine qu'après un temps de latence variable en fonction de divers facteurs dont le principal est la détectabilité du test utilisé.

En règle générale, on peut considérer qu'une infection est détectable par ELISA, sur un échantillon consistant de sujets, environ 10 jours plus tard. Il reste alors cependant possible que certains sujets testés soient encore négatifs, mais le profil relevé est en général suffisamment évocateur pour conclure.

Du fait de ce temps de latence, une étude séro - épidémiologique fournira plutôt un résultat par défaut que par excès sur l'état d'infection des cheptels.

Le problème de la persistance...

A l'issue du temps de latence, le niveau des anticorps produits s'élève rapidement pour atteindre soit un pic, soit un plateau, puis finalement subir une phase de décroissance. Globalement, la persistance des anticorps produits, c'est à dire le laps de temps durant lequel ils peuvent être détectés varie essentiellement en fonction de la nature de l'antigène qui leur a donné naissance. C'est ainsi que des anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Gumboro présenteront une persistance (plusieurs mois) nettement supérieure à celle des anticorps induits par les pneumovirus (quelques semaines).

En pratique, le problème de la persistance, et donc du risque de réaliser un prélèvement trop tardif, ne se posera vraiment que pour les sujets à vie longue tels que les poules pondeuses (reproductrices ou productrices d'œufs de consommation) ou les dindons de chair et reproducteurs.

4) Le niveau des anticorps :

Un grand nombre de facteurs interviennent pour expliquer le niveau des anticorps observé. En règle générale, plus la souche virale qui infecte les poulets est « agressive », plus les taux d'anticorps induits sont élevés. Ainsi, les taux d'anticorps induits par les vaccins sont-ils habituellement plus faibles que ceux induits par une infection sauvage.

Certains considèrent même que le niveau des titres obtenus vis à vis de la Maladie de Gumboro ou des Réoviroses, permet de faire la distinction entre une infection sauvage par une souche peu pathogène, d'une infection sauvage par une souche très pathogènes (voir exemple plus loin).

Un autre facteur important à considérer pour expliquer les variations de titre observées, réside dans la parenté antigénique entre le microorganisme ayant infecté l'oiseau et l'antigène utilisé dans le test sérologique. Plus celle-ci est grande, plus le titre est élevé. Ainsi, des infections par des virus variants (en Bronchite infectieuse par exemple) pourront-elles conduire à des séroconversions de faible amplitude lorsque l'antigène utilisé dans le kit est un antigène classique de type Massachusetts. Le problème sera encore plus crucial pour la détection des anticorps anti-pneumovirus (voir plus loin).

Nombre de prélèvements nécessaires pourront varier.

Situation 1 : il n'y a pas eu vaccination.

La démarche est simple et s'applique à toutes les productions, quel que soit l'âge des sujets auquel on s'intéresse : si les animaux n'ont pas été vaccinés, on ne doit pas retrouver d'anticorps spécifique.

C'est le cas en France du poulet de chair de type standard vis-à-vis de la Maladie de Newcastle, de la SIGT, de la Laryngo-trachéite infectieuse, des réoviroses, ou de l'anémie infectieuse, etc.

Si des anticorps sont détectés, alors on peut conclure à l'infection.

Le moment idéal pour enquêter chez le poulet de chair est à l'abattage car l'intervalle de temps infection – détection est alors maximal (bien que parfois malgré tout insuffisant). Pour les animaux à vie longue, le prélèvement pourra se faire soit en une seule fois à l'abattoir (poulets labels, dindons de chair), soit en deux fois, à l'entrée et en fin de ponte pour les pondeuses reproductrices et d'œufs de consommation. Chez ces dernières, les premiers prélèvements pourront être réalisés plus avant afin d'en retirer un éventuel bénéfice secondaire immédiat : connaissances de l'état d'infection vis-à-vis du virus de l'Anémie infectieuse, de la Bronchite infectieuse, ou de la prise vaccinale vis-à-vis de l'encéphalomyélite infectieuse aviaire, qui peuvent avoir une influence décisive sur le programme de vaccination.

Le nombre de sujets à prélever est fonction de la précision que l'on attend de l'étude, sachant qu'une éventuelle imprécision au niveau du cas (du troupeau) pourra être compensée par une augmentation du nombre de troupeaux inclus dans l'enquête.

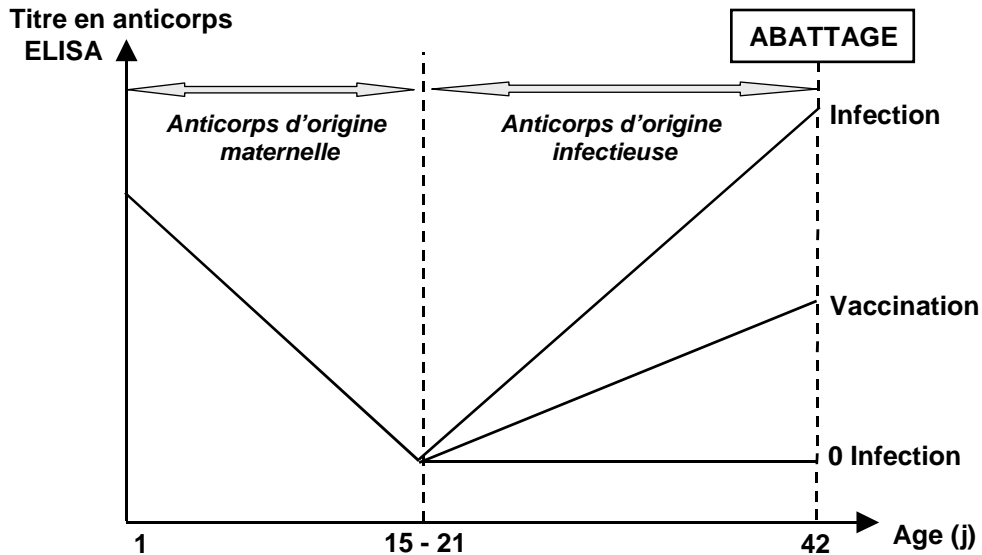
En pratique, la plupart des maladies qui justifient ce type d'approche globale sont des maladies très contagieuses, et, si un troupeau a été contaminé, la majorité des sujets ont été exposés et sont positifs (sauf si on intervient trop tôt ou trop tard). Un très faible nombre de prélèvements est généralement suffisant (de l'ordre de 5 par troupeau). Une augmentation du nombre de prélèvements (10 ou plus) pourra se justifier pour pallier un éventuel défaut de spécificité du test, ou réduire l'incidence d'autre(s) source(s) d'erreur éventuelle(s) telle qu'un intervalle de temps infection – détection inapproprié, ou supposé tel.

Situation 2 : il y a eu vaccination.

La présence de vaccinations, avec les anticorps qui en découlent, constitue une situation très fréquente qui rend l'interprétation des résultats de l'approche séro – épidémiologique plus complexe.

Dans de nombreux cas (mais non dans tous), les animaux vaccinés peuvent être secondairement infectés par le micro-organisme contre lequel ils ont été préalablement immunisés, sans que cela se traduise forcément par une expression clinique. En règle générale, le virus sauvage est responsable d'une stimulation plus intense des capacités immunitaires du troupeau et les profils sérologiques qui en découlent montrent un titre moyen et des titres individuels maximaux plus élevés ainsi qu'une homogénéité plus grande (donc un coefficient de variation plus faible).

EVOLUTIONS POSSIBLES DES NIVEAUX D'ANTICORPS CHEZ LE POULET DE CHAIR



Il nous faut en pratique distinguer deux cas selon la capacité des vaccins utilisés à induire une réponse en anticorps plus ou moins forte détectable.

Avec des vaccins « peu marquants » :

C'est par exemple le cas de poulets de chair vaccinés précocement contre la Bronchite infectieuse à l'aide de vaccins vivants de sérotype Massachusetts. De fait, les anticorps induits par la vaccination conservent une position anatomique locale et peuvent être détectés dans les larmes par exemple, mais ne seront retrouvés dans le sérum que chez quelques sujets, et à des taux très faibles.

Lors d'un contrôle sérologique en abattoir, en l'absence d'infection, les taux d'anticorps relevés sont :

- globalement bas (le titre moyen en anticorps ELISA est en général inférieur à 2000 – 3000),
- avec un titre maximum également bas,
- et un pourcentage de sujets positifs très faible.

Une revaccination (vers 14 – 18 jours d'âge) ne modifie pas vraiment ce tableau.

En cas d'infection, le titre moyen s'élève (au-dessus de 3000), des titres très élevés apparaissent de même que le pourcentage de sujets positifs s'élève fortement.

L'infection des poulets par un virus variant de la Bronchite infectieuse, ayant une relation antigénique faible avec l'antigène utilisé dans le test, pourra conduire à une

détection plus difficile de l'infection (titres plus faibles) voire à la non – détection. Le test ELISA reste malgré tout, en matière de Bronchite infectieuse, un test sérologique peu séro – spécifique et la considération de l'histogramme obtenu permettra le plus souvent de conclure du fait d'un pourcentage de sujets positifs élevé, et d'un profil est homogène, c'est à dire d'une image bien différente de celle qui aurait été observée sur des animaux uniquement vaccinés.

Le cas de la détection de la SIGT à l'aide d'un kit ELISA mérite à cette occasion d'être signalé. Il existe plusieurs sous-types du virus de la SIGT, et la réponse en anticorps produite par un sujet suite à un premier contact avec l'antigène (virus vaccinal ou sauvage – réponse immunitaire primaire) peut être non ou mal détectée, si le kit ELISA utilisé est élaboré à partir d'un antigène différent. A l'issue d'un second contact, la réponse immunitaire (alors secondaire) se révèle moins spécifique et sera plus facilement détectée par un kit hétérologue. Ainsi, l'infection de sujets vaccinés sera-elle plus facilement mise en évidence que l'infection de sujets non vaccinés pour lesquels il sera nécessaire d'utiliser un kit ELISA contenant un antigène du même sous – type que le virus responsable d l'infection. Dans ce cas, le risque de non détection s'en révèle accru.

Avec des vaccins « marquants » :

Dans le cas de sujets vaccinés avec des vaccins « marquants », la démonstration de l'infection est plus délicate, en particulier lorsque ces animaux ont fait l'objet d'injections de vaccins inactivés adjuvés. En effet, ces vaccins sont responsables d'une synthèse abondante d'anticorps qui persistent longtemps et à des niveaux relativement élevés.

Il est alors impossible de faire un séro-diagnostic épidémiologique en ne réalisant qu'un seul prélèvement, et il sera indispensable de collecter régulièrement des échantillons sanguins pour constituer une sérothèque que l'on analysera rétrospectivement. C'est la constatation d'une élévation des niveaux d'anticorps recherchés (séroconversion) entre deux séries de prélèvements qui permettra de conclure à une infection.

Dans cette situation qui est souvent celle des animaux à vie longue, vaccinés avec des vaccins inactivés à adjuvant huileux, les titres moyens, les titres maximaux et la répartition des titres seront les critères d'appréciation essentiels, et l'on sera dans le cas d'une sérologie quantitative nécessitant une évaluation aussi précise que possible des niveaux d'anticorps d'où l'importance :

- d'un kit présentant une bonne sensibilité,
- une bonne consistance,
- et d'un nombre suffisant de prélèvements (environ 20 échantillons par troupeau).

D. RESULTATS : EXEMPLES ET EXPLOITATION.

D 1. EXEMPLE D'APPLICATION :

Dans cet exemple, pris hors de France, 18 élevages d'une même intégration productrice de poulets de chair ont été prélevés à l'abattoir au mois de juin 2002 sur une période de 15 jours.

Les poulets étaient normalement vaccinés selon le programme suivant :

J1 : vaccins vivants atténués contre la Bronchite infectieuse (type H.120), et contre la maladie de Newcastle (type Hitchner B1).

J15 : vaccins vivants atténués contre la Maladie de Newcastle (type Hitchner B1), et contre la Maladie de Gumboro (type Intermédiaire)

Les résultats obtenus (titres moyens ; 15 échantillons par lot), de même que les critères d'interprétation retenus par cette intégration pour conclure à l'infection ou à une mauvaise vaccination, sont figurés dans le tableau suivant :

DATE		ELEVAGE	P	AGE	IBD		REO		NDV		IBV		TRT		
M	J				TGM	CV	TGM	CV	TGM	CV	TGM	CV	POS	DTX	NEG
6	11	J.F.	1	43	4956	13	1267	73	7551	50	1245	65	100		
6	11	L.C.	2	44	3039	31	1060	62	1037	102	1326	91	100		
6	11	S.M.D.P.	7	41	2537	41	1017	63	4318	91	777	112			100
6	11	H.F.	3	42	2811	43	641	62	1044	160	78	231	100		
6	11	A.	2	42	3817	30	1038	70	3492	110	661	83	90	10	
6	11	L.T.	5	42	3581	28	445	71	2774	93	385	106	100		
6	11	D.	2	48	3501	32	2131	67	1894	139	256	177	80	20	
6	11	T.	1	45	3516	32	1644	76	1701	131	1236	102	80	10	10
6	11	E.	7	42	3734	23	2176	88	4498	60	3028	63			100
6	11	P.	3	48	4243	43	1097	78	2481	56	487	97	90	10	
6	19	C.	5	42	2251	40	401	58	1892	88	1790	85	30	20	50
6	19	E.P.	5	42	2676	42	510	33	594	85	551	115	80	10	10
6	19	V.	1	44	3120	28	328	76	2508	91	518	90	30	50	20
6	19	S.	2	45	3562	38	475	72	2906	96	35	182	100		
6	19	G.	1	41	2633	29	260	68	1426	132	9	130	90	10	
6	19	H.	4	42	2206	33	1112	76	546	19	269	163	40	10	50
7	17	G.	1	45	2887	47	778	61	3736	57	2111	55	50	30	20
7	17	V.D.F.	1	42	3156	30	1633	41			879	79	40	20	40
INFECTION		Critère	>4000		>3000		>4000		>3000		>29				
		Couleur													
MAUVAISE VACCINATION		Critère	<1000				<1000								
		Couleur													

Conclusions retenues (par l'intégration) :

Maladie de Gumboro : tous les élevages sont positifs ; deux élevages présentent des titres moyens très élevés qui laissent suspecter une infection sauvage.

Réoviroses : les titres moyens relevés sont bas et aucun ne permet de suspecter une infection sauvage par une souche agressive.

Maladie de Newcastle : la plupart des titres correspondent aux titres attendus pour le programme de vaccination mis en place. Dans 2 élevages, les titres moyens particulièrement bas font à penser à des problèmes de prise vaccinale, tandis que dans

trois autres, les titres élevés indiquent une infection du troupeau par le virus sauvage. Le risque Newcastle est donc élevé.

Bronchite infectieuse : tous les titres moyens sont bas et en accord avec ceux que l'on observe après l'application d'un programme de vaccination tel que celui retenu par cette intégration. Le risque d'infection sauvage BI est très réduit.

Syndrôme des grosses têtes (SIGT = TRT) : les résultats sont exprimés en qualitatif. La majorité des troupeaux prélevés présentent un pourcentage de sujets positifs supérieur ou égal à 30%, ce qui traduit une très forte prévalence de cette infection.

D 2. CONSEQUENCES PRATIQUES :

Un suivi séro-épidémiologique bien conduit, fournit, à celui qui l'entreprend, un bilan des agents potentiellement pathogènes qui infectent, ou n'infectent pas, les troupeaux qui le préoccupent.

Il lui appartient, dans un deuxième temps de mettre ces informations en parallèle avec les données cliniques et technico-économiques recueillies et sa politique sanitaire. En effet, l'infection de troupeaux par des microorganismes, même potentiellement pathogènes, n'est pas forcément responsable de conséquences économiques négatives, et ne justifie pas forcément la mise en place d'un programme de prévention spécifique.

C'est au producteur de mesurer l'opportunité d'une telle mesure.

CONCLUSION

Les infections des troupeaux de volailles par des microorganismes potentiellement pathogènes sont variables dans **le temps** et dans **l'espace**. Ceci signifie que les mesures de prévention appliquées peuvent se justifier à un moment donné et plus à un autre, ou bien se justifier à un endroit et pas à un autre. Un programme de prévention, et en particulier sa composante vaccinale, ne doit être regardé ni comme définitif, ni comme cumulatif avec des ajouts périodiques sans jamais de retraits. La sérologie à travers une démarche de type séro-épidémiologique permet d'apporter au producteur des informations utiles pour mieux gérer, et mieux optimiser son investissement sanitaire.

Cette démarche est facile à mettre en œuvre au niveau des élevages de poulets de chair du fait de leur courte période de vie et de la faible pression vaccinale à laquelle ils sont soumis (en France !). Ceci limite le risque de confusion entre anticorps post-vaccinaux et anticorps post-infectieux. Par ailleurs, leur plus grand nombre et leur bonne répartition sur le territoire permet éventuellement de les considérer comme des élevages sentinelles, rendant les enquêtes sur les animaux à vie longue, plus secondaire.

Les résultats séro – épidémiologiques obtenus doivent être mis en relation avec les observations technico-économiques pour établir les conséquences économiques des infections enregistrées. En effet, et c'est là une carence de la sérologie, les résultats renseignent peu sur le caractère pathogène de la souche de microorganisme qui a infecté, si tant est qu'une souche pathogène exerce toujours son pouvoir négatif.

Ce sera peut être le rôle de nouvelles techniques, telle que la PCR, de compléter et d'enrichir les informations recueillies au cours de ce genre d'enquête.

LA SEROLOGIE PAR TECHNIQUE ELISA.

QU' EST-CE QUE LA TECHNIQUE ELISA ? :

La formation d'un complexe antigène-anticorps peut être révélée par une technique immuno-enzymatique qui est à la base de la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), qui peut se présenter sous différentes versions.

Par exemple, dans le cas de l'ELISA dite « indirecte », des virus, (ou tout autre antigène), sont collés (on dit « coatés ») sur les parois des alvéoles (les puits) d'une plaque en plastique.

Dans un premier temps, les puits sont remplis de sérum dilué et, s'ils sont présents, les anticorps du sérum se fixent aux virus, et se retrouvent ainsi attachés aux parois. Un lavage élimine l'excès de sérum.

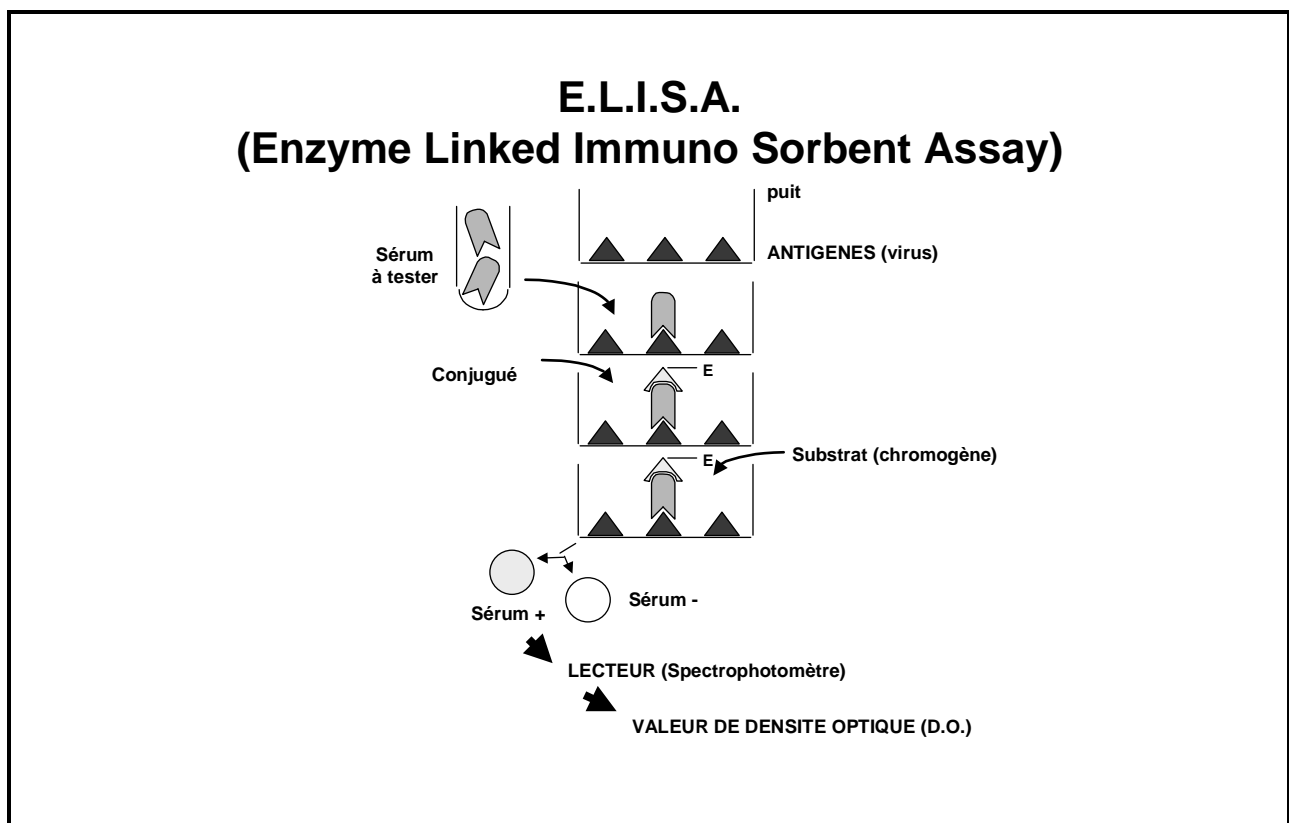
Dans un deuxième temps, on fait agir un sérum (le « conjugué ») contenant des anticorps anti-anticorps de poulet couplés à une enzyme, et qui vont s'attacher aux anticorps recherchés s'ils sont présents.

Ce conjugué est obtenu en immunisant une espèce différente du poulet, la chèvre par exemple. Un lavage élimine l'excès de conjugué.

Dans un dernier temps est ajouté un substrat (dit « chromogène »), susceptible de changer de couleur sous l'action de l'enzyme.

Plus il y a d'enzyme, c'est à dire plus il y a d'anticorps, plus la réaction est intense et plus la couleur finale est intense.

La mesure objective, au spectrophotomètre, de la densité optique de la solution finale permet de fournir une évaluation quantitative de la concentration initiale du sérum en anticorps.



QUELS SONT LES AVANTAGES DE LA TECHNIQUE ELISA ? :

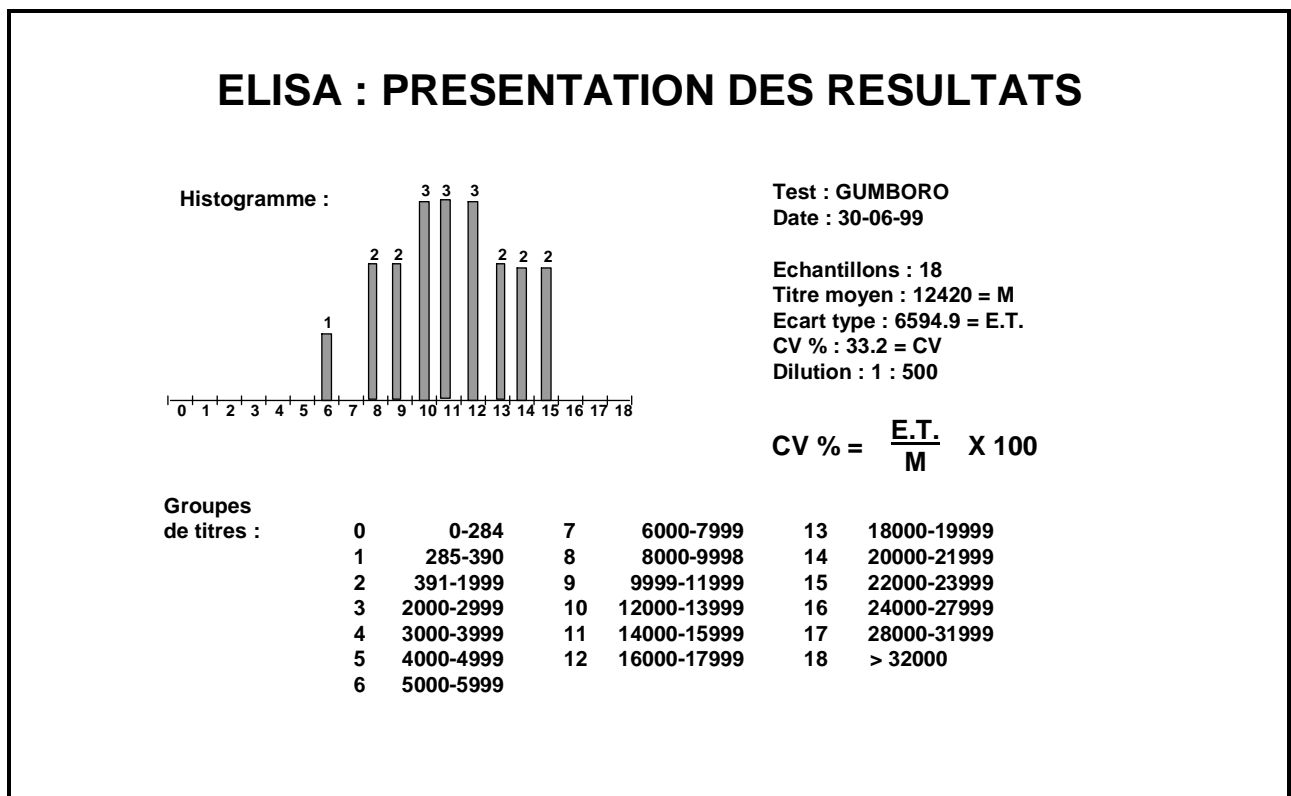
Outre des caractéristiques techniques (sensibilité, spécificité, réplicabilité, etc.) qui permettent de la comparer avec bonheur à d'autres techniques sérologiques, l'ELISA présente des avantages spécifiques décisifs qui en ont fait (et de très loin) la technique sérologique la plus employée en aviculture.

Ces avantages sont :

- La rapidité d'exécution : le résultat peut être rendu en quelques (2 à 3) heures.
- Un coût très inférieur à la plupart des techniques sérologiques classiques (un test coûte généralement à l'éleveur environ 3 Euros).
- Les possibilités de standardisation, voire de totale automatisation (l'appréciation du résultat final est objectif et mécanique).
- La possibilité de traiter simultanément un très grand nombre de prélèvements.

Par ailleurs, le moindre coût de l'analyse a permis d'emblée d'augmenter la taille de l'échantillon et de concevoir l'approche sérologique, de manière globale au niveau du troupeau, et non plus seulement individuelle.

Ceci a entraîné, grâce à l'informatique, la mise au point de systèmes d'exploitation et de présentation des résultats autorisant une meilleure appréhension de la réalité, et une plus grande convivialité. Un logiciel informatique transforme mathématiquement les résultats bruts (de densités optiques) en valeurs évoquant les « titres » sérologiques classiques, et les présente sous une forme graphique qui parle mieux que des données statistiques brutes.



Ces avantages ont permis une évolution très importante (on peut même parler de révolution) de l'attitude des professionnels vis à vis des informations sanitaires pouvant être recueillies et exploitées. La notion de « chek-up » a ainsi rapidement pris le pas sur celui de diagnostic, et à l'échelle du troupeau ont été développés les concepts de :

- « Profiling » ou profil sérologique, permettant d'apprécier la répartition des taux d'anticorps à un instant donné.
- « Monitoring » ou suivi sérologique, permettant de suivre l'évolution des profils sérologiques dans le temps.
- « Baseline » ou référentiel de valeurs propres à l'élevage (ou à l'organisation), permettant de mieux apprécier et situer les résultats enregistrés sur un lot, par rapport aux résultats moyens habituels.

Grâce à la technique ELISA et à la présentation conviviale des résultats, l'analyse sérologique est devenue un outil essentiel de la gestion sanitaire des troupeaux de volailles dont les problèmes de santé sont lourds de conséquences.

L'ELISA et les logiciels de traitement des résultats ont fait passer le recours à l'analyse sérologique d'un acte diagnostique d'exception à une pratique de routine.

La décroissance des anticorps maternels Gumboro chez les souches à croissance intermédiaire

Dr Anne-Christine DUFAY – Intervet SA
Dr Jean LEORAT – Selvet Conseil

Résumé :

Afin de mieux préciser la décroissance des anticorps maternels des poulets de souche JA 757, un échantillon de 29 poussins (sur un effectif de 17340), élevés dans un poulailler conventionnel, ont fait l'objet d'un suivi individuel. Des prises de sang à différentes échéances ont permis de comparer la date de vaccination théorique, calculée selon deux méthodes appliquées habituellement au poulet standard, avec la réalité des titres individuels et la date de vaccination ainsi conseillée.

Les résultats obtenus par ces trois méthodes sont cohérents et montrent que dans cet essai, la décroissance des anticorps maternels pour les poulets JA 757 s'effectue selon le même modèle que pour le poulet standard, avec une demi-vie de 3 jours. Les méthodes de prédiction de la date de vaccination habituellement utilisées pour le poulet standard s'appliquent donc également au poulet JA 757, bien que ce dernier soit le produit du croisement d'un coq standard et d'une poule label.

Introduction :

En France, les poussins sont issus majoritairement de reproducteurs vaccinés contre la maladie de Gumboro, et donc pourvus d'anticorps maternels à J1.

Ces anticorps, qui protègent les poussins contre la maladie, décroissent pendant les premières semaines de vie, la rapidité de la décroissance étant fonction de la croissance de la souche et du gain de poids des animaux. La vaccination n'est possible que lorsque les anticorps maternels ont atteint un seuil de 500 (ELISA Idexx) pour le Nobilis® 228E ou 250 pour le Nobilis® D78. Avant cela, le vaccin est neutralisé par les anticorps maternels. Par ailleurs, le virus sauvage est en compétition avec le virus vaccinal, et la vaccination, pour être efficace, devra être faite avant que le virus sauvage ne puisse franchir à son tour la barrière des anticorps maternels, mais cependant suffisamment tard pour que le seuil de 500 (ou 250) soit atteint. C'est le concept de la protection continue.

Une modélisation mathématique de la courbe de décroissance a été réalisée afin de pouvoir, à partir du titre sérologique en anticorps Gumboro à J1, pouvoir prévoir la date de vaccination, à laquelle le seuil adéquat sera atteint.

Pour les souches à croissance rapide, de type poulet standard, dont le sang a été prélevé entre 1 et 3 jours d'âge, on utilise en France la Formule de Kouwenhoven modifiée :

Formule de Kouwenhoven :

$$\text{Age vaccination} = \text{âge PS} + \frac{\text{moyenne} \sqrt{\text{titres} - 22,36}}{2,82}$$

Modifications apportées par Intervet :

- racine carrée de la moyenne des titres
- grille de corrections (document interne Intervet disponible sur demande).

Cette formule se justifie par le fait que la décroissance des anticorps pendant les premiers jours de vie n'est pas linéaire du fait du relargage des anticorps par le sac vitellin.

Pour des prises de sang plus tardives, on utilise la méthode des demi-vies : on considère que le titre en anticorps est divisé par deux toutes les demi-vies (trois jours pour le poulet standard) et on reproduit cette division jusqu'à obtenir un titre de 500, à partir de l'âge de la 1ère prise de sang. L'âge de la vaccination est celui où le titre est de 500 (vaccination 228E).

Objectif de l'étude :

Il s'agit de tester l'hypothèse que le poulet JA 757 se comporte de la même manière que le poulet standard (type Vedette) en matière de décroissance d'anticorps maternels, bien que celui-ci soit issu d'un croisement entre un coq standard et une poule label.

Matériels et méthodes :

Site de l'étude : dans un élevage, un bâtiment conventionnel de 823 m², de 17340 poussins JA 757, dont l'abattage est prévu à 52 jours. 29 poussins sont choisis au hasard, bagués et parqués dans une zone du bâtiment. Ils sont nourris avec le même aliment commercial que leurs congénères.

- Ces 29 poussins subissent des prises de sang à J3, J6, J10, J13, J18.
- Les sangs sont centrifugés, les sérums congelés.
- Les sérums subissent un titrage des anticorps Gumboro par méthode ELISA (kit Biocheck, dilution au 1/500), le même jour, en regroupant sur la même plaque tous les sérums d'un même poussin.

Les titres en anticorps Gumboro sont calculés de la manière suivante :

1/ La concentration relative en anticorps Gumboro dans l'échantillon est calculée en référence à un témoin positif, et exprimée en S/P :

$$S/P = \frac{\text{DO écht testé} - \text{moyenne des DO témoins négatifs}}{\text{Moyenne DO témoins positifs} - \text{Moyenne DO témoins négatifs}}$$

S = sample (échantillon)

P = positif

2/ Calcul du titre en anticorps : deux cas de figure

- Situation générale : (formule n°1)

$$\text{Log 10 titre} = 1,10 (\log_{10} S/P) + 3,361$$

Cette formule permet de tirer parti de la sensibilité du kit dans les titres bas et élevés.

- Calcul de date de vaccination (poussins de 1 à 5 jours) (formule n°2):
Log 10 titre = 0,43 (log10 S/P) + 3,5

Dans les conditions françaises, la date de vaccination est calculée d'après la Formule de Kouwenhoven lorsque les prises de sang ont été faites entre J1 et J3. Cette formule se base sur des titres IDEXX, donnant moins d'amplitude dans les valeurs élevées. Ainsi, les titres obtenus avec la formule Biocheck n°1 se révèlent trop élevés pour être utilisés avec cette formule, et donneraient des âges de vaccination beaucoup trop tardifs. Une formule spécifique pour cette situation a été mise au point, à partir des mêmes valeurs S/P, qui permet ainsi de calculer les dates de vaccination avec la Formule de Kouwenhoven.

Résultats

➤ **1ère approche :**

Le tableau 1 donne l'échelle des titres individuels Gumboro à J3 obtenus avec la formule Biocheck N°2. La moyenne des titres des 29 poussins est de 6191, ce qui donne une date de vaccination de **20 jours** en utilisant la formule de Kouwenhoven corrigée.

Tableau 1

Date vaccination recommandée	Nb poussins	Echelle titres Gumboro
20j	15	6064-7547
19j	6	5624-5832
18j	6	5147-5504
17j	2	4472-4878

➤ **2e approche :**

On considère que les premiers jours, il existe un relargage d'anticorps maternels via le sac vitellin.

Ensuite, la décroissance des anticorps se linéarise. On peut appliquer la méthode des demi-vies à partir du titre obtenu avec la formule Biocheck n°1 à 10 jours d'âge, en considérant que le titre en anticorps diminue de moitié tous les trois jours (demi-vie du poulet standard).

Titre à 10j = 3704

Titre à 13j = 1852

Titre à 16j = 926

Titre à 19j = 463

Vaccination à 19 jours

➤ **3e approche :**

Les tableaux 2 et 3 donnent les titres en anticorps Gumboro obtenus avec la formule n°1 de calcul à partir des S/P.

Tableau 2

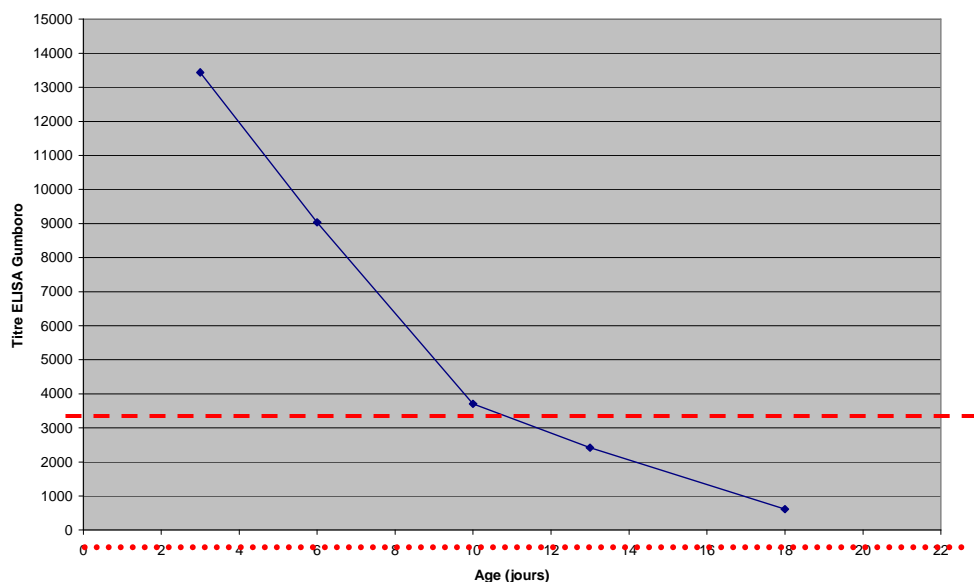
Jours	6	14	1	38	21	13	32	34	12	8	28	16	24	7	11
3	21322	19827	18653	18482	18384	17796	17480	16889	16574	16357	16157	16070	14423	13435	12145
6	15847	17909	17805	8783	8515	20328	9333	5063	10197	12793	12501	3085	12068	13515	7126
10	1838	2160	4922	4507	7584	12513	2474	3832	2185	4247	2788	4429	5172	4421	3140
13	2075	1090	2246	3296	2050	4719	3327	2195	1343	2400	1920	3521	3463	2737	2007
18	262	213	577	884	413	277	783	804	531	730	568	1107	692	629	831

Tableau 3

Jours	4	29	5	3	30	2	18	22	36	19	27	9	10	26	Moyenne
3	11497	10986	10748	10658	10408	10177	10041	9447	9407	9347	9244	8832	7976	6950	13438
6	5551	5338	6081	7852	9000	6956	4711	7045	4911	4365	8146	9086	2770	5313	9034
10	3824	2858	2981	3184	2236	3440	2762	3437	4798	2614	3631	2667	1100	1686	3704
13	1671	1529	2588	4391	1381	2057	1563	2020	3116	1821	4830	2824	910	1024	2418
18	1090	769	838	714	178	186	268	708	891	333	1140	933	50	460	616

A partir de ces titres, on calcule la moyenne arithmétique et on trace la courbe cinétique du titre en anticorps en fonction de l'âge. L'intersection de la courbe avec le seuil de 500 sur l'axe des ordonnées nous donne la date de vaccination : **19 jours**.

Moyenne des titres en Ac des poussins



Discussion :

Les animaux ont eu une croissance conforme à la norme pour des JA 757. L'élevage n'a pas d'historique de maladie de Gumboro hypervirulente, et pratique des méthodes classiques de désinfection, on peut donc supposer que la pression Gumboro y est « normale », ce qui ne devrait donc pas influencer significativement la décroissance des anticorps maternels.

Le nombre de 29 poussins a été déterminé pour des raisons pratiques. Il ne peut certes pas être considéré comme statistiquement représentatif du lot, mais ce travail se veut surtout une approche pratique.

Les deux premières approches donnent des résultats proches, à un jour d'écart, ce qui est tout à fait acceptable compte-tenu de l'utilisation de méthodes de calcul différentes pour les titres ELISA, et de la variabilité liée à cette méthode.

La courbe cinétique montre des titres réels compatibles avec une vaccination à 19 jours : c'est tout à fait en ligne avec les deux approches précédentes, compte-tenu du déficit de précision des titres ELISA autour de 500 et moins.

Conclusion :

Les trois méthodes utilisées convergent, et le suivi cinétique montre que, dans cet essai, le calcul de la date de vaccination pour la souche JA 757 peut se faire avec les mêmes méthodes que celles utilisées habituellement pour le poulet standard, la décroissance des anticorps s'effectuant sur le même modèle, bien que le JA 757 soit le croisement d'un coq standard et d'une poule label.

Ces résultats corroborent les retours du terrain recueillis par Intervet par ailleurs.

Bibliographie :

KOUWENHOVEN B., VAN DEN BOS J. (1992) : Control of very virulent IBD (Gumboro disease) in the Netherlands with so called « hot » vaccines. Proceedings World Poultry Congress Amsterdam – The Netherlands. 20-22 September 1992. Vol 1 : 465-468.

GARDIN, Y (1994) : Application of an invasive vaccine under controlled conditions to solve Gumboro problems in France. Proceedings International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anemia – Rauscholzhhausen, Germany, 21-24 June 1994.

GARDIN, Y., SZYMANSKY J. , VELU S. (1995) : Etude clinique, lésionnelle, sérologique et virologique d'un passage de maladie de Gumboro virulente dans un élevage. Journée de la Recherche Avicole, Tours, 1995.

LUKERT P.D., SAIF Y.M. : Infectious Bursal Disease, p 721-733, in Diseases of Poultry, 10th edition, 1997, Edited by B.W Calnek.

Présentation de l'étude PCR-imagerie médicale, resultats et cartographie virologique.

Dr. Françoise BIET, FORT DODGE – Rippa 2002.

LA PREVENTION VACCINALE DES COCCIDIOSES UTILISATION DES PARACOX

Y. FREMONT
SCHERING-PLOUGH VETERINAIRE - RIPPA 2002

L'arrivée sur le marché français du Paracox-8 en 1996 a révolutionné la prévention anticoccidienne par la mise à disposition des utilisateurs d'un vaccin très efficace au milieu d'un univers où seuls étaient utilisés les coccidiostats incorporés dans l'aliment.

Face à la montée des résistances aux coccidiostats associée aux souhaits du Consommateur de voir disparaître de l'alimentation des oiseaux de chair toute « substance chimique », le Paracox-8 s'est rapidement développé. Au départ employé pour les reproducteurs, son utilisation s'est rapidement étendue aux autres oiseaux à longue durée de vie (chapons, poulardes et pondeuses au sol) ainsi qu'à une part notable des poulets biologiques et des poulets Label. Nous verrons dans cet exposé comment ce premier vaccin a été complété par le Paracox-5 qui a provoqué un rapide élargissement de l'approche vaccinale.

Modulations du pouvoir pathogène des coccidies :

Une notion fondamentale doit être soulignée : la présence de coccidies ne veut pas dire coccidiose. Pour qu'il y ait coccidiose, il est d'abord nécessaire que les oiseaux ne présentent pas d'immunité anticoccidienne, puis qu'ils soient contaminés par des **coccidies virulentes et en nombre important**. C'est l'association de ces paramètres qui permet l'apparition de la coccidiose. Le seul diagnostic fiable de la « coccidiose maladie » est la présence de lésions. S'il n'y a pas de lésion, il n'y a pas de trouble des performances et on parle de « présence de coccidies ».

Parmi les 7 espèces de coccidies pathogènes pour *Gallus gallus*, chacune d'elles présente ses propres caractéristiques d'indices lésionnels, de pouvoir pathogène et de potentiel de multiplication. De ce fait, certaines coccidies vont provoquer des coccidioses précoces et d'autres des coccidioses tardives.

Il est certain que, techniquement, le Paracox-8 apporte la réponse absolue puisqu'il confère une immunité complète contre toutes les coccidies de l'espèce poule, avec en plus une impossibilité d'apparition de résistance. Mais les espèces de coccidies entraînant les coccidioses tardives sont les plus délicates à produire, et donc les plus onéreuses entraînant un accroissement important du prix de revient du vaccin. Est-il nécessaire de maintenir toutes ces espèces pour une protection du poulet ?

Le concept du Paracox-5 :

C'est en partant de l'idée ci-dessus que Schering-Plough a imaginé un vaccin présentant un spectre focalisé exclusivement sur les coccidies dangereuses pour le poulet. *Eimeria necatrix*, *E. brunetti* et *E. praecox* ne sont pas présentes dans ce

nouveau vaccin. Les deux premières espèces sont épidémiologiquement peu fréquentes et provoquent des coccidioses tardives, la troisième manifeste un pouvoir pathogène insignifiant chez le poulet.

Ce nouveau vaccin appelé Paracox-5, contient 5 souches différentes de coccidies précoces. Comme le Paracox-8, il a été soumis à la procédure d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) . Cette démarche est longue et onéreuse mais comme pour l'ensemble des médicaments vétérinaires elle apporte à l'utilisateur une sécurité absolue : les éléments fournis par le laboratoire sont vérifiés et contrôlés par les Autorités Réglementaires, la régularité de fabrication est prouvée, le mode d'action expliqué, l'innocuité déterminée et bien sûr l'efficacité démontrée sur le terrain, non seulement en instantané mais également lors d'utilisation prolongée.

L'AMM du Paracox-5 a été obtenue au cours de l'année 2000 mais les différentes extensions qui portaient sur ses modulations d'utilisation nous ont amenés à travailler ce sujet jusqu'à mi 2001. L'indication de ce vaccin est : « Immunisation active des poulets ».

Le Paracox-5 présente un mode de vaccination déclinable :

Contrairement à son prédécesseur qui avait été conçu pour une utilisation exclusive dans l'eau de boisson des oiseaux, le Paracox-5 a été élaboré de manière à pouvoir répondre à différents schémas d'utilisation. A ce jour, nous avons obtenu 3 modes différents d'utilisation qui permettent à l'utilisateur de trouver ce qui convient le mieux à ses choix techniques.

Deux méthodes de vaccination sont utilisables dans l'élevage :

- vaccination par pulvérisation du Paracox-5 sur l'aliment des poussins juste avant leur mise en place dans le bâtiment
- vaccination par mélange à l'eau de boisson à partir du 3ème jour de présence dans le bâtiment.

Une méthode est utilisable au couvoir : la pulvérisation sur les poussins à la sortie de l'éclosoir.

Mode d'action du Paracox-5 :

Pour être efficace, les oocystes coccidiens vaccinaux doivent passer à travers le jabot pour parvenir sans dommage jusqu'au gésier de l'oiseau. Là, les parois sont brisées mécaniquement puis soumises dans le duodénum à l'action des enzymes pancréatiques qui dissolvent la paroi des oocystes encore intacts. Les éléments contenus sont libérés et le cycle de développement des souches vaccinales va pouvoir se dérouler jusqu'à la pénétration des cellules intestinales où vont se développer une forme nommée schizontes. Ce stade de développement du parasite est essentiel, c'est lui qui suscite l'apparition de l'immunité. L'efficacité est apportée par une immunité locale tandis que les anticorps circulants n'ont pas de rôle protecteur.

On comprend très facilement que le mélange du vaccin avec l'aliment ou avec l'eau de boisson répond directement à cette nécessité d'amener les oocystes vaccinaux dans le

tube digestif de l'oiseau. Le mécanisme de la vaccination par pulvérisation sur les poussins est légèrement plus complexe.

En fait, cette vaccination utilise un comportement instinctif du poussin : lorsqu'ils éclosent de l'œuf, ils lissent leurs plumes et celles de leurs congénères. Ils vont ainsi récupérer le vaccin qui aura été déposé sur leur plumage en gouttelettes. Deux points méritent d'être soulignés, qui différencient cette vaccination de celle contre certains virus tel que celui de la bronchite infectieuse :

- la sphère occulo-nasale et respiratoire n'intervient absolument pas dans l'apparition de l'immunité anticoccidienne,
- Le comportement de lissage est favorisé par la taille des gouttelettes déposées sur le plumage des oiseaux. Ce comportement est également accentué par l'utilisation de cochenille (E 120) dans la solution vaccinale qui colore momentanément les poussins en rose. Ces deux facteurs permettent une ingestion appropriée de la dose vaccinale.

La vaccination au couvoir avec le Paracox-5 nécessite un équipement spécifique. Les machines de vaccinations par pulvérisation au couvoir, recommandées pour les vaccinations antivirales, ne présentent généralement pas les caractéristiques optimales nécessaires à une bonne vaccination anticoccidienne.

Précautions à respecter lors de vaccinations contre les coccidioses.

Ce sont des vaccins vivants, ils ne seront efficaces qu'à conditions qu'ils soient bien conservés jusqu'à leur utilisation, bien administrés et que rien n'empêche le recyclage des coccidies de la litière qui assurent un rappel vaccinal naturel.

Bien conserver le vaccin c'est le maintenir entre +2 et +8°C et surtout éviter sa congélation.

Bien l'administrer, c'est particulièrement vacciner avant l'âge de 9 jours :

- au couvoir utiliser un équipement approprié,
- sur l'aliment pulvériser juste avant l'arrivée des poussins,
- dans l'eau de boisson vacciner le 3ème jour ou en cas de besoin ultérieurement.

C'est toujours respecter le mode d'emploi du vaccin et particulièrement le dosage.

Permettre le recyclage parasitaire, c'est éviter, pendant la vie des oiseaux, d'utiliser dans l'eau ou l'aliment des oiseaux toute substance présentant des effets anticoccidiens (attention aux produits comme les sulfamides). Les répercussions risqueraient d'être d'autant plus préjudiciable à la vaccination que l'emploi d'une substance indésirable est proche de l'intervention vaccinale.

Utilisation des données épidémiologiques pour choisir le vaccin approprié :

Le vaccin le plus polyvalent est toujours le plus performant mais y a-t-il un risque réel à utiliser un vaccin à spectre plus étroit ?

Comme il l'a été dit précédemment, il est important de différencier « coccidiose » et « présence de coccidies ». Les études épidémiologiques que nous avons conduites en 1994 avaient été orientées vers la détection des différents agents pathogènes mais non pas vers la fréquence des atteintes de coccidiose.

Nous savons que de nombreux facteurs interviennent entre la contamination par une espèce de coccidie et son intervention clinique. Certains vont accentuer, d'autres réduire le risque pathologique. Mais dans ce domaine où beaucoup d'éléments restent à découvrir et à démontrer, il est concevable d'imaginer qu'il existe des mécanismes d'écologie intestinale qui modulent l'impact parasitaire. Il est probable qu'un intestin contaminé par des coccidies est différent d'un autre qui n'a jamais subi ce développement parasitaire, sans oublier l'importance du niveau de contamination.

Nous savons qu'il existe des effets positifs du vaccin qui vont au-delà de la simple prévention coccidienne : par exemple l'effet positif de la vaccination Paracox sur le jaunissement des poulets de souches jaune est bien connu mais également une amélioration de l'homogénéité des poulets Label vaccinés a été démontrée. En tout cas il est certain que les souches de coccidies virulentes, les souches de coccidies vaccinales et les coccidiostats créent des systèmes différents, il serait imprudent de généraliser trop rapidement d'un système à l'autre.

L'idéal pourrait sembler être d'effectuer, pour chaque élevage, un diagnostic de laboratoire pour identifier les espèces présentes, mais outre le délai nécessaire à cette analyse, les résultats ne sont qu'un reflet instantané ne donnant pas d'information sur la dynamique parasitaire. La référence restera longtemps encore l'œil de l'éleveur.

Mais pour être pratique, dans l'immédiat, quelle stratégie vaccinale avoir ?

Lorsque les poulets sont abattus avant l'âge de 10 semaines, l'utilisation exclusive du Paracox-5 convient parfaitement.

Pour les poulets Label, depuis que le Paracox-5 est commercialisé, nous commençons à nous établir une opinion sur deux schémas utilisés en production de type Label : la rotation des vaccins Paracox-5 / Paracox-8 et l'utilisation unique du Paracox-5 sur les différentes bandes successives.

La première utilisation marche parfaitement en utilisant périodiquement le vaccin complet contre les souches qui ne sont pas présentes dans le vaccin moins complet. C'est une solution de confort efficace.

Le schéma avec uniquement utilisation du Paracox-5 a été utilisé sans incident dans quelques structures de production : il n'y a pas eu d'apparition de cas de coccidiose provoquées par *Eimeria necatrix* ou *E. brunetti*. Il a même été observé dans une de ces structures la présence de *E. brunetti* sans développement dans le temps ni manifestation clinique ; tout s'est passé comme si cette coccidie n'arrivait pas à se multiplier suffisamment pour créer une pathologie.

Un point mérite d'être souligné : les élevages qui ont utilisé le Paracox-5 en schéma d'utilisation exclusive, étaient des élevages gérés en bande unique qui présentaient donc des situations épidémiologiques homogènes et la litière y était bien sûr enlevée entre chaque bande.

Pour des raisons d'échange des coccidies entre les bâtiments des élevages gérés en bande multiple, il est probable que la situation épidémiologique aurait pu être différente. Dans ce cas il aurait été raisonnable de rechercher une couverture maximale en utilisant le Paracox-8.

Un autre mode d'élevage amène à conseiller plutôt l'utilisation du Paracox-8, c'est la production de poulets abattus à 16 semaines et au-delà. L'âge d'abattage de ces poulets permet un développement coccidien plus important.

Il est certain que notre connaissance de l'utilisation exclusive du Paracox-5 sur les bandes consécutives de poulet Label va encore s'affiner. Actuellement il est utile de rester vigilant dans ce cas mais l'intérêt économique peut justifier ce choix face à une efficacité démontrée et à des méthodes de vaccination très commodes.

Conclusion :

L'apparition du Paracox-5 en complément du Paracox-8 permet désormais un choix stratégique selon les différents systèmes d'utilisation terrain. L'approche vaccinale permet par une seule intervention précoce d'apporter une protection contre les coccidioses cliniques et sub-cliniques pendant toute la vie de l'oiseau et avec toutes les garanties apportées par l'octroi d'une A.M.M.

Le Paracox-8, vaccin utilisable dans toutes les conditions d'élevage, sera à employer impérativement pour les oiseaux à longue durée de vie (reproducteurs, pondeuses au sol, chapons et poulardes) et pour ceux élevés dans des conditions épidémiologiques délicates.

Le Paracox-5, de prix beaucoup plus modéré, pourra être utilisé efficacement dans les productions de poulets de chair en raisonnant son utilisation face aux données environnementales. Son mode d'emploi modulable permettra un choix approprié aux souhaits de l'utilisateur : aliment, eau de boisson, pulvérisation au couvoir.

DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A PNEUMOVIRUS AVIAIRE PAR PCR

S. LEMIERE
LABORATOIRE MERIAL – Rippa 2002

INTRODUCTION

Les pneumovirus aviaires sont des virus à ARN appartenant à la famille des *Paramyxoviridae*, sous-famille des *Pneumovirinae*. Les pneumovirus sont les seuls représentants de cette sous-famille comprenant les pneumovirus aviaires. Ces virus sont à l'origine de pathologies chez la dinde (rhinotrachéite infectieuse) et chez l'espèce poule (grosse tête infectieuse.) Les signes cliniques ne sont pas caractéristiques de l'infection virale seule mais sont le résultat de la conjonction du pouvoir pathogène du virus et de celui de germes de surinfection bactériens notamment. Les infections à pneumovirus sont décrites dans les conditions du terrain en France depuis les années 1980 chez la dinde et l'espèce poule (Viénot, 2002ⁱ), également chez le faisan et la pintade, et aussi plus récemment chez le canard de Barbarie (Jestin *et Al.*, 2000ⁱⁱ). Le diagnostic clinique et nécropsique des infections à pneumovirus aviaire est difficilement basé sur l'observation de signes caractéristiques en élevage. Les analyses au laboratoire sont le complément nécessaire de l'établissement d'un diagnostic. Les analyses sérologiques utilisant la méthode ELISA sont utilisées, le plus souvent pour le suivi de la ponte chez la poule. Chez des animaux à durée de vie plus courte, en production chair, les résultats des analyses sérologiques à visée diagnostique sont souvent plus difficiles à interpréter. L'isolement de pneumovirus à partir d'organes d'animaux malades euthanasiés est envisageable suivant des méthodes classiques de virologie : isolement à partir d'anneaux de trachée de poulet, de cellules d'embryons de poulet ou de système cellulaire VERO. La recherche de matériel génétique viral à partir de prélèvements effectués *in vivo* chez des animaux malades est une voie d'avenir à explorer.

VIROLOGIE

Les pneumovirus en microscopie électronique se présentent sous la forme de particules sphériques de 80-200 nm de diamètre. Des formes filamenteuses sont aussi décrites. Elles mesurent jusque 1000 nm en longueur pour un diamètre de 80-100 nm (Alexander, 1997ⁱⁱⁱ.)

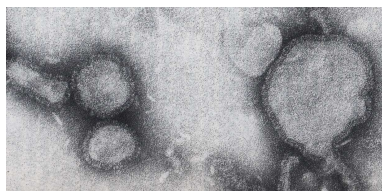


Figure 1 : forme classique sphérique du pneumovirus (Alexander, 1997.)

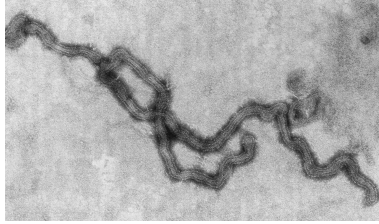


Figure 2 : forme filamenteuse du pneumovirus (Alexander, 1997.)

Le matériel génétique des pneumovirus aviaires est constitué d'une molécule d'ARN simple brin. Ces virus sont des virus enveloppés d'une membrane lipidique dérivée des cellules hôtes. Le génome viral dans la cellule hôte est transcrit en ADN lui-même traduit en 7 protéines de structure et en un minimum de 2 protéines n'intervenant pas dans la structure virale. L'étude de la variabilité des polypeptides viraux dans différents types d'isolats viraux ainsi que les études de l'antigénicité de ces différents isolats montrent qu'il existe peu de variabilité. Néanmoins deux types viraux ont historiquement été décrits en fonction des différences montrées sur les séquences des gènes codant pour la glycoprotéine G. Les types A et B se comportent comme un seul type durant les tests de séroneutralisation. Ils peuvent être différenciés par l'emploi d'anticorps monoclonaux (Cavanagh *et Al.*, 1999^{iv}.) Un type viral dénommé C (type Colorado) a récemment été décrit en Amérique du Nord chez la dinde (Dar *et Al.*, 2001^v.) Un type vraisemblablement différent est de plus décrit chez le canard en France (Jestin *et Al.*, 2000.) Il semble plus proche du point de vue génétique du type C que des types A et B.

RT-PCR

La méthode RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction) est une méthode mise en œuvre pour détecter du matériel génétique viral de virus à ARN. Avant le début de la phase de PCR (polymerase chain reaction) proprement dite, il est indispensable de commencer par pratiquer une transcription inverse des ARN viraux. Cette phase s'effectue par l'adjonction à l'échantillon traité d'une enzyme dite transcriptase inverse ("reverse transcriptase" RT) permettant d'obtenir dans le milieu réactif des ADN bicaténaires, seul matériel pouvant servir de matrice dans le cadre d'une amplification de type PCR (figure 3.) La PCR s'effectue de façon classique à partir de l'ADN bicaténaire en une trentaine de cycles de dénaturation, de fixation des amorces puis d'extension des brins d'ADN.

Le test RT-PCR mis à la disposition du laboratoire Merial par le laboratoire VLA (Veterinary Laboratories Agency-Weybridge, UK) est un test RT-PCR mis au point afin de détecter l'ensemble des pneumovirus aviaires appartenant aux 3 types connus, A, B et C. Le test est basé sur la reconnaissance de séquences génomiques appartenant aux gènes MK pour les virus de types A et C ou M pour les virus de type B. A l'heure actuelle aucune séquence universelle commune à l'ensemble des pneumovirus aviaires des 3 types connus n'a pu être mise en évidence. La sensibilité du test mis au point est pour l'instant difficile à tester. Néanmoins la méthode RT-PCR apparaît plus sensible que l'isolement viral suivant les méthodes classiques de virologie. Il est au vu des connaissances actuelles inenvisageable de baser la méthode de détection de matériel génétique sur un élément commun à l'ensemble des types viraux de pneumovirus

aviaire sans altérer la sensibilité de ce test. La méthode mise au point ne permet pas de différencier les souches sauvages de virus des souches vaccinales (Gough^{vi}, 2002.)

PRELEVEMENTS

D'une manière générale il est difficile d'isoler du matériel génétique de pneumovirus chez un oiseau montrant des signes cliniques. Il est possible d'augmenter les chances de succès de cet isolement en prélevant des animaux en contact avec les malades. Dans les conditions du laboratoire (Gough, 2002) le matériel génétique issu de virus viable est isolé aussi bien chez le poulet que chez la dinde 3 à 5 jours suivant son inoculation expérimentale. Les virus sont prélevés à partir de tissus trachéaux, sinusaux, œsophagiens et palatins. Les cellules de trachée et de sinus apparaissent concomitamment positives lors de la mise en évidence de pneumovirus en immunofluorescence et en RT-PCR. Il est démontré dans ces conditions que les cellules prélevées des oiseaux malades sont bien des sites de réplication du pneumovirus aviaire. Du matériel génétique de pneumovirus a été isolé jusqu'à 17 jours suivant l'infection expérimentale dans les conditions du laboratoire, sans mise en évidence de surinfections d'origine bactérienne comme il apparaît le plus souvent dans les conditions du terrain.

Les échantillons de matériel biologique susceptibles de renfermer un pneumovirus aviaire sont des écouvillons préalablement séchés et conservés congelés à -18°C. Les écouvillonnages trachéaux des oiseaux doivent être effectués le plus tôt possible lors de l'apparition d'un syndrome infectieux de grosse tête en élevage. Si les signes cliniques sont présents il est préférable de prélever de préférence des oiseaux ne montrant pas les signes cliniques, voire de prélever des oiseaux d'un bâtiment voisin. Il est recommandé de prélever des échantillons sur environ 15 oiseaux pour un même site. Les écouvillons doivent être mis à sécher à l'abri de toute contamination avant sa congélation. Toute expédition d'échantillon doit se faire en caisse contenant des blocs réfrigérants.

CONCLUSION

La mise en place de protocoles de recherche de matériel génétique de pneumovirus aviaire chez les oiseaux de différentes espèces sensibles aura pour but dans un premier temps de mieux connaître l'épidémiologie de ce virus et d'évaluer l'incidence de son implication dans les différents syndromes respiratoires décrits en France chez les principales espèces d'intérêt avicole. Un second axe de recherche aura pour but de valider l'opportunité de la mise en place de cette méthode de recherche virale dans les conditions du terrain en complément d'autres moyens d'investigation tels que la sérologie par exemple.

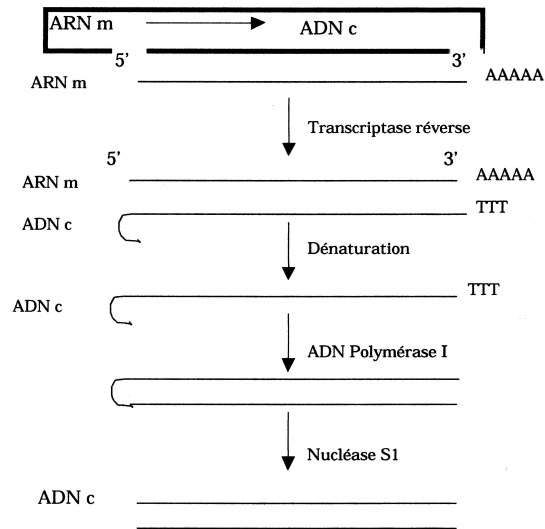


Figure 3 : principe de la transcription inverse dans la méthode RT-PCR (reverse transcriptase - polymerase chain reaction.) L'obtention d'un ADN double brin est la condition initiale pré-requise de l'amplification du matériel génétique viral.

ⁱ Viénot E., 2002, Filières Avicoles, 642, 27.

ⁱⁱ Jestin V. *et Al.*, 2000, SPACE Rennes, intervention du 13 septembre.

ⁱⁱⁱ Alexander D.J., 1997, *in* Diseases of Poultry Calnek 10th Ed., 541-569.

^{iv} Cavanagh D. *et Al.*, 1999, Avian Path., 28, 593-605.

^v Dar A.M. *et Al.*, 2001, Virus Res., 79, 15-25.

^{vi} Gough R.E., 2002, personal communication to Merial laboratories.