

12 JUIN 2008

RIPPA 2008

Rencontres InterProfessionnelles de Pathologie Aviaire

La pathologie des volailles passée au crible

Rencontres InterProfessionnelles de Pathologie Aviaire



RDV

le 12 juin 2008

Auditorium du Triangle - Rennes
Station métro : "le Triangle"

RIPPA 2008



GRUPE
chêne vert

RENCONTRES INTERPROFESSIONNELLES DE PATHOLOGIE AVIAIRE

Rennes

Le 12 Juin 2008

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

***Les organisateurs tiennent à remercier
les firmes et organismes
dont l'aide a été précieuse
pour la réalisation des RIPPA 2008***

**BAYER
Division Santé Animale
BP 11
56891 SAINT AVE CEDEX**

**CEVA
ZI DE LA BALLASTIERE
BP 126
35501 LIBOURNE CEDEX**

**COOPHAVET
Les Pâtisseries
BP 7
44153 SAINT HERBLON**

**ELANCO
13 Rue Pages
92158 SURESNES**

**FORT DODGE
22-26 AV. MARCEL DASSAULT
BP 440
37204 TOURS CEDEX 3**

**FRANVET
ZI D'ETRICHE
BP 20341
49503 SEGRE CEDEX**

**INTERVET – SHERING PLOUGH
SANTÉ ANIMALE
RUE OLIVIER DE SERRES
BP 67131
ANGERS TECHNOPOLE
49 071 BEAUCOUZE CEDEX**

**JANSSEN
DIVISION JANSSEN CILAG
1 RUE CAMILLE DESMOULINS
92787 ISSY LES MOULINEAUX
CDX**

**MERIAL
BP 7
ST HERBLON
44153 ANCENIS CEDEX**

**ALPHARMA BVBA
Garden Square
LAORSTRAAT 16
26ANTWERP BELGIQUE**

**DSM
KIRKEBJERG
Allée 88, 1
DK 2605 BRONDBY**

**VIRBAC
BP 447
06515 CARROS CEDEX**

**FILIERES AVICOLES
13 SQUARE DU CHENE
GERMAIN
3577 CESSON SEVIGNE CEDEX**

Organisation des RIPPA 2008

Coordination

Dr Eric CHATAIGNER

Organisation et

Dr Natacha SORIN

Dr Didier CLEVA

Dr Marc LOYAU

Communication

Séverine ROBIN

Remerciements pour leur intervention

Dr Bénédicte ALEXANDRE

Dr Claire BIENER

Dr Nadine CARIOU

Dr Maarten DE GUSSEM

Dr Christophe DE LANGHE

Dr Jean DELAPORTE

Dr Didier DUIVON

Elisa FOLEGATTI

Loïc FULBERT

Dr Yannick GARDIN

Dr Jean Luc GUERIN

Gilbert INIZAN

Dr Claire JACQUINET

Dr Philippe LE COZ

Gilbert LEBAS

Dr Anne Laure LEDOUX

Dr Jean LEORAT

Dr Paul MORILLON

Dr Pascal PAULET

Dr Michel Robert POPOFF

Dr Anne Sophie RIVIERE

Dr Rozenn SOUILLARD

Dr Jean Marie WATIER

Dr Eric BOUSQUET

Remerciements pour leur concours

Chantal BOUCARD

Laurence CLERMONT

Valérie PUPIN

Catherine GARÇON

Edwige MOUSSU

Valérie CONNAN

Nadège TIREL

Jean-Luc CADINOT

Dr Jean DUDOUYT

Olivier LEBARS

Dr Patrick PUPIN

Sommaire

- Page 7* **Bronchite infectieuse : évolution des souches en Europe et impact de cette évolution sur l'efficacité des vaccins**
Dr Anne-Laure LEDOUX - FORT DODGE SANTE ANIMALE
- Page 15* ***Circovirus* du canard (ducv) = Circovirose ?**
Dr Claire JACQUINET - CEVA SANTE ANIMALE
- Page 19* **Bien-être des oiseaux d'élevage en relation avec la croissance osseuse, les problèmes locomoteurs et la nutrition en vitamine D₃**
Elisa FOLEGATTI - DSM NUTRITIONAL PRODUCTS FRANCE
- Page 21* **Etude de la sensibilité de 120 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale*, isolées de dindes atteintes de troubles respiratoires ou locomoteurs, aux cyclines, tétracycline et doxycycline, par détermination de C.M.I. et de diamètres d'inhibition**
Dr Didier DUIVON, Dr Nicolas VILOUX – LABORATOIRE FRANVET
- Page 37* ***Ornithobacterium* en dinde : synthèse et perspectives.**
Dr Pascal PAULET - INTERVET / SCHERING PLOUGH SANTE ANIMALE
- Page 41* **La maladie de la rate marbrée chez la pintade**
Dr Nadine CARIOU - SELVET CONSEIL
- Page 45* **Entérite virale des volailles de chair : Quelle implication des *astrovirus* ?**
Jean-Luc GUERIN, Jean-Yves DOUET et Xavier DUBORD - ENV TOULOUSE, CLINIQUE DES ELEVAGES AVICOLES & PORCINS
- Page 49* **Le botulisme, épidémiologie et risque pour la sante publique**
Dr Michel Robert POPOFF - BACTERIES ANAEROBIES ET TOXINES, INSTITUT PASTEUR, PARIS
- Page 57* **Les botulismes aviaires : données épidémiologiques du RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture)**
Dr Rozenn SOUILLARD, Jean Yves TOUX, Dr Sophie LEBOUQUIN, Virginie MICHEL - AFSSA - UNITE EPIDEMIOLOGIE ET BIEN-ETRE EN AVICULTURE ET CUNICULTURE

- Page 63* **Sensibilité des germes bactériens d'origine aviaire aux antibiotiques : données terrain récentes et évolution**
Dr Jean DELAPORTE et Gilbert INIZAN - BAYER SANTE ANIMALE
- Page 65* **Maintien des coccidiostatiques et histomonostatiques sous la réglementation actuelle des additifs en alimentation animale**
Gilbert LEBAS - LILLY FRANCE-ELANCO
- Page 69* **Etude de la sensibilité à la phénoxyméthylpénicilline (PHENOXYPEN®) de certaines bactéries pathogènes aviaires d'actualité**
Dr Eric BOUSQUET¹, Jean-Louis PINSARD², Damien MARTIN², Annie RESTIF², Dr Jean-Marie WATIER¹ - ¹VIRBAC - ²BIO CHENE VERT
- Page 73* **Les bonnes pratiques vétérinaires pour la gestion du médicament**
Dr Philippe LE COZ - SELVET CONSEIL
- Page 77* **Les entérites chez la volaille : Comment interpréter les approches alternatives ?**
Dieter VANCRAEYNEST, Maja MARIEN, Katelijne SMETS, Fabienne NERAT, Dr Maarten DE GUSSEM - ALPHARMA ANIMAL HEALTH
- Page 83* **L'eau : une approche globale du captage à l'abreuvoir.**
Loïc FULBERT - GDS 53 - Dr Bénédicte ALEXANDRE – COOPHAVET
- Page 89* **Stratégie anticoccidienne : intégrer la vaccination dans les programmes de rotation, un moyen de préserver les résultats technico-économiques**
Dr Anne-Sophie RIVIERE-BERRAUTE - INTERVET-SCHERING PLOUGH SANTE ANIMALE
- Page 97* **Qualification des flores digestives de la dinde**
Dr Jean LEORAT – SELVET CONSEIL
- Page 103* **CEVAC TRANSMUNE® : une nouvelle approche de la vaccination contre la maladie de gumoro.**
Dr Yannick GARDIN, Dr Claire JACQUINET - CEVA SANTE ANIMALE
- Page 111* **Intérêts et limites des différents outils de diagnostic de la maladie de Gumoro**
Dr Christophe DE LANGHE - INTERVET SCHERING PLOUGH SANTE ANIMALE
- Page 117* **Vaccination Marek et Gumoro au couvoir : les apports de VAXXITEK® HVT+IBD.**
Dr Paul MORILLON – MERIAL
- Page 121* **La technologie de la vaccination *in ovo***
Traduction et présentation par Dr Claire BIENER - D'après des publications de Christopher J. WILLIAMS, MS, Ph.D. – EMBREX

Bronchite infectieuse : évolution des souches en Europe et impact de cette évolution sur l'efficacité des vaccins

Dr Anne-Laure LEDOUX
FORT DODGE SANTE ANIMALE

Introduction

La bronchite infectieuse fait partie des pathologies majeures rencontrées chez les poulets depuis les débuts de l'élevage industriel (3). On la retrouve dans la plupart des pays producteurs de volailles et l'Europe n'est pas épargnée. Malgré le développement de vaccins qui contribuent au contrôle des signes cliniques, l'émergence de nouveaux virus sauvages variants conforte le fait que la bronchite infectieuse est une cible mouvante et difficile à maîtriser. Dans un objectif de veille épidémiologique, Fort Dodge Santé Animale a conduit entre 2002 et 2007, en collaboration avec l'université de Liverpool, une étude pan-européenne sur les souches de bronchite infectieuse. Cette étude a permis de mettre en évidence l'apparition et la disparition de nombreuses souches. Cependant, depuis 3 ans une nouvelle souche semble s'être installée durablement sur la quasi-totalité du territoire européen : la souche QX-like. Cette souche étant à l'origine de nombreux cas cliniques, elle a été isolée et utilisée dans des essais vaccination-épreuve virulente afin d'évaluer l'efficacité des vaccins existant aujourd'hui sur le marché européen : Poulvac® IB Primer, Poulvac® IB MM + Ark, vaccin 793 B. Il faut noter que tous ces vaccins ne sont pas disponibles sur le marché français (Annexe 1).

1. Evolution des souches européennes de *coronavirus* aviaires entre 2002 et 2007

Présentation de l'étude

En cas de suspicion de bronchite infectieuse, des écouvillons trachéaux, ou cloacaux ont été effectués dans les lots de poulets, de pondeuses ou de reproductrices. Entre mars 2002 et décembre 2007, Fort Dodge Santé Animale a reçu un total de 5182 prélèvements répartis comme suit par pays.

Tableau 1 : Nombre de prélèvements reçus entre 2002 et 2007 en provenance des différents pays d'Europe. *

* un prélèvement correspond à un élevage

Pays	Nombre de prélèvements
Grande-Bretagne	1886
France	992
Allemagne	877
Pays-Bas	697
Belgique	342
Espagne	187
Autres	201
Total	5182

La méthode utilisée pour détecter la présence d'un *coronavirus* aviaire est la Reverse Transcriptase nested Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) effectuée à l'Université de Liverpool (Grande-Bretagne). Les amorces d'oligonucléotides de *coronavirus* utilisées étaient communes pour toutes les souches connues de virus de la bronchite infectieuse couvrant une région du gène S1. La partie du gène comprise entre les amorces contient la région hypervariable du virus. Cette région est considérée comme conférant les propriétés biologiques spécifiques de chaque sous-type de *coronavirus* (1, 2). Les échantillons positifs ont été séquencés puis les séquences ont été comparées aux souches publiées dans l'objectif de classer les souches d'IBV (Infectious Bronchitis Virus) détectées.

Sur ces 5182 prélèvements testés, 3086 (58%) se sont révélés positifs à la présence d'un *coronavirus* aviaire. La répartition par génotype et par pays est indiquée dans le tableau 2.

Tableau 2 : répartition des génotypes de *coronavirus* aviaire par pays

Pays	793B	Mass	Ital02	QX	D274	Ark	D1466	Total
Nombre de prélèvements	1107	754	330	310	287	200	98	3086
Grande-Bretagne	36%	23%	17%	0%	7%	15%	2%	100 % (1224)
France	56%	23%	6%	13%	1%	0%	1%	100 % (497)
Pays-Bas	28%	28%	1%	21%	16%	0%	6%	100 % (472)
Allemagne	29%	27%	5%	20%	12%	2%	5%	100 % (455)
Belgique	22%	21%	1%	19%	24%	5%	9%	100 % (210)
Espagne	23%	25%	44%	1%	7%	0%	1%	100 % (106)
Autres*	42%	27%	10%	15%	5%	1%	1%	100 % (122)

* Les pays « autres » représentent les pays d'Afrique du Nord, le Moyen-Orient et la zone Europe hors Grande-Bretagne, France, Pays-Bas, Allemagne, Belgique, Espagne

Sur ces 3086 prélèvements positifs, 2126 sont considérés comme souches vaccinales et 960 ont été classés comme souches sauvages.

Souches vaccinales

Du fait de la longue persistance dans l'organisme des *coronavirus* vaccinaux, ils sont retrouvés dans de nombreux prélèvements. En effet, des études ont montré que l'on pouvait retrouver des souches appartenant au groupe 793 B plusieurs semaines voire plusieurs mois après la vaccination (5, 8). Le génotype détecté le plus fréquemment est le variant 793 B (souches 4-91 et CR88) suivi par le virus type Massachusetts (Mass. : groupe comprenant les souches H120 et Mild Massachusetts). Les souches D274 et Arkansas (Ark) sont des souches vaccinales variantes utilisées dans la plupart des pays d'Europe. Vous trouverez en annexe, la répartition des différentes souches vaccinales en fonction des pays.

Souches sauvages

Parmi les souches sauvages, la souche Italian 02 (Ital02) reste la plus fréquente en Grande-Bretagne et en Espagne. Le variant QX-like a fait son apparition en Europe début 2004. Ce nom provient du fait que ce variant présente une grande similarité (> 98%) avec une souche présente dans la base de données des nucléotides NCBI BLAST et nommée QX IBV. Ce *coronavirus* aviaire a été initialement isolé en Chine, et décrit par Wang et al. en 1998 (6). La dénomination QX est restée pour identifier cette souche que l'on retrouve aujourd'hui très fréquemment dans presque tous les pays européens.

Parmi les souches du groupe 793 B, on retrouve la souche FR-94 qu'il est possible d'identifier avec certitude comme souche sauvage. Cependant, du fait de la très grande similitude, au niveau de la partie séquencée, entre les souches vaccinales et les souches sauvages de ce groupe, il est impossible, la plupart du temps, de faire la différence. Certaines souches, séquencées comme 100% homologues avec la souche vaccinale, sont probablement des souches sauvages ; on les

retrouve sur des animaux présentant des signes très évocateurs de bronchite infectieuse qui ne sont parfois pas vaccinés avec une souche 793 B.

La distribution des souches sauvages par pays est présentée dans le tableau ci-dessous (tableau 3).

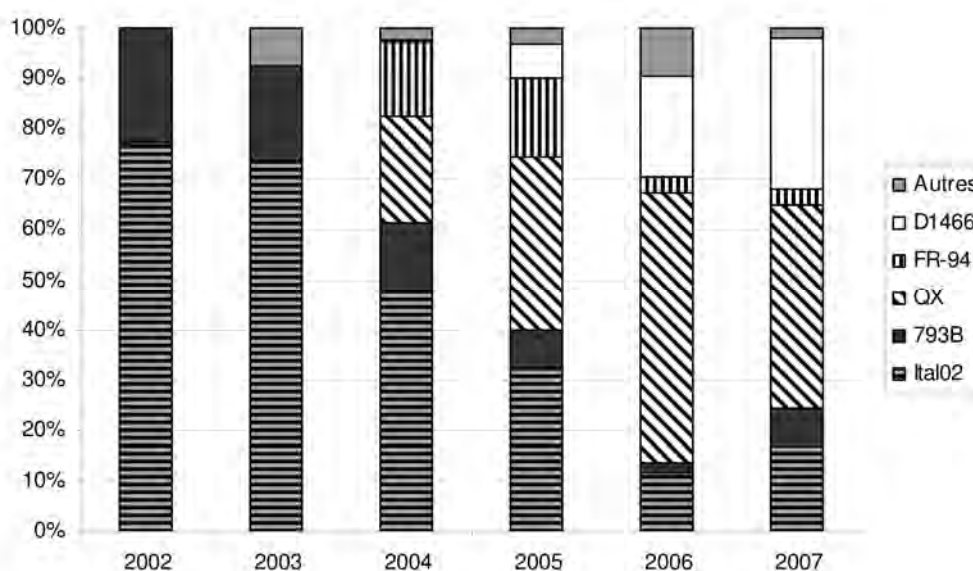
Tableau 3 : Répartition des géotypes de *coronavirus* aviaires sauvages par pays

Pays	793B	FR-94	Ital02	QX	D1466	Autres	Total
Nombre de prélèvements	90	92	330	310	98	40	960
Grande-Bretagne	14%	1%	72%	0%	9%	5%	100% (293)
France	10%	26%	18%	38%	2%	5%	100% (165)
Allemagne	5%	9%	3%	65%	17%	1%	100% (151)
Pays-Bas	10%	9%	12%	53%	14%	2%	100% (171)
Belgique	3%	3%	5%	60%	28%	2%	100% (65)
Espagne	2%	0%	94%	2%	2%	0%	100% (50)
Autres	9%	26%	18%	28%	2%	17%	100% (65)

On peut constater que les souches sauvages isolées sur les écouvillons ont évolué depuis 2002. En effet, la méthode de séquençage utilisée permet de mettre en évidence toutes les souches. Il n'est effectué aucune recherche spécifique mais une analyse des souches présentes. Mis à part les cas où le matériel génétique est en trop petite quantité (ce qui signe une présence plutôt de type vaccinal), les différentes souches sont toutes classées en fonction de leur homologie avec des souches préalablement identifiées.

L'évolution au niveau européen des souches entre 2002 et 2007 est présentée dans le graphe 1, la répartition par pays est présentée en annexe 2.

Graphe 1 : Evolution des géotypes de *coronavirus* aviaires sauvages en Europe entre 2002 et 2007.



Depuis 2004, est apparue une nouvelle souche sauvage, la souche QX et depuis 2005, une souche sauvage connue semble réémerger. En 2007, ces deux souches ont représenté près de 70% des *coronavirus* aviaires sauvages isolés.

Le coronavirus QX

Cette large étude a permis d'identifier la souche QX à travers toute l'Europe, en commençant par les Pays-Bas début 2004. Plus tard durant cette même année, des prélèvements positifs ont été détectés en Allemagne, Belgique et en France.

Cette souche QX a été identifiée, dans la plupart des cas à partir d'écouvillons provenant d'élevages présentant un syndrome respiratoire. Cependant, simultanément à ces découvertes, un syndrome de fausses pondeuses est apparu aux Pays-Bas. Ces fausses pondeuses résultaient de l'infection très précoce des oviductes (4) des poulettes futures pondeuses par une souche que l'Université de Deventer typait sous le nom de D388. Il a été confirmé par la suite que ces deux souches n'en faisaient qu'une.

Virus de la Bronchite infectieuse : D 1466

La souche D1466 est une vieille souche néerlandaise pour laquelle la protection croisée conférée par les vaccins vivants actuels est très faible du fait d'un génotype très différent des autres souches. La pathogénicité de ce *coronavirus* prête à discussion et semble différer selon les souches. Majoritairement retrouvée chez les pondeuses adultes, elle est à l'origine de décoloration d'œufs et de baisse de qualité de la coquille. Cependant, on la retrouve également chez les poulets de chair avec des signes cliniques plus ou moins typiques de bronchite infectieuse, la plupart du temps respiratoires. Les seuls vaccins encore disponibles sur le marché sont inactivés et apportent une bonne protection contre les problèmes chez les pondeuses, même en l'absence d'une primo-vaccination avec un vaccin vivant homologue. Il n'existe aujourd'hui aucun vaccin qui permette de protéger les poulets de chair sachant que les anticorps d'origine maternelle ont une durée de vie trop courte pour apporter une protection correcte.

Il semble cependant que cette souche ne soit pas trop contagieuse même si elle commence à compter dans la part des prélèvements positifs en Belgique, aux Pays-Bas et en Allemagne

2. Efficacité de différents protocoles vaccinaux par rapport à un challenge QX

Suite à l'importance que la souche QX a prise dans le développement de bronchite infectieuse chez les poulets, Fort Dodge Santé Animale a initié des essais pour déterminer si les vaccins vivants existants apportaient une protection contre cette souche (7).

Les vaccins utilisés ont été les suivants :

- Poulvac® IB Primer (contenant une souche D274 modifiée et H120) ;
- Poulvac® IB MM+Ark (contenant des souches modifiées (Massachusetts et Arkansas) ;
- Souche vaccinale de type 793 B.

Protocole

Les essais ont été réalisés à l'Université de Liverpool en accord avec les exigences de la Pharmacopée Européenne.

Des poulets SPF de souche Leghorn blanche ont été vaccinés par goutte dans l'œil selon différents protocoles de vaccination comme indiqué dans le tableau 4.

21 jours après la dernière vaccination, des poulets ont été soumis à une épreuve virulente par goutte dans l'œil avec $10^{3,8}$ EID 50 de la souche L-1148. Cette souche a été isolée aux Pays-Bas en 2004 et a été identifiée comme une souche QX.

Tableau 4 : Conduite de l'étude

Groupe	Vaccinés	Epreuve virulente	Dose d'épreuve /oiseau	Age le jour de l'épreuve	Nombre d'oiseaux
Poulvac® IB Primer à 1 j	OUI	OUI	10 ^{3,8} EID 50	21 jours	20
Poulvac® IBMM+Ark à 1 j	OUI	OUI	10 ^{3,8} EID 50	21 jours	20
Poulvac® IB Primer 1j Poulvac® IBMM+ Ark à 14j	OUI	OUI	10 ^{3,8} EID 50	35 jours	24
Poulvac® IB Primer à 1j Souche vaccinale 793 B à 14 j	OUI	OUI	10 ^{3,8} EID 50	35 jours	23
Non vaccinés – épreuve à 21 j	NON	OUI	10 ^{3,8} EID 50	21 jours	20
Non vaccinés – épreuve à 35 j	NON	OUI	10 ^{3,8} EID 50	35 jours	20
Témoins	NON	NON	-	-	11

Mesure de l'efficacité

A 4, 5 et 6 jours post-épreuve, les poulets ont été sacrifiés et les trachées récupérées pour mesurer le score de ciliostase :

- 10 anneaux de chaque trachée (3 en haut, 4 au milieu et 3 en bas) ont été examinés et le score de ciliostase, noté ;
- zéro (100% de battements) à quatre (0% de battements) ;
- chaque oiseau a un score total possible de 40 (10 anneaux trachéaux x 4) ;
- les scores moyens de chaque groupe ont ensuite été calculés.

Le degré de protection a été calculé avec la formule suivante : $1 - \text{score moyen du groupe vacciné-épruvé} / \text{moyenne du contrôle positif} \times 100\%$

Résultats

Dans le groupe témoin (non vacciné – épruvé), l'activité ciliaire a été considérablement diminuée. Dans les groupes vaccinés, l'activité ciliaire a été moins affectée.

Tableau 5 : Protection apportée par les différents programmes de vaccination

Groupe	Moyenne du score par oiseau (max = 40)	Pourcentage de protection
Poulvac® IB Primer à 1 j	12.2	69 %
Poulvac® IB MM+Ark à 1 j	11.0	72 %
Poulvac® IB Primer 1j Poulvac® IBMM+ Ark à 14j	5,4	87 %
Poulvac® IB Primer Vaccination à 1 j Souche vaccinale 793 B à 14 j	5.0	88 %
Non vaccinés – épreuve à 21 j	39,3	/
Non vaccinés – épreuve à 35 j	39.8	/
Témoins	2,1	/

En conclusion de ces essais, on peut dire qu'il existe une protection croisée entre les vaccins et la souche sauvage QX. Cependant, comme pour tous les *coronavirus* aviaires, cette protection croisée est faible et seule l'association d'un grand nombre de souches vaccinales différentes permet de lutter efficacement contre le QX en l'absence de vaccin spécifique.

Conclusion

Les souches de *coronavirus* à l'origine de la bronchite infectieuse aviaire sont en évolution constante. La pression vaccinale, associée à un fort potentiel de mutation de ces virus, est probablement à l'origine des nombreux variants qui font leur apparition régulièrement dans les élevages. La pratique du séquençage génétique, tel qu'effectué depuis 2002 par Fort Dodge Santé Animale permet de détecter, dès leur apparition, les souches variantes et de suivre leur évolution à travers les différents pays européens. Le travail effectué entre 2002 et 2007 se poursuit et le service reste disponible en 2008.

S'il n'est pas envisageable d'avoir, pour chaque nouvelle souche sauvage, des vaccins homologues, il est en revanche possible de trouver des associations vaccinales permettant d'apporter une protection satisfaisante, dans la mesure où un nombre suffisant de souches vaccinales sont disponibles sur le marché.

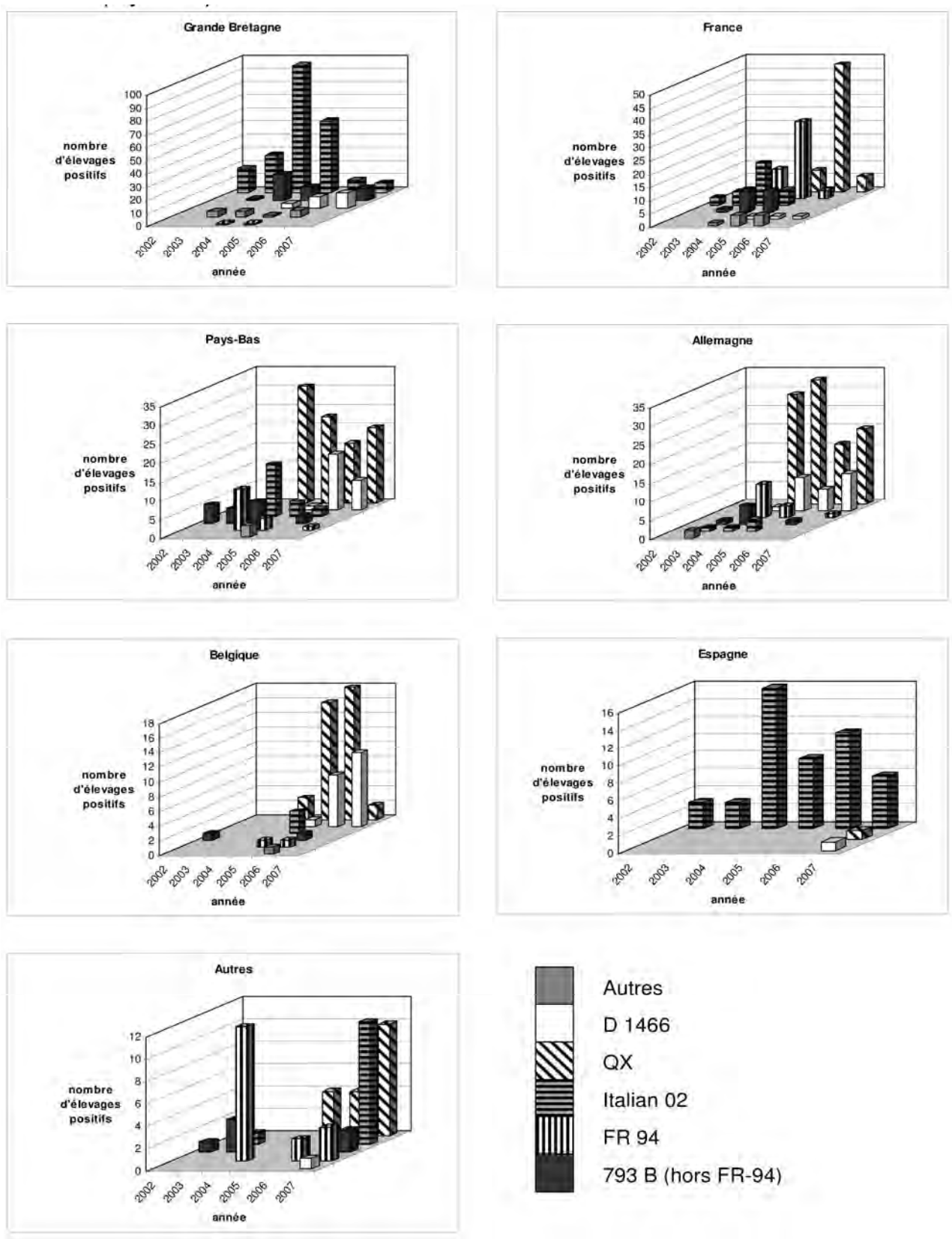
Références

1. Cavanagh,D et al. Virus Res. 1988 Sep ;11 (2) :141-150
2. Cavanagh,D., Naqi,S. in : Diseases of Poultry 11th ed 2003, p 102
3. Cavanagh,D. Vet. Res; 38 (2007) 281-297
4. Landman, W.J.M. et al, 5th Western Poultry Disease Conference 2005, 105-107
5. Nagi, S. et al. Avian Diseases 47 (2003), 594-601
6. Wang,Y.D. et al. Chinese Journal of Animal Quarantine 1998 (15) : 1-3
7. Worthington, K. 2005 et 2006 – essais non publiés
8. Zimmerman,M., Hafez, H.M. WVPA (2001) p264

Annexe 1 : Disponibilité des vaccins en fonction des pays.

Pays	Mass	Poulvac® IB Primer	Poulvac® IB MM + Ark	Souches vaccinales 793B
France	X			X
Grande-Bretagne	X	X	X	X
Allemagne	X	X		X
Pays-Bas	X	X	X	X
Espagne	X	X		X
Belgique	X	X	X	X

Annexe 2 : Evolution des génotypes de *coronavirus* aviaries sauvages entre 2002 et 2007 dans les différents pays européens.



CIRCOVIRUS DU CANARD (DuCV) = CIRCOVIROSE ?

Dr Claire JACQUINET
CEVA SANTE ANIMALE

Introduction

Les *Circovirus* du canard (Duck *Circovirus* = DuCV) sont identifiés régulièrement ces dernières années sur de nombreux prélèvements de canards mulards et barbarie. La méthode PCR désormais accessible en routine rend la mise en évidence de ces virus très facile.

Mais la présence de *Circovirus* n'est pas forcément synonyme de « Circovirose » : comment être sûr que les troubles observés dans un lot sont attribuables au *Circovirus* ?

Que savons-nous des *Circovirus* du canard (DuCV)?

Les *Circovirus* sont des virus non-enveloppés, composés d'un mono-brin d'ADN circulaire. Ce sont les plus petits virus connus chez les animaux (14-19 nm). Les infections par les *Circovirus* sont bien connues dans différentes espèces, mammifères ou oiseaux (Psittacidés : virus de la maladie du bec et des plumes (PBFDV), Poulet : virus de l'anémie infectieuse (CIAV), Pigeon : infection à *Circovirus* du pigeon (PCI), Porc : *Circovirus* porcin (PCV1&2), autres oiseaux : colombes, canaris, fringillidés (pinsons), oie (GoCV), canard (DuCV) : isolés plus récemment).

Les infections à *Circovirus* ont des caractéristiques communes chez les différentes espèces aviaires :

- elles sont décrites chez les jeunes animaux, pendant les 2 premiers mois de vie,
- les principaux signes cliniques sont des troubles de croissance et de l'emplumement,
- en raison des lésions des tissus lymphoréticulaires, les fonctions immunitaires cellulaires et humorale peuvent être altérées.
- l'immunodépression augmente la pathogénicité des agents de co-infection.

Le *Circovirus* du canard (DuCV) est distinct des autres *Circovirus*, sur la base de l'analyse phylogénétique. Il est cependant plus proche des *Circovirus* de l'oie que des autres *Circovirus* aviaires.

Les *Circovirus* ont en commun l'envahissement du tissu lymphoïde qui peut entraîner une immuno-dépression.

Les inclusions intracytoplasmiques (corps botryoïdes) sont présentes dans les macrophages des organes lymphoïdes (Bourse de Fabricius, thymus, moelle osseuse, rate), bec, palais, oesophage, jabot, langue, glande parathyroïde, foie (cellules de Kupffer), intestin, rate, glande thyroïde, glandes surrénales, pancréas, et la base des griffes.

Les inclusions intranucléaires sont présentes dans les cellules épithéliales de l'intestin, du bec, du palais, de l'oesophage, du jabot, à la base des griffes et dans l'épithélium testiculaire germinal.

L'examen histopathologique de la Bourse de Fabricius (BF) révèle une dépression lymphocytaire, une nécrose et une histiocytose. La présence de corps botryoïdes intracytoplasmiques, typiques des infections à *circovirus*, est moins systématique chez le canard que chez l'oie.

Quelle est la pathogénie des *Circovirus* du canard ?

A ce jour, on ne connaît pas la réelle pathogénicité du *Circovirus* du canard, et il reste encore beaucoup de travaux pour en comprendre le rôle en élevage et les mécanismes d'infection. La reproduction expérimentale n'a, à ce jour, été faite que chez l'oie. Par ailleurs, il n'est pas rare de détecter des *Circovirus* sur des canards apparemment sains.

Quand suspecter une infection par les *Circovirus* du canard ?

Généralement, les recherches de *Circovirus* en PCR sont demandées pour des lots au tableau clinique et lésionnel complexe, immunodépression, retards de croissance (mauvais état corporel), troubles de l'emplumement, infections intercurrentes (Parvovirus, Derzsy), lors de récurrences après traitements, lors d'échecs vaccinaux, lors de dégradation des performances, et sans que l'on puisse attribuer ces signes à une autre pathologie connue.

En l'absence de tests sérologiques, la PCR s'est avérée être une méthode spécifique et sensible pour diagnostiquer des infections aviaires à *Circovirus*. Cependant, sa capacité à détecter l'ADN du *Circovirus* chez des oiseaux cliniquement sains, suggère que, si la PCR peut être utile pour diagnostiquer une infection à *Circovirus*, elle est sans doute trop sensible pour permettre à elle seule de diagnostiquer la maladie. La quantification n'est pas encore corrélée à la pathogénie.

Le diagnostic de l'infection à *Circovirus* du canard sera supporté par :

- mise en évidence du *Circovirus* dans la rate ou la Bourse de Fabricius
- lésions caractéristiques de la BF visibles par histologie : différents degrés de déplétion lymphocytaire, dégénérescence vacuolaire (lymphocytolyse), nécrose et histiocytose (photo 1 et 2).

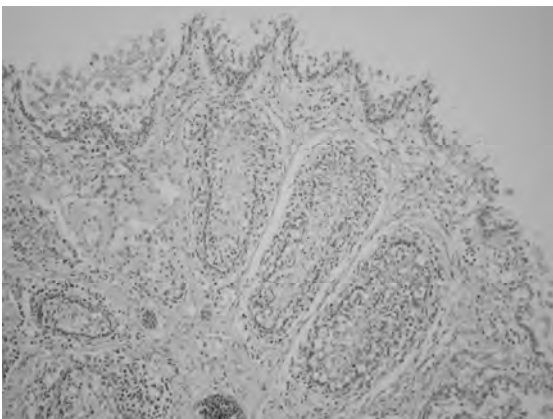


Photo 1

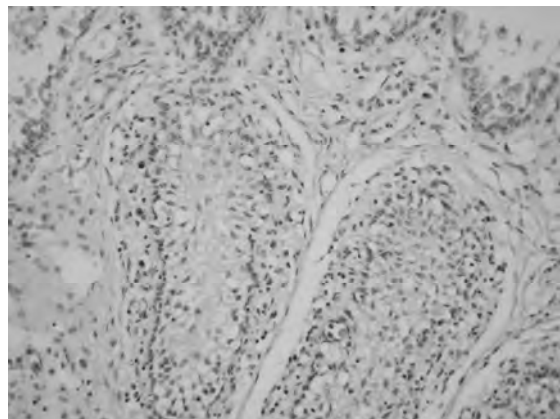


Photo 2

Conclusion

Les infections à *Circovirus* semblent très fréquentes dans les élevages de canards. L'évolution et la gravité de l'infection à *Circovirus* pourraient dépendre des infections concomitantes dans le lot de canards. L'hypothèse selon laquelle l'infection subclinique à *Circovirus*, dans les élevages de volailles, entraîne des pertes économiques, suite à la dégradation des performances de croissance, reste encore à démontrer.

Références

HATT ERMANN, K. SCHMITT, C., SOIKE, D. and MANKERTZ, A. (2003). Cloning and sequencing of Duck *Circovirus* (DuCV). *Archives of Virology*, 148, 2471-2480

SOIKE, D., KOHLER, B. and ALBRECHT, K. (1999). A *Circovirus*-like infection in geese related to a runting syndrome. *Avian Pathology*, 28, 199-202.

TODD, D. (2000). *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. *Avian Pathology*, 29, 373-394.

VAN DE PEER, Y. and DE WACHER, R. (1994). TREECON for Windows: a software package for construction and drawing of evolutionary trees for the MS Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 569-570.

Bien-être des oiseaux d'élevage en relation avec la croissance osseuse, les problèmes locomoteurs et la nutrition en vitamine D₃

Elisa FOLEGATTI
DSM NUTRITIONAL PRODUCTS FRANCE

Le bien-être des animaux est un sujet qui touche les éleveurs, les techniciens, les vétérinaires et les chercheurs. Il est une préoccupation particulière des consommateurs qui prennent soin de leur santé et amalgament l'idée d'une alimentation sûre avec un animal produit avec humanité.

Les états européens traitent des sujets de protection des animaux en adoptant différentes stratégies et plans de surveillance. Pour ces raisons, il est important de normaliser les techniques d'élevage ou au moins d'uniformiser les mesures qui doivent être prises. Ces dernières années, la Commission Européenne a édité des rapports et propositions (Proposition COM (2005) 221 final et Directive du Conseil 2007/43/EC "règles minimales pour la protection des poulets destinés à la production de viande") dans le but de fixer des règles pour quantifier, mesurer et assurer le bien-être des animaux. Les caractéristiques de logement, la densité d'élevage, le taux de mortalité et les lésions des pattes sont les paramètres principaux considérés dans ces rapports.

Les désordres squelettiques, par suite à la pression intense de sélection de plusieurs années pour la croissance rapide à laquelle ces animaux ont été soumis, ont des effets négatifs sur le bien-être des poulets et sur les performances économiques en raison de leur chronicité, leur tendance à réduire la prise alimentaire et la fréquence des saisies et des déclassés. La sélection génétique a considérablement amélioré les performances et les rendements en viande des poulets notamment à l'égard du développement du muscle du filet. Les poulets actuels sont caractérisés par un développement anormal du filet et par une calcification fragile du squelette, dont le poids est tiré vers le bas par une croissance rapide des muscles.

Le taux de développement osseux ne convient pas aux vitesses de croissance rapides des poulets modernes. Les maxima de la densité osseuse et de la résistance à la rupture ne sont pas atteints avant 35 semaines d'âge, bien après que les oiseaux aient été mis sur le marché (Rath et coll., 2000). En raison de leur vitesse de croissance plus rapide, la maturité squelettique des oiseaux au moment de l'abattage est moins élevée que dans le passé, de ce fait augmentant l'incidence des "os noirs".

Le syndrome de décoloration de "l'os noir" (Black bone syndrom) est dû à la migration du colorant et du sang de la moelle des os longs vers les tissus environnant, les souillant ainsi pendant les phases de transformation et de cuisson. Si le problème des poulets modernes est dû à la fuite de la moelle des colorants et/ou de la myoglobine des os en raison de leur porosité, il est possible que la viande affectée soit plus sensible aux dommages oxydants et donc que sa durée de conservation soit réduite.

La croissance rapide a comme conséquence des défauts de formation squelettique comme la faiblesse de pattes, et qui ont comme conséquence des boiteries et un bien-être altéré (Sanotra et coll., 2001).

Les oiseaux producteurs d'oeufs sont eux aussi affectés par des désordres squelettiques. Les problèmes squelettiques des pondeuses constituent un défi de taille en matières de bien-être et de santé ainsi qu'un défi économique pour la filière volaille. Un des principaux problèmes est la perte d'os

structurel liée à l'ostéoporose. Cette perte est très fréquente et entraîne une incidence élevée des fractures à divers niveaux du squelette, avec une moyenne de 34% d'oiseaux montrant des os fraîchement cassés à l'abattage. La perte d'os structurel et le développement de l'ostéoporose des pondeuses pourraient être liés à la transformation permanente de l'os médullaire, qui sert de source principale de calcium pour la formation de la coquille d'oeuf. La formation de cet os poreux se produit à la maturité sexuelle de la poule quand le niveau d'oestrogène augmente. Pendant la période de production d'oeufs, la teneur de l'os médullaire augmente aux dépens de l'os cortical qui devient de plus en plus fin. Cette situation aboutit à diminuer la production d'oeufs, quantitativement et qualitativement, tout en augmentant la mortalité des poules.

Les désordres métaboliques du tissu osseux sont d'origine multifactorielle et peuvent être influencés non seulement par la génétique mais également par la conduite d'élevage, l'environnement et la nutrition.

Les régimes enrichis avec vitamine D₃ et ses métabolites peuvent influencer positivement la croissance et la minéralisation squelettique des oiseaux, en raison du rôle important de la vitamine D₃ dans le métabolisme phospho-calcique (absorption intestinale par la synthèse de la *Calcium Binding Protein*, réabsorption dans le rein, turn-over osseux).

La vitamine D₃ est synthétisée à partir du 7-déhydrocholestérol dans la peau exposée à l'irradiation ultra-violette. La dépendance à l'égard de l'irradiation ultra-violette limite la synthèse de D₃ aux secteurs de la peau sans plume, ce qui signifie que chez les oiseaux lourds souvent assis sur la litière et élevés dans des logements habituellement sans fenêtre, cette conversion ne se produit pas correctement. Le 25-hydroxycholécalférol (25-OH-D₃) est le premier métabolite de la vitamine D. La 25-hydroxylation de la vitamine D se produit dans le foie d'où le produit est transporté par les protéines de transport spécifiques. Une nouvelle hydroxylation se produit dans le rein vers le 1,25-dihydroxycholécalférol (1,25-(OH)₂D₃) ou le 24,25-dihydroxycholécalférol (24,25-(OH)₂D₃). Fournir au poussin le 25-OH-D₃ pour lui permettre d'être aisément disponible pour la conversion en 1,25-(OH)₂D₃, offre donc le potentiel d'augmenter les fonctions que les métabolites de la vitamine D remplissent dans le corps.

La 25-OH-D₃ est le seul métabolite de la vitamine D₃ qui a reçu le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) dans l'alimentation des volailles. Actuellement, la 25-OH-D₃ est disponible sous la marque Hy•D®.

La 25-OH-D₃ s'est avéré plus active que la D₃, d'un point de vue métabolique, particulièrement quand les oiseaux sont élevés dans des conditions stressantes et sans lumière du soleil dans les élevages. Un régime enrichi avec ce métabolite semble réduire, sur le terrain, l'incidence du rachitisme et de la dyschondroplasie tibiale (TD), qui sont toujours observés dans des situations commerciales avec poulets et dindes lourds à croissance rapide. Les études précédentes ont également montré qu'avec la 25-OH-D₃ le poids corporel, l'efficacité alimentaire et le rendement filet étaient augmentés en comparaison de la vitamine D₃.

Chez les pondeuses, l'utilisation alimentaire de la 25-OH-D₃, améliore la solidité des os. Des études ont montré que les poules alimentées avec Hy•D® ont préférentiellement utilisé l'os médullaire pour soutenir la formation d'un nombre plus élevés d'oeufs avec une bonne coquille, plutôt qu'à l'aide de l'os cortical, réduisant ainsi la fatigue de cage à la fin du cycle de production, la mortalité et donc augmentant le bien-être. Un meilleur statut osseux affecte également la qualité de la production d'oeufs, telle que l'épaisseur de coquille d'oeuf, et réduit le pourcentage de déformation de la coquille.

Etude de la sensibilité de 120 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale*, isolées de dindes atteintes de troubles respiratoires ou locomoteurs, aux cyclines, tétracycline et doxycycline, par détermination de C.M.I. et de diamètres d'inhibition

Dr Didier DUIVON, Dr Nicolas VILOUX
LABORATOIRE FRANVET

I- MATERIELS ET METHODES

I-1- Souches utilisées

I-1-1- Souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale*

Les souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* issues des collections de Selvet Conseil - Bignan et de BioChêne-vert, ont été retenues parmi les 376 souches isolées du 1^{er} janvier 2006 au 2 avril 2007 dans l'ouest de la France, sur des dindes présentant des troubles respiratoires, locomoteurs, ou respiratoires et locomoteurs, d'après les critères suivants :

- un premier tri a été réalisé en ne conservant que les souches qui ont poussé en atmosphère normale lors du diagnostic,
- puis le choix s'est porté sur les diamètres des zones d'inhibition pour la tétracycline, afin d'avoir une large gamme de diamètres et une répartition assez homogène des souches dans cette gamme,
- enfin, pour un même diamètre d'inhibition, les souches ont été choisies pour être accompagnées de commémoratifs et pour avoir été isolées d'organes différents.

I-1-2- Souches de référence

Au cours de chaque manipulation des souches de référence sont utilisées comme témoins : une souche d'*Escherichia coli*, ATCC[®] 25 922 et une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale*, ATCC[®] 51 463. Le tableau I indique les valeurs de référence de ces souches pour les 2 antibiotiques testés :

- Diamètre d'inhibition par la méthode de l'antibiogramme
- CMI en milieu gélosé
- CMI par le Etest

Tableau I : Valeur de CMI et de diamètres d'inhibition pour les 2 souches de référence utilisées comme témoin. (NCCLS, AB BIODISK, Etest® technical guide 3B).

	<i>E coli</i> ATCC® 25 922		<i>O rhinotracheale</i> ATCC® 51 463	
	Tétracycline	Doxycycline	Tétracycline	Doxycycline
CMI Ettest (µg/mL)	0,5-2	0,5-2		
CMI en milieu gélosé (µg/mL)	0,5-2	0,5-2	Il n'existe pas de valeurs de référence pour cette souche	
Diamètre d'inhibition (mm), charge du disque : 30µg	18-25	18-25		

I-2- Préparation des inoculums

Pour tester leur sensibilité aux cyclines, les souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* doivent être décongelées et remises en culture afin de préparer des suspensions bactériennes de concentration connue. Elles serviront à ensemercer les géloses utilisées dans les différents procédés mis en œuvre par la suite.

I-2-1- Préparation des inoculums d'*Ornithobacterium rhinotracheale*

Préparation des souches

Chacune des souches bactériennes était conservée dans un bouillon nutritif glycérolé, dans un micro tube de 1mL placé au congélateur à -20°C. Le micro tube est sorti quelques minutes du congélateur. Dans le cône de stérilité du bec Bünzen, l'extrémité d'une pipette stérile est plongée dans le micro tube pour prélever une goutte de suspension bactérienne servant à ensemercer une gélose (base sang avec 5% de sang de mouton), incubée 48h à 37°C. La culture ainsi obtenue constitue la semence d'essai. Deux passages sont ensuite nécessaires afin de s'assurer d'une culture pure parfaitement revivifiée à partir de laquelle sont réalisées les suspensions bactériennes.

Vingt cinq souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* sont décongelées pour chaque « manip » afin d'être certain de pouvoir en évaluer 18 à chaque série.

Préparation des suspensions bactériennes

Pour chaque souche testée, 4 à 5 colonies de même morphologie et bien isolées sont prélevées avec un écouvillon et transférées dans un tube de bouillon de tryptone-sel. La densité optique (DO) à 620nm des suspensions bactériennes est mesurée par spectrophotométrie à chaque manipulation. On recherche une DO de 0,110 à 0,120, ce qui correspond à une concentration de 10⁸ UFC/mL.

Dénombrements de contrôle

Pour chaque série, des dénombrements de contrôle sont réalisés sur quatre suspensions bactériennes afin de vérifier la qualité des souches et des suspensions bactériennes réalisées.

I-2-2- Préparation des inoculums des souches de référence

Pour la souche de référence *Escherichia coli* ATCC®25 922, une gélose avec 5% de sang de mouton est ensemercée et incubée 24h à 37°C, la culture obtenue constitue la semence d'essai. On effectue deux ou trois passages avant la réalisation des manipulations.

La souche ATCC®51 463 est préparée de la même manière que les souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* testées.

I-3- Détermination de sensibilité aux antibiotiques par diffusion

I-3-1- Choix des disques et des Etests

Les disques de tétracycline et doxycycline utilisés sont fabriqués par la société BIORAD® et sont chargés à 30 µg pour la Tétracycline et 30 µg pour la Doxycycline. Les bandes de Etest sont fabriquées par la société AB BIODISK®.

I-3-2- Ensemencement

Pour chaque souche, 2 boîtes de Pétri (gélose base sang avec 5% de sang de mouton de diamètre 90 mm) sont ensemencées par écouvillonnage d'une suspension bactérienne à 10⁸ bactéries / mL, une pour la tétracycline et une pour la doxycycline.

I-3-3- Dépose des disques et des Etests

Pour les souches dont les diamètres d'inhibition des disques attendus sont faibles, un disque de tétracycline et une bande Etest tétracycline sont appliqués à la surface de la gélose en suivant la procédure décrite par le fabricant. Puis, on procède de la même manière pour la doxycycline.

Afin de prévenir les risques de chevauchement des zones d'inhibition des disques et des Etests pour les souches dont les diamètres d'inhibition attendus des disques sont élevés, les disques d'antibiotiques et les Etests sont placés dans deux boîtes de Pétri différentes.

I-3-4- Incubation

Les boîtes de Pétri sont incubées 48h à 37°C en atmosphère normale. Deux lectures sont effectuées, la première à 24h et la seconde à 48h.

I-4- Détermination des CMI par dilution en milieu gélosé

I-4-1- Préparation des solutions de Tétracycline et de Doxycycline

Les molécules antibiotiques utilisées pour la détermination des CMI en milieu gélosé proviennent du laboratoire Merial®. La tétracycline se présente sous forme de chlorhydrate et la doxycycline sous forme d'hyclate.

Afin d'obtenir une solution mère d'antibiotique à 5120mg/L, nous diluons 2817,3mg de chlorhydrate de tétracycline dans 500 mL d'eau déminéralisée et 2992,6mg d'hyclate de doxycycline dans 500 mL d'eau déminéralisée. La pesée des produits tient compte du sel et de sa pureté. Les solutions mères ainsi obtenues sont ensuite stérilisées par filtration stérilisante sur membrane de 0,45 µm.

Ensuite, un schéma de dilution de raison 2 est utilisé à partir des solutions mères à 5120mg/L. La technique utilisée et les concentrations finales obtenues sont indiquées dans le tableau II. Afin de ne pas tester toute la gamme de dilution, les gammes de dilution testées sont adaptées aux diamètres d'inhibition connus pour la souche grâce aux commémoratifs.

I-4-2- Préparation des milieux gélosés

Les géloses sont préparées à partir de 17 mL de gélose base sang de mouton, liquide maintenue en surfusion dans un bain-marie à 48-50°C, additionnée de 1 mL de sang de mouton (concentration de 5%) et de 2 mL de chacune des dilutions d'antibiotiques. Après avoir parfaitement homogénéisé la gélose et les différentes concentrations d'antibiotiques, ce mélange est versé le plus rapidement possible dans les boîtes afin d'éviter le refroidissement et la solidification partielle dans le bécher, la gélose faisant environ 4 mm de profondeur. Les boîtes de Pétri sont ensuite laissées à température ambiante pour permettre la solidification de la gélose.

Les boîtes sont ensuite stockées entre 2 et 8°C et doivent être utilisées dans les 5 jours. La stabilité des géloses sera ensuite évaluée à l'aide des souches de références, afin de s'assurer de la non détérioration des antibiotiques. Avant utilisation les boîtes seront placées à température ambiante et leur surface devra être sèche.

Deux boîtes de Pétri sont préparées par dilution, ainsi que deux boîtes témoins contenant 2 mL d'eau déminéralisée, 1 mL de sang de mouton et 17 mL de gélose base sang de mouton.

I-4-3- Inoculation des souches et incubation

Les suspensions bactériennes sont diluées au dixième afin d'obtenir des suspensions à 10^7 UFC/mL, puis un aliquote des suspensions de chaque souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* et des souches de référence est placé dans les puits correspondant dans le multi inoculateur. Les souches sont ensuite inoculées sur les géloses. Chaque tige du multi inoculateur délivre environ 1µL, soit environ 10^4 bactéries par dépôt. Les boîtes sont inoculées des concentrations les plus faibles aux plus élevées. Une boîte témoin sans antibiotique estensemencée en début et fin d'inoculation pour s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination ni par les souches ni par les solutions d'antibiotiques.

Vingt souches sont inoculées dans chaque boîte : les deux souches de référence, *E coli* ATCC®25 922 et la souche *Ornithobacterium rhinotracheale* ATCC® 51 463, ainsi que 18 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* à tester.

Les géloses inoculées sont laissées à température ambiante 15 minutes jusqu'à ce que l'humidité des points d'inoculation soit absorbée par la gélose, les boîtes sont ensuite retournées puis incubées pendant 48 heures, à 37°C, en atmosphère normale.

Tableau II : Préparation des gammes de dilutions de tétracycline et de doxycycline.

Solution mère d'antibiotique (mg/L)	Quantité de solution mère à prélever (mL)	Eau (mL)	Titre obtenu (mg/L)	Concentration finale* dans le milieu (mg/L)
5120	5	0	5120	512
	5	5	2560	256
	2	6	1280	128
	1	7	640	64
	1	15	320	32
320	5	5	160	16
	2	6	80	8
	1	7	40	4
	1	15	20	2
20	5	5	10	1
	2	6	5	0,5
	1	7	2,5	0,25
	0,5	7,5	1,25	0,125
1,25	5	5	0,6	0,06
	2	6	0,3	0,03
	1	7	0,15	0,015

*concentration finale sachant que l'on ajoute 2 ml de la gamme à 18 ml de milieu gélosé

I-4-4- Lecture

Deux lectures sont réalisées, la première à 24 heures (indispensable pour la souche *E coli* ATCC®25 922) et la deuxième à 48 heures. Pour la lecture, les boîtes sont placées sur une surface noire, non-réfléchissante et observées visuellement. On retient pour CMI la concentration minimale d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas ou presque pas de culture bactérienne visible, c'est-à-dire en ne tenant pas compte d'1 à 3 colonies ou d'un faible voile causé par l'inoculum.

La manipulation sera répétée s'il n'y a aucune formation de colonies aux concentrations les plus faibles mais une croissance aux concentrations plus élevées.

I-5- Analyse des données

I-5-1- Méthode de l'antibiogramme

Les variables étudiées grâce à l'antibiogramme sont :

- le diamètre d'inhibition pour la tétracycline,
- le diamètre d'inhibition pour la doxycycline.

I-5-2- Méthodes de détermination de la CMI

La variable étudiée pour chacune des méthodes de détermination de la CMI, et pour chaque antibiotique est : la concentration minimale d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de culture bactérienne visible, variable quantitative. En cas de divergence lors de la détermination de CMI, la valeur la plus élevée est retenue. Cependant si l'écart entre les deux valeurs de CMI relevées est supérieur ou égal à 2 dilutions, la souche est exclue et testée à nouveau ultérieurement.

I-5-3- Mise en relation des CMI et des diamètres d'inhibition

➤ Régression linéaire entre diamètre d'inhibition et CMI

Une droite de concordance est obtenue par régression linéaire entre le diamètre d'inhibition (diam) et le logarithme en base 2 (\log_2) de la CMI. Cette droite est déterminée pour chacune des méthodes de détermination de la CMI.

La Société Française de Microbiologie propose des valeurs de CMI critiques pour les tétracyclines, délimitant les catégories résistante, intermédiaire et sensible. Celles-ci sont présentées dans le tableau III. Le report de celles-ci sur la droite de concordance permet de déterminer les diamètres critiques (d et D) qui constituent les bornes de la catégorisation dans les catégories Sensible, Intermédiaire, Résistante utilisées pour l'interprétation des antibiogrammes. La droite de la Société Française de Microbiologie, dont l'équation est :

Diam = - 2 x \log_2 (CMI) + 23, fournit des diamètres critiques suivant :

- **d** = 17 mm
- **D** = 19 mm

Tableau III : Catégorisation des Pasteurellaceae vis-à-vis des tétracyclines (CA-SFM, groupe de travail : antibiogramme vétérinaire, 2007a).

Catégorie	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Diamètre d'inhibition (diam) (mm)
Sensible	$\text{CMI} \leq 4$	$\text{diam} \geq 19$
Intermédiaire	$4 < \text{CMI} \leq 8$	$17 \leq \text{diam} < 19$
Résistant	$\text{CMI} > 8$	$\text{diam} < 17$

➤ Comparaison des 2 droites de régression linéaire obtenues

Pour chaque étude nous souhaitons savoir si la droite obtenue est différente de la droite du CA-SFM. Ainsi, pour chaque valeur de CMI obtenue dans notre étude, nous calculerons la différence (Δ) entre le diamètre des zones d'inhibition correspondant, mesuré dans la méthode des disques et le diamètre obtenu grâce à la droite de régression du CA-SFM pour ces mêmes valeurs de CMI. Nous réaliserons ensuite une régression linéaire entre la CMI et la différence de diamètre Δ , afin de mettre en évidence une éventuelle différence entre la droite de régression du CA-SFM et la droite obtenue dans notre étude. Si l'ordonnée à l'origine et la pente de la régression entre la CMI et la différence de diamètre Δ sont significativement différentes de zéro, nous pourrions conclure à une différence des deux droites.

Sur le même principe, pour les deux molécules considérées, nous comparerons entre elles les deux droites de concordance obtenues dans notre étude selon la méthode de détermination de la CMI. Nous réalisons ainsi une régression linéaire entre le diamètre d'inhibition et la différence (Δ') entre les CMI obtenues grâce aux deux méthodes. Si l'ordonnée à l'origine et la pente de la régression entre le diamètre des zones d'inhibition et la différence de CMI Δ' sont significativement différentes de zéro, nous pourrions conclure à une différence des deux droites.

Ces comparaisons de droite seront réalisées à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis System), par analyse de régression linéaire.

I-5-4- Application des diamètres critiques de cette étude à un large échantillon de souches d'ORT terrain

Nous disposons en archive des diamètres d'inhibition vis à vis de tétracycline et doxycycline pour les 376 souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* issues des collections de Selvet Conseil - Bignan et de BioChêne-vert, isolées du 1^{er} janvier 2006 au 2 avril 2007 dans l'ouest de la France, sur des dindes présentant des troubles respiratoires, locomoteurs, ou respiratoires et locomoteurs. Nous avons catégorisé 365 souches « Résistante, Intermédiaire ou Sensible » à l'aide des diamètres critiques :

- soit proposés par le CA-SFM
- soit issus des résultats de cette étude.

Ceci donne une idée de l'impact concret des résultats de cette étude sur l'indication de l'Oxytétracycline et de la Doxycycline dans le traitement des infections à *Ornithobacterium rhinotracheale* chez la dinde. En effet, les praticiens prescrivent ces molécules lorsqu'elles sont classées « sensible » par un antibiogramme.

II- RESULTATS

II-1- Validation du protocole et taille des échantillons

II-1-1- Concentration des suspensions bactériennes

La concentration des suspensions bactériennes était ajustée par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm. Dans un premier temps, la DO des suspensions était ajustée à 0,11 ou 0,12 ce qui correspond d'après les tables à une concentration en *ORT* de 10^8 UFC/mL. Cependant, les premiers dénombrements de contrôle indiquaient que la concentration des suspensions préparées était plutôt de l'ordre de 10^7 UFC/mL, ce qui induisait un inoculum plus faible que l'indique les recommandations pour le multi inoculateur, ce qui peut expliquer les difficultés de lecture parfois rencontrées. Par conséquent, les densités optiques recherchées ont été rehaussées à environ 0,20 à partir de la série 6 afin d'améliorer la qualité des inoculums et de faciliter la lecture des résultats.

II-1-2- Valeurs des souches de références

Les valeurs de CMI et de diamètres d'inhibition obtenues pour la souche ATCC® 25 922 sont présentées dans le tableau IV. Celles-ci correspondent aux valeurs attendues pour la plupart des séries. La CMI Etest pour la doxycycline est inférieure à la valeur attendue pour la série 1 ; ceci peut être lié à une mauvaise application de la bandelette Etest. Celle-ci étant toutefois proche des valeurs attendues, nous avons décidé de valider cette série. Pour la série 5, aucune valeur de CMI en milieu gélosé n'est disponible pour les souches témoins, et n'ayant aucune certitude sur les raisons de cette anomalie, nous avons décidé d'exclure la série 5 de l'étude des CMI en milieu gélosé. Enfin, les diamètres d'inhibition obtenus pour la tétracycline et la doxycycline correspondent également aux valeurs attendues.

Les valeurs de CMI et de diamètres d'inhibition obtenues pour la souche ATCC®51 463 sont présentées dans le tableau V. Nous ne disposons pas de valeurs de référence pour cette souche, néanmoins, les valeurs obtenues pour les différentes séries sont relativement constantes :

- comprise entre 0,125 et 0,25 mg/L en milieu gélosé et 0,094 et 0,25 mg/L en Etest pour la tétracycline,
- comprise entre 0,06 et 0,25 mg/L en milieu gélosé et 0,047 et 0,38 mg/L en Etest pour la doxycycline.

Enfin, les diamètres d'inhibition obtenus pour la tétracycline oscillent entre 30 et 40 mm. Pour la doxycycline, les diamètres obtenus sont comparables à l'exception de la série 6 pour laquelle il est de 22 mm. Cette valeur peut être imputable à un défaut d'application du disque sur la gélose.

Notons, que les CMI Etest et les diamètres d'inhibition n'ont pas été déterminés pour les séries 8, 9 et 10, pour les souches de références, par souci d'économie, pour que toutes les souches d'*Ornithobacterium rhinotracheale* soient testées avec des disques et des Etests issus du même lot de fabrication.

Tableau IV : CMI et diamètres d'inhibition de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 pour la tétracycline (Te) et la doxycycline (Do) ; valeurs obtenues au cours de l'étude et valeurs attendues.

Numéro de la série	CMI en milieu gélosé (mg/L)			CMI Etest (mg/L)			Diamètre d'inhibition (mm)		
	Te	Do	Attendue	Te	Do	Attendue	Te	Do	Attendu
1	1	0,5		1	0,25		22,5	22	
2	1	0,5		1,5	1		20	20	
3	1	0,5		1,5	0,75		22	20	
4	1	0,5		1,5	0,5		22	21	
5				1,5	1		24	21	
6	1	0,5	0,5-2	1,5	0,75	0,5-2	21	21	18-25
7	1	0,5		1	0,5		25	21	
8	1	0,5							
9	1	0,5							
10	1	0,5							

Tableau V : CMI et diamètres d'inhibition de la souche *Ornithobacterium rhinotracheale* ATCC 51 463 pour la tétracycline (Te) et la doxycycline (Do) ; valeurs obtenues au cours de l'étude et valeurs attendues.

Numéro de la série	CMI en milieu gélosé (mg/L)			CMI Etest (mg/L)			Diamètre d'inhibition (mm)		
	Te	Do	Attendue	Te	Do	Attendue	Te	Do	Attendu
1	0,25	0,25		0,125	0,094		35,5	35	
2	0,25	0,125		0,38	0,125		30	31	
3	0,25	0,06		0,25	0,094		35	31	
4	0,25	0,125	Pas de	0,125	0,064	Pas de	35	33	Pas de
5			valeurs	0,094	0,047	valeurs	40	40	valeurs
6	0,125	0,125	de	0,25	0,38	de	31	22	de
7	0,125	0,06	référence	0,25	0,094	référence	33	30	référence
8	0,25	0,125							
9	0,25	0,125							
10	0,125	0,25							

II-1-3- Tailles des échantillons

Le tableau VI récapitule le nombre de souches exclues pour chaque molécule. Les motifs d'exclusion des souches sont les suivants :

- souches appartenant à la série 5 : pour les raisons énoncées plus haut;
- souches n'ayant pas poussé ou trop faiblement ;
- souches dont l'écart entre 2 valeurs de CMI était supérieur ou égal à 2 dilutions : dans ce cas les souches ont été retestées ultérieurement ;
- discordance dans la détermination des CMI : lorsqu'une souche était sensible avec une méthode et résistante avec une autre selon les critères du Comité de l'Antibiogramme, nous avons considéré qu'il y avait une discordance dans la détermination de la sensibilité de la souche aux antibiotiques en question. Ces souches ont alors été réévaluées. Lorsque la discordance ne concernait qu'une des deux molécules, la souche était le plus souvent retestée pour les 2 molécules pour des raisons de simplification du travail. Ceci explique que certaines souches aient été testées 2 fois pour une molécule et ont données les mêmes valeurs ou des valeurs proches. Dans ce cas, la première était considérée comme valide et la seconde exclue ;

- souches n'ayant pas poussé pour une des deux molécules : leur valeur étant potentiellement intéressante pour affiner la courbe, elle ont été retestée, une seule valeur a donc été retenue ;
- souches dont l'inoculum était contaminé ;
- souches testées à deux reprises sans motif apparent.

Tableau VI : Récapitulatif des souches exclues des résultats finaux pour chacune des méthodes.

Motif	CMI gélose tétracycline	CMI gélose doxycycline	CMI Etest tétracycline	CMI Etest doxycycline
Série 5	18	18		
Ne pousse pas ou inoculum faible	16	11	3	1
2 valeurs de CMI séparées d'au moins 2 dilutions	3	10	2	2
Discordance dans la détermination des CMI	4	4		
Retestée car valeur manquante et potentiellement intéressante	1	1		
Contamination		7	1	9
Sans motif	4	4	5	5

Etude CMI en milieu gélosé

Dans l'étude de détermination des CMI en milieu gélosé, 155 souches ont été testées au cours des 10 séries :

- 109 ont été retenues pour établir la droite de concordance pour la tétracycline;
- 100 ont été retenues pour établir la droite de concordance pour la doxycycline.

Etude CMI Etest

Dans l'étude de détermination des CMI par Etest, 138 souches ont été testées au cours des 10 séries. La taille de l'échantillon diffère entre les études CMI gélose et Etest car le nombre de souches exclues pour cette technique est très inférieur au nombre de souches exclues pour la détermination des CMI en milieu gélosé :

- parmi les 138 souches testées pour la tétracycline, 127 ont été retenues pour établir la droite de concordance;
- dans l'étude de détermination des CMI par Etest pour la doxycycline, 121 souches parmi les 138 testées, ont été retenues pour établir la droite de concordance.

II-2- Droites de concordance entre le log2 CMI et le diamètre d'inhibition

II-2-1- Tétracycline

Droite définie à partir des CMI en milieu gélosé

La figure 1 présente la droite de concordance entre le diamètre d'inhibition obtenu grâce à l'antibiogramme et le log2 de la CMI déterminée en milieu gélosé. Nous avons reporté les 109 souches exploitables (caractérisées par un diamètre d'inhibition et une CMI) sur un graphique présentant le diamètre d'inhibition en fonction du log2 de la CMI. Nous avons ensuite établi la

droite de concordance reliant ces deux paramètres. Celle-ci est caractérisée par l'équation et le coefficient de corrélation (R) suivants :

- **diam** = $-3,2655 \times \log_2(\text{CMI}) + 29,837$ (avec diam : diamètre d'inhibition (mm), et la CMI exprimée en $\mu\text{g/mL}$),
- **R** = 0,909.

Le coefficient de corrélation (R) est proche de 1, ce qui confirme la relation linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 de la CMI « en milieu gélosé ».

Droite définie à partir des CMI Etest

De la même manière, la figure 2 présente la droite de concordance entre le diamètre d'inhibition obtenu grâce à l'antibiogramme et le \log_2 de la CMI déterminée par la méthode du Etest. La droite de concordance obtenue est caractérisée par les paramètres suivants :

- **diam** = $-3,7532 \times \log_2(\text{CMI}) + 33,084$
- **R** = 0,966

Le coefficient de corrélation (R) est très proche de 1, ce qui confirme la relation linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 de la CMI par Etest.

Analyse des droites obtenues et détermination de diamètres critiques

Les droites de concordance obtenue pour la tétracycline, entre le diamètre des zones d'inhibition et les CMI, mesurées par la méthode du Etest et de dilution en milieu gélosé, sont significativement différentes de la droite de concordance proposé par le CA-SFM ($P < 0,001$).

De plus, les droites de concordance construites dans notre étude à partir des CMI déterminées par dilution en milieu gélosé et par Etest ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre.

Nous avons donc calculé les diamètres critiques à partir des deux équations de droite obtenus, les résultats sont présentés dans le tableau VII. Le diamètre critique inférieur avoisine 20mm et le diamètre critique supérieur est légèrement supérieur à 23mm.

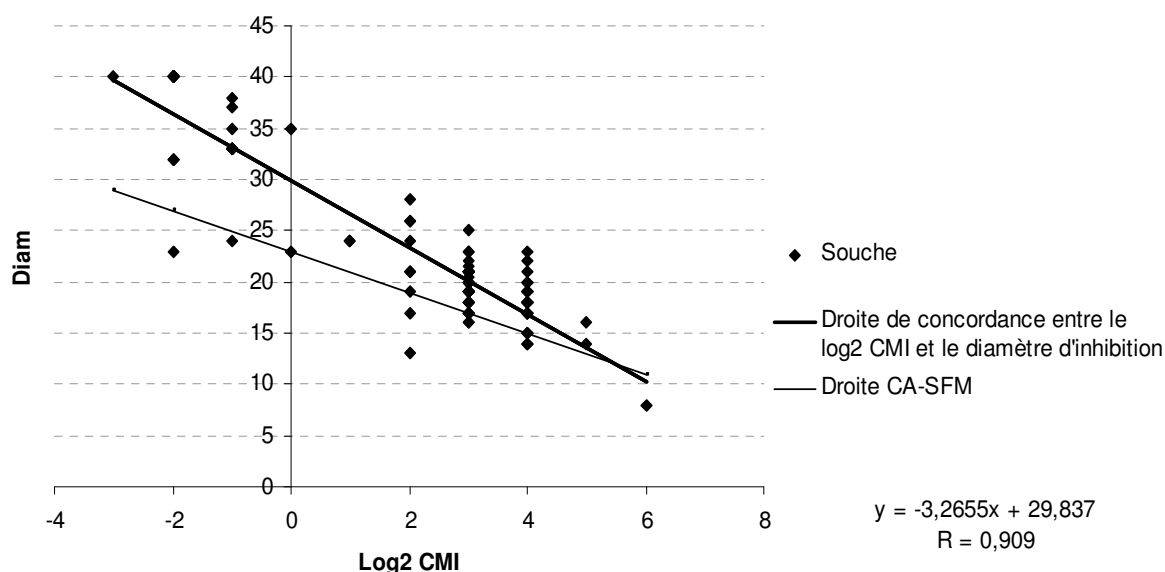


Figure 1 : Droite de concordance entre diamètre d'inhibition et CMI mesurée en milieu gélosé pour la tétracycline (**effectif : 109 souches**).

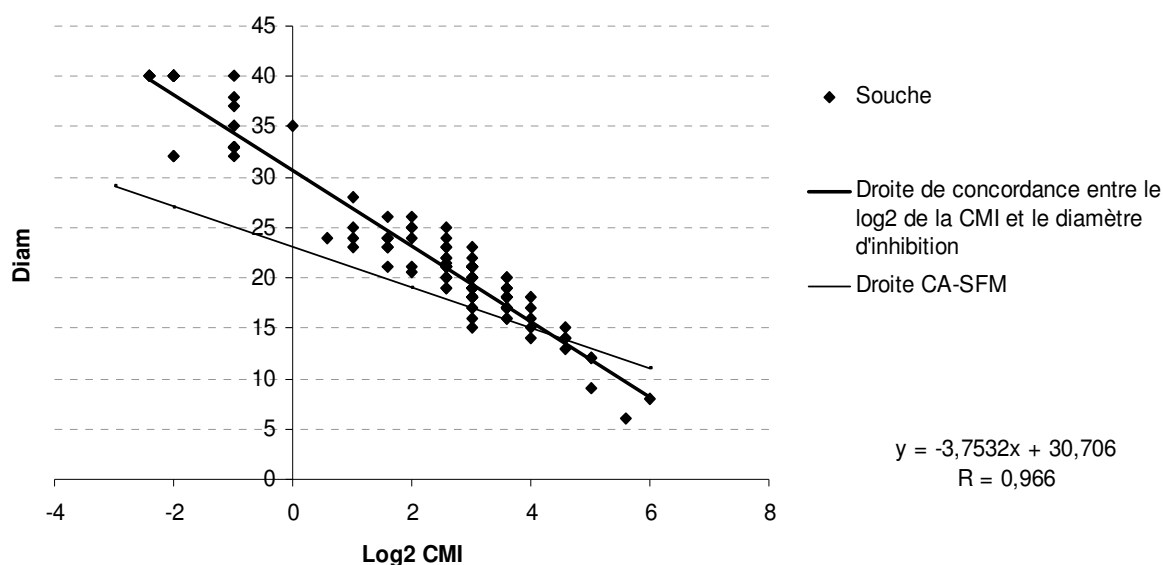


Figure 2 : Droite de concordance entre diamètre d'inhibition et CMI mesurée par Etest pour la tétracycline (**effectif : 127 souches**).

Tableau VII : Diamètres critiques définis pour la tétracycline à l'aide des droites obtenues.

Méthode de détermination de la CMI	d (mm)	D (mm)
Etest	19,4	23,2
Gélose	20,0	23,3

II-2-2- Doxycycline

Droite définie à partir des CMI en milieu gélosé

La figure 3 présente la droite de concordance entre le diamètre d'inhibition obtenu grâce à l'antibiogramme et le log2 de la CMI déterminée en milieu gélosé. Comme précédemment, nous avons établi une droite de concordance entre le log2 de la CMI en milieu gélosé, obtenue pour la doxycycline et le diamètre d'inhibition à partir des 100 souches exploitables. Les caractéristiques de cette droite sont les suivantes :

- **diam** = -2,9741 x log2 (CMI) + 24,392
- **R** = 0,945

Le coefficient de corrélation (R) est très proche de 1, ce qui confirme la relation linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 de la CMI.

Droite définie à partir des CMI Etest

La figure 4 présente la droite de concordance entre le diamètre d'inhibition obtenu grâce à l'antibiogramme et le log2 de la CMI déterminée par la méthode du Etest pour la doxycycline. La droite de concordance entre le log2 de la CMI et le diamètre d'inhibition présente les caractéristiques suivantes :

- **diam** = $-3,512 \times \log_2(\text{CMI}) + 25,637$
- **R** = 0,967

Le coefficient de corrélation (R) est très proche de 1, ce qui confirme la relation linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 de la CMI.

Analyse des droites obtenues et détermination de diamètres critiques

Les droites de concordance obtenues pour la doxycycline, entre le diamètre des zones d'inhibition et les CMI, mesurées par la méthode du Etest et de dilution en milieu gélosé, sont significativement différentes de la droite de concordance proposée par le CA-SFM ($P < 0,001$).

De plus, les droites de concordance construites dans notre étude pour la doxycycline, à partir des CMI déterminées par dilution en milieu gélosé et par Etest, sont significativement différentes l'une de l'autre (ordonnée à l'origine $P < 0,03$, pente $P < 0,002$).

Nous avons donc calculé les diamètres critiques à partir des deux équations de droite obtenues, les résultats sont indiqués dans le tableau VIII. Le diamètre critique inférieur avoisine 16mm et le diamètre critique supérieur est compris entre 18mm et 19mm.

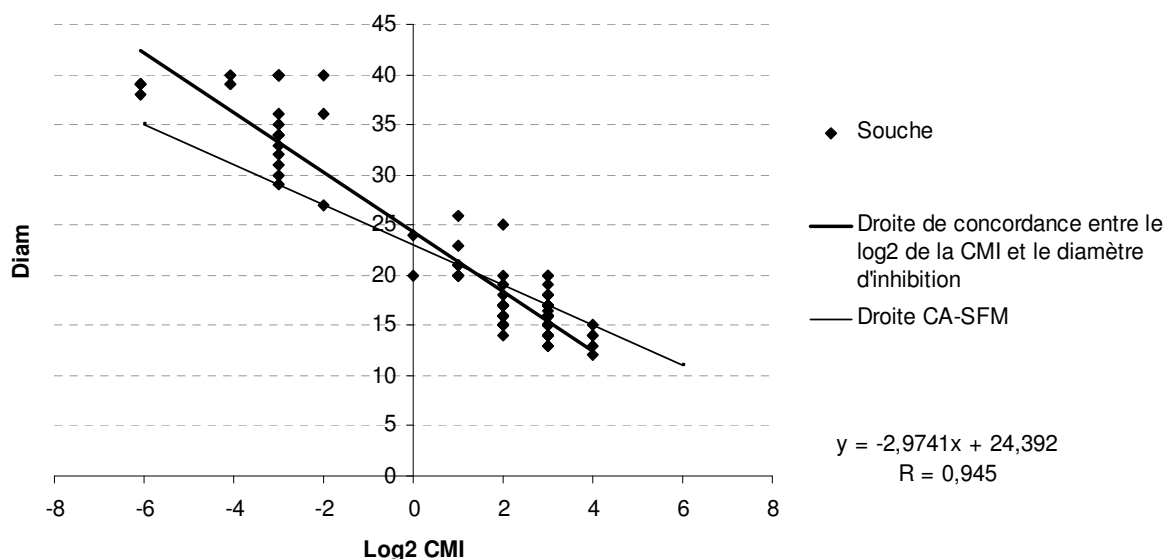


Figure 3 : Droite de concordance entre diamètre d'inhibition et CMI mesurée en milieu gélosé pour la doxycycline (effectif : 100 souches).

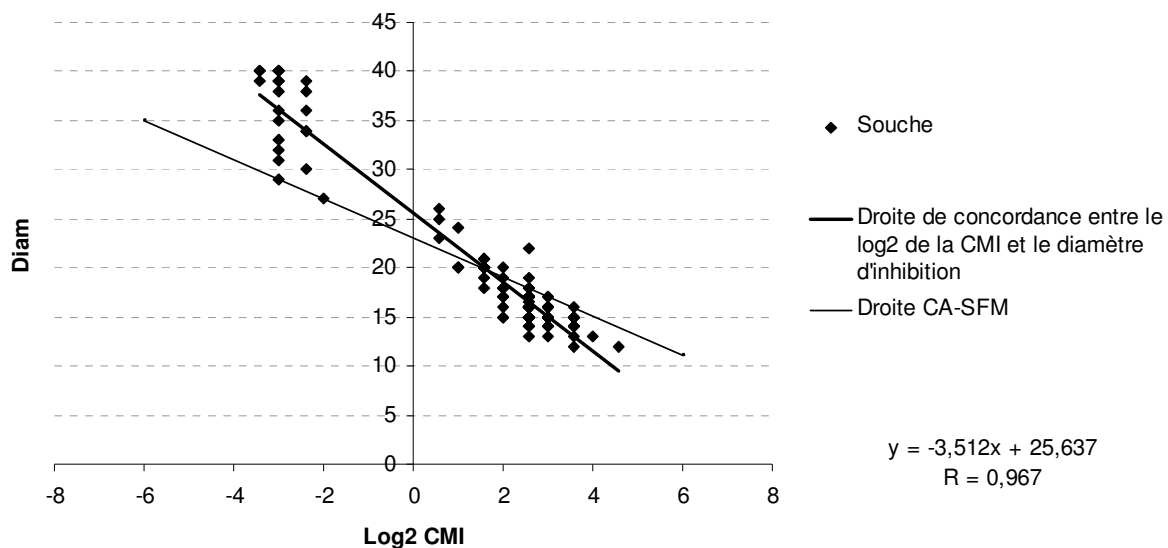


Figure 4 : Droite de concordance entre diamètre d'inhibition et CMI mesurée par Etest pour la doxycycline (**effectif : 121 souches**).

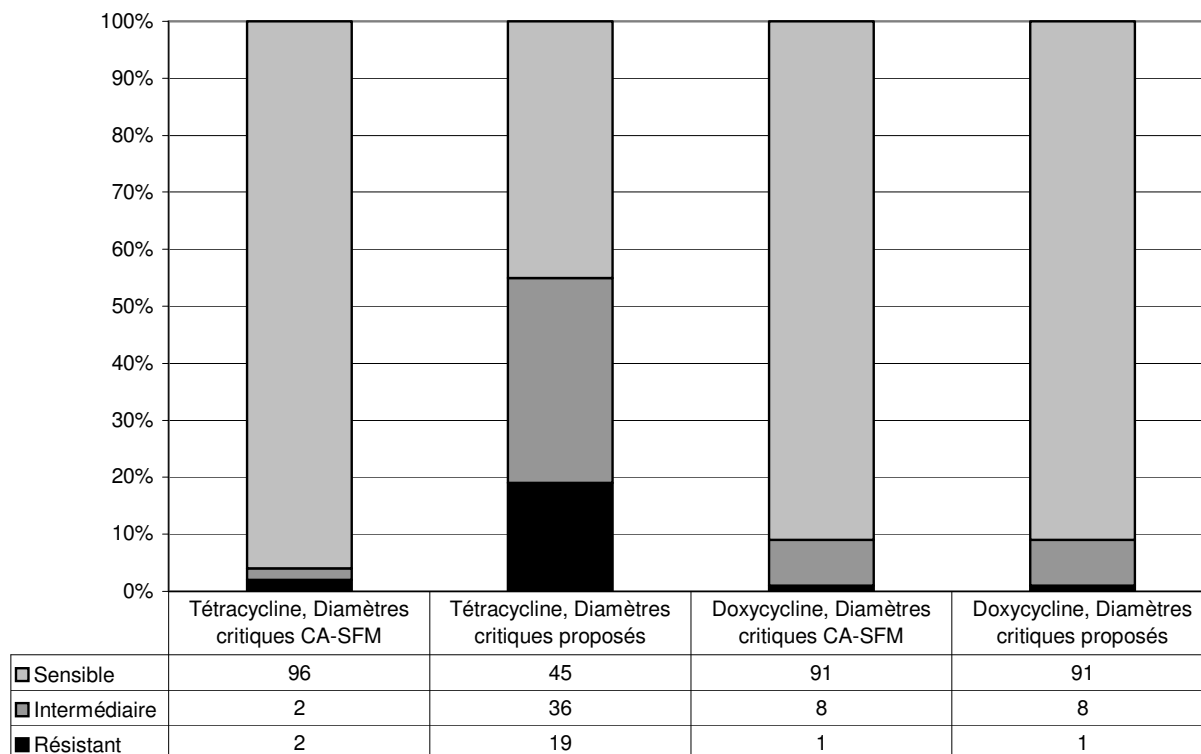
Tableau VIII : Diamètres critiques définis pour la doxycycline à l'aide des droites obtenues.

Méthode de détermination de la CMI	d (mm)	D (mm)
Etest	15,1	18,6
Gélose	15,5	18,4

II-3- Impact des nouveaux diamètres critiques sur la catégorisation « Sensible, Intermédiaire ou Résistant » à l'antibiogramme :

Les résultats sont représentés sur la figure 5

Figure 5: Catégorisation "Sensible, Intermédiaire ou Résistante" de 365 souches d'ORT isolées sur des dindes malades. Utilisation des Diamètres critiques du CA-SFM ou de ceux proposés par cette étude (Valeurs en pourcentage du total des souches)



III- DISCUSSION

III-1- Choix des méthodes de laboratoire

La méthode de dilution en milieu gélosé est une méthode de référence pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices. Il était donc indispensable d'utiliser cette méthode dans notre étude afin de crédibiliser les résultats que nous obtiendrions concernant la détermination de nouveaux diamètres d'inhibition pour la tétracycline et la doxycycline, comme le laissait présager l'étude préliminaire de Bousquet et coll. en 2004. Cependant, la méthode de détermination de CMI par diffusion à partir d'une bandelette imprégnée d'un gradient d'antibiotique, le Etest, est une méthode beaucoup plus simple dans sa mise en œuvre et probablement une méthode dont l'utilisation sera croissante dans les années à venir. Ainsi, l'utilisation de ces deux méthodes en parallèle sur un même échantillon nous semblait un moyen satisfaisant de les comparer et de confirmer nos résultats.

III-2- Définition de nouveaux diamètres critiques dans l'interprétation des antibiogrammes

Les droites de concordance obtenues pour les deux molécules et par les deux techniques évitent les erreurs majeures et très majeures. De plus les coefficients de corrélation obtenus sont

supérieurs à 0,9 et même supérieurs à 0,95 par la méthode des Etest [0,91 ; 0,97 ; 0,95 et 0,97 pour la tétracycline (milieu gélosé et Etest) et la doxycycline (milieu gélosé et Etest) respectivement]. De telles valeurs confirment la relation linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 de la CMI.

Les diamètres critiques calculés sont supérieurs à ceux établis par la Société Française de Microbiologie (SFM) pour l'Oxytétracycline et la doxycycline, qui sont fixés à :

- **17mm : diamètre critique inférieur,**
- **19mm : diamètre critique supérieur.**

Cette divergence peut s'expliquer par la manière dont a été établie la droite de concordance de la SFM. En effet, même si la Société Française de Microbiologie s'est dotée depuis peu d'un groupe de travail vétérinaire dont le rôle est de définir des diamètres critiques pour les principales espèces bactériennes rencontrées en médecine vétérinaire, l'interprétation des antibiogrammes d'ORT est basée sur des valeurs de diamètres critiques définies pour les *Pasteurellaceae*, et non sur des valeurs spécifiques à cette bactérie particulière. Ainsi, les diamètres critiques utilisés sont déterminés à partir d'une droite de concordance établie à partir de souches bactériennes d'espèces différentes et de surcroît à croissance rapide.

Cette première étude nous amène donc à reconsidérer les diamètres critiques utilisés pour l'interprétation des antibiogrammes d'*Ornithobacterium rhinotracheale*. Aussi est-il désormais recommandé de retenir les diamètres critiques suivants :

- **Pour la tétracycline : 20mm** (au lieu de 17mm) **et 23mm** (au lieu de 19mm) comme diamètres critiques inférieur et supérieur respectivement,
- **Pour la doxycycline : 16mm** (au lieu de 17mm) **et 19mm** (comme il est actuellement recommandé)

Notons que les diamètres critiques déterminés pour la doxycycline diffèrent très peu des diamètres critiques actuellement utilisés.

Les valeurs de CMI obtenues avec la méthode de dilution en milieu gélosé et la méthode du Etest ont pu être comparées de manière indirecte en comparant entre elles les droites de régression obtenues. Les droites de concordance obtenues par les deux méthodes ne diffèrent pas pour la tétracycline, les valeurs de CMI obtenues par la méthode du Etest sont donc comparables aux valeurs obtenues par la méthode de dilution en milieu gélosé. Néanmoins, pour la doxycycline, les droites de concordance obtenues par les deux méthodes diffèrent quelque peu, les équations de droite sont les suivantes :

$$\text{Gélose : diam} = -2,9741 \times \log_2 (\text{CMI}) + 24,392$$

$$\text{Etest : diam} = -3,512 \times \log_2 (\text{CMI}) + 25,637$$

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, de nombreuses publications indiquent que les CMI déterminées en utilisant un Test sont comparables à celles déterminées par les méthodes conventionnelles dans un intervalle d'une dilution. De plus, le Etest est particulièrement intéressant pour tester les micro-organismes difficiles en particulier parce que les bandelettes peuvent être placées sur des milieux spéciaux enrichis ou dans des conditions spéciales d'incubation.

III-3- Catégorisation comparée de souches terrains, avec les diamètres critiques de cette étude, ou ceux du CA-SFM :

Réalisée à partir d'un grand nombre de souches « terrain » isolées récemment, la figure 5 montre clairement :

- que l'on ne peut évaluer la sensibilité d'une souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* avec les mêmes diamètres critiques pour Tétracycline et Doxycycline ;

- que l'utilisation des diamètres critiques proposés par le CA-SFM amène à sous-estimer notablement la proportion de souches résistantes et intermédiaires à la tétracycline ;

- que notre étude amène au constat d'une proportion de souche d'*Ornithobacterium rhinotracheale* sensibles nettement supérieure pour la Doxycycline que pour la Tétracycline :

Doxycycline = 91% et Tétracycline = 45%

IV- CONCLUSIONS

Cette étude des C.M.I. d'un grand nombre de souches isolées récemment dans des élevages de l'Ouest de la France, sur des dindes atteintes d'affections respiratoires et / ou locomotrices, permet :

- de proposer spécifiquement pour *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) les diamètres critiques suivants pour l'interprétation des antibiogrammes :

	Doxycycline	Tétracycline
Diamètre Critique Inférieur pour <i>O. rhinotracheale</i>	16 mm	20 mm
Diamètre Critique Supérieur pour <i>O. rhinotracheale</i>	19 mm	23 mm

- d'évaluer à partir de 365 souches, le taux d'ORT sensibles à deux cyclines :

	Doxycycline	Tétracycline
Pourcentage d'ORT sensibles	> à 90%	< à 50%

***Ornithobacterium* en dinde : synthèse et perspectives.**

Dr Pascal PAULET

INTERVET / SCHERING PLOUGH SANTE ANIMALE

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) est une bactérie qui a été identifiée au début des années 90 **(11)**. Elle a été retrouvée dans différents pays du monde : Afrique du Sud, Hongrie, Allemagne, France, USA ... et sur différentes espèces de volailles : dindes, poulets, canards, gibier.

En élevage de dindes, les problèmes respiratoires représentent une pathologie majeure. *Ornithobacterium rhinotracheale*, avec *Escherichia coli* **(1)**, est une des principales bactéries isolée lors de problèmes respiratoires. Des cas d'arthrites causées par ORT ont également été observés **(9)**.

Cet article a pour objectif de faire un état des lieux des connaissances sur *Ornithobacterium rhinotracheale* et d'évaluer l'intérêt de l'utilisation de vaccin dans l'aide à la maîtrise des problèmes causés par ORT.

Données épidémiologiques

Symptômes :

L'infection peut se manifester par de multiples symptômes **(11)** :

- respiratoires
- articulaires et osseux
- septicémiques

L'importance des signes cliniques est variable, elle dépend de facteurs environnementaux : densité, ventilation, hygiène générale de l'élevage et conditions sanitaires (virus respiratoires). La maladie touche aussi bien les dindes de chair que les dindes reproductrices **(3)**

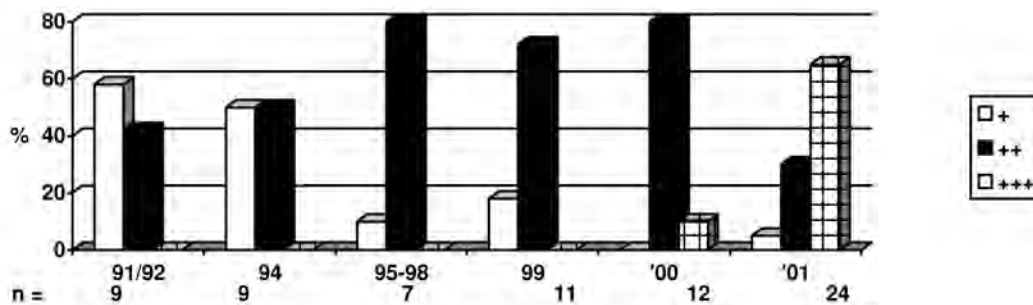
Souches d'ORT en dindes :

Ornithobacterium rhinotracheale regroupe 18 sérotypes (A à R) **(8-11)**.

La particularité des souches d'ORT isolées en dindes est la diversité des sérotypes rencontrés par rapport au poulet où le sérotype A représente 100 % des isolats.

Ceci a été observé tant en France **(1)** qu'au niveau mondial **(11)**.

Hafez **(6)**, graphique 1, a observé une évolution de la pathogénicité des souches d'ORT provenant de dindes allemandes entre 1991 et 2001. Cette évolution de la pathogénicité est une des pistes permettant d'expliquer la plus grande fréquence des problèmes rencontrés en élevages depuis le début des années 90.



Graphique 1 : Niveau de pathogénicité de différents isolats de dindes allemandes sur plusieurs années.

Tests réalisés sur des œufs embryonnés de poules, contaminés avec des souches d'ORT puis, mis en incubation avec suivi de la mortalité embryonnaire sur 8 jours.

- + 10-20 % de mortalité
- ++ 21-60 % de mortalité
- +++ > 60 % de mortalité

Modes de contamination

Des études ont montré que les dindes peuvent se contaminer à la fois par la voie verticale et par la voie horizontale **(13)**.

La bactérie survit dans la litière dans des conditions de basse température ce qui contribue également à sa dissémination et sa persistance sur les zones d'élevages **(5)**.

Données économiques

ORT induit des problèmes respiratoires et / ou articulaires en dindes de chair avec un impact économique qui peut être important car :

- en cas de problèmes respiratoires les mortalités peuvent aller de 2 à 10 % **(4)**
- en cas de problèmes articulaires les boiteries entraînent des saisies à l'abattoirs allant jusqu'à 6 à 8 % du lot **(9)** page 70.

En dindes reproductrices la bactérie induit également d'importantes pertes économiques par les mortalités, les baisses de ponte **(3)** et d'éclosabilité et les problèmes de boiteries qu'elle engendre.

Traitement et prévention

Les cas d'infection à *Ornithobacterium* sont traités par l'utilisation d'antibiotiques. Cependant, dans la plupart des pays, des études sur l'antibiorésistance des souches d'*Ornithobacterium* ont montré des évolutions notables des profils de sensibilité au cours des années **(7-12)**.

On observe parfois sur le terrain plusieurs épisodes avec isolement d'ORT sur un même lot malgré les traitements mis en place.

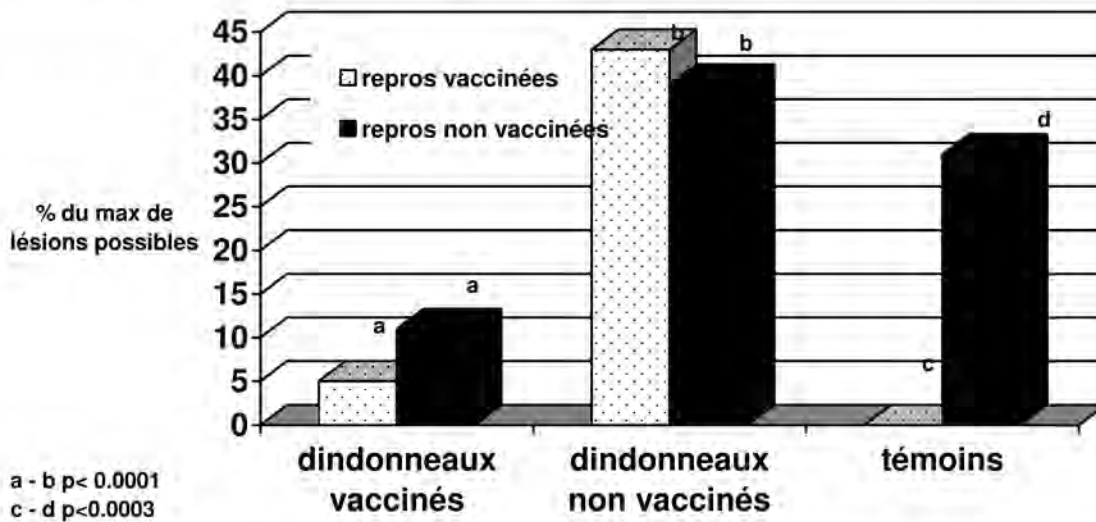
Des publications de K Cauwerts **(2)** et Van Veen **(13)**, ont montré que l'utilisation de vaccins inactivés permettait de :

- réduire les symptômes sur les oiseaux vaccinés,
- protéger la descendance de reproductrices en poule comme en dinde grâce aux anticorps maternels.

Les anticorps produits suite à la vaccination semblent en effet, être l'élément déterminant de la protection **(10)**.

La protection croisée entre les différents sérotypes étant de faible niveau, le développement d'un vaccin en dinde nécessite la présence de différents sérotypes.

Dans une étude, Van Veen et coll. (13) ont montré que l'injection sur des dindonneaux issus de reproductrices vaccinées avec un vaccin inactivé trivalent A, B et D a permis de réduire significativement les symptômes respiratoires : graphique 2.



Graphique 2 : % du maximum de lésions respiratoires possibles, sur le sérotype B, suite à épreuve virulente de dindonneaux vaccinés ou non, issus de reproductrices vaccinées ou non, par rapport à des témoins non éprouvés.

Conclusion

Ornithobacterium rhinotracheale est une bactérie que l'on retrouve fréquemment en dinde sur des problèmes respiratoires et de boiteries.

Jusqu'à présent, ce pathogène est traité par l'utilisation d'antibiotiques. Une autre voie de maîtrise de ce problème est une stratégie vaccinale tant au niveau des reproductrices que des dindonneaux. Les données publiées montrent que l'utilisation de vaccins inactivés injectables contenant plusieurs antigènes permet de réduire fortement les lésions respiratoires observées lors d'épreuves virulentes.

Bibliographie

1. T. F. Bazin; *Ornithobacterium rhinotracheale* en élevage de dindes de chair : suivi d'élevages cas en Vendée et Bretagne. Thèse Ecole nationale Vétérinaire de Nantes, 2003.
2. K. Cauwerts, P. de Herdt, F. Hasebrouck, J. Vervloesem & R. Ducatelle. The effect of *Ornithobacterium rhinotracheale* vaccination of broiler breeder chickens on the performance of their progeny. *Avian Pathology* 31 : 619-625, 2002
3. M. De Rosa, R. Droual, R.P. Chin, H. L. Shivaprasad, R.L.Walker. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders. *Avian Disease* 50 : 865-875, 1996.
4. J. Dudouyt, J. Léorat, Van Empel P, Y. Gardin, C. Doré, Isolement d'un nouvel agent pathogène chez la dinde : *Ornithobacterium rhinotracheale* : conduite à tenir. *Proceedings 1ères Journées de la recherche avicole*, Angers : 250-253, 1995.
5. V.C. Lopes, B. Velayudhan. D.A. Hlvorson, K.V. Nagaraja. Survival of *Ornithobacterium rhinotracheale* in sterilized poultry litter. *Avian Disease* 56 :1011-1015, 2002.
6. Hafez H. M. and C. Popp (2003) Chicken Embryo lethality assay for determining the pathogenicity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates : *Proceedings of the XIII international congress of the world veterinary poultry association*, Denver , USA 19-23 july 2003, p 61.
7. Y.S. Malik, K. Olsen, K. Kumar, S. M. Goyal. In vitro antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from Minnesota turkeys during 1996-2002. *Avian Diseases* 57 : 588-593, 2003.
8. Richard P.Chin ,Paul C M Van Empel and Hafez M. Hafez .11th edition diseases of poultry, chapter 19, Pasteurella and other related bacterial infections, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection.
9. R. A. Souillard. Observations de cas de ténosynovites à *Ornithobacterium rhinotracheale* dans des élevages de dindes de chair de Bretagne. Thèse Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 2002.
10. D.F. Schuijffel, P.C. Van Empel, A.M.M.A. Pennings, J.P.M. Van Putten, P.J.M. Nuijten. Passive Immunization of immune-suppressed animals : chickens antibodies protect against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Vaccine* 23 : 3505-3511, 2005.
11. P.C.M. Van Empel, H. M. Hafez, *Ornithobacterium rhinotracheale* : a review. *Avian Pathology* 28 : 217-227, 1999.
12. L. Van Veen, E. Hartman, T. Fabri. In vitro sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. *The Veterinary Record*, Nov 17, 2001.
13. L. Van Veen, M. Vrijenhoek, P. Van Empel. Studies of the transmission routes of *Ornithobacterium rhinotracheale* and immunoprophylaxis to prevent infection in Young meat turkeys. *Avian Diseases* 58 : 233-237, 2005.

La maladie de la rate marbrée chez la pintade

Dr Nadine CARIOU
SELVET CONSEIL

Introduction

Quelques cas cliniques nous ont amenés à décrire une maladie de la pintade, provoquée par un Adénovirus de groupe II, à rapprocher d'une maladie hémorragique rapportée en Italie, mais qui n'avait pas encore été étudiée dans l'ouest de la France.

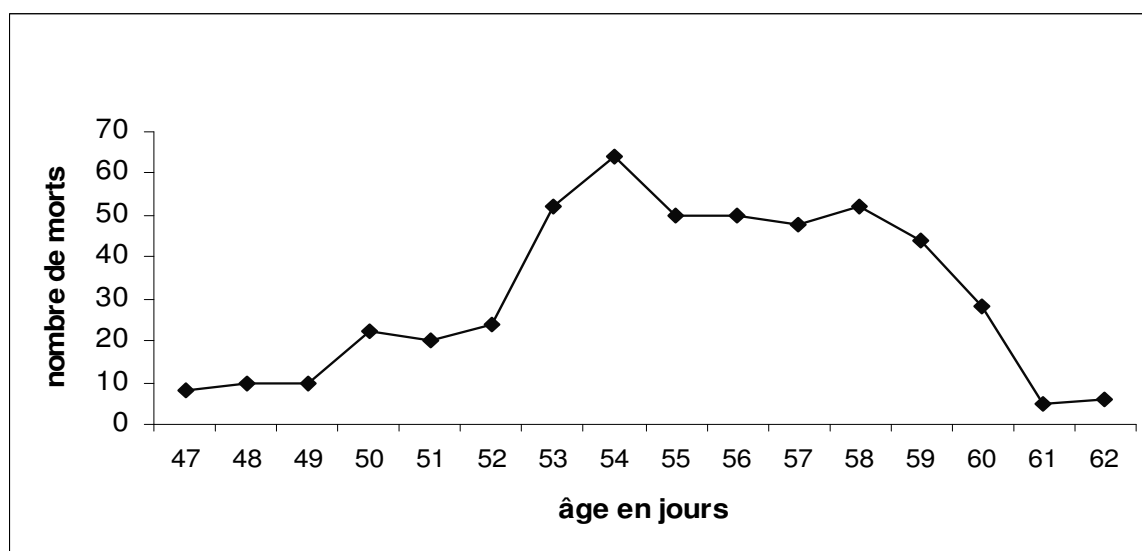
Les infections à Adénovirus ont été décrites dans diverses espèces aviaires, pouvant avoir un impact économique important, comme l'hépatite à inclusion du poulet, l'entérite hémorragique de la dinde, la chute de ponte « egg drop syndrome ». Chez la pintade, la pancréatite virale, due à un Adénovirus de groupe I, est bien connue. Quant aux Adénovirus de groupe II ils provoquent la maladie de la rate marbrée du faisán ou l'entérite hémorragique de la dinde.

Les cas cliniques concernent des pintades âgées de 5 à 7 semaines lorsque la mortalité apparaît ; la mortalité est relativement élevée, supérieure à 0,1% par jour, avec des lésions caractéristiques d'hémorragies des muscles et des séreuses, et une hypertrophie de la rate, qui présente alors un aspect marbré.

Nous avons pu approfondir l'intérêt épidémiologique de ces cas en réalisant divers examens complémentaires.

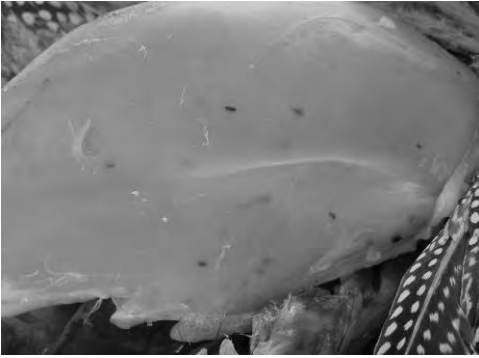
Cas cliniques

Les lots de pintades ont été mis en place dans des bâtiments de type industriel, avec des densités de 14 à 16 par m². Les mesures habituelles de biosécurité sont respectées. Le recours au laboratoire est motivé par l'apparition d'une mortalité brutale, relativement élevée (plus de 20 sujets par jour, avec un maximum pouvant s'élever à 130, soit 0,1 à 0,7 % par jour) qui durera environ 2 semaines, sur des lots dont le comportement est bon, avec un poids souvent au-dessus de la courbe.



La mortalité apparaît entre 5 et 7 semaines, alors que l'on observe peu d'animaux prostrés, et aucun autre symptôme.

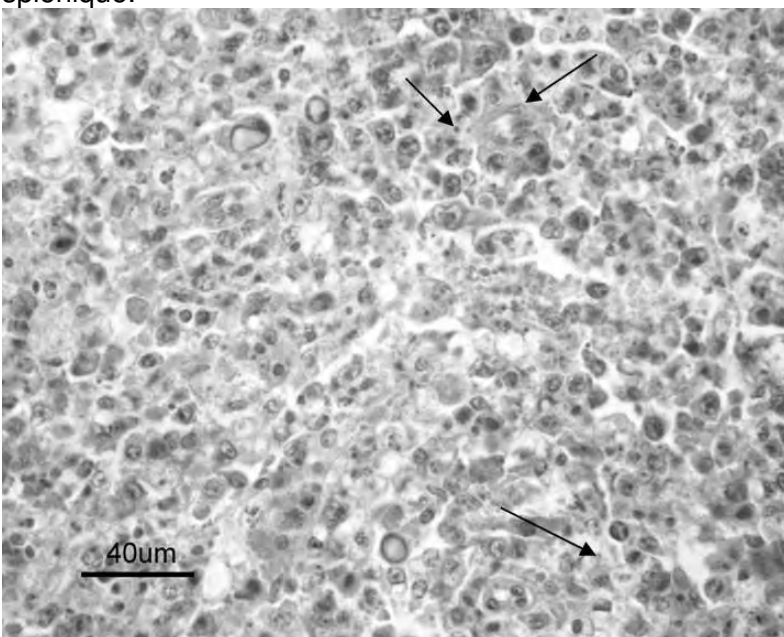
L'examen nécropsique permet d'observer des lésions d'hypertrophie des rates dont l'aspect est marbré, et des lésions hémorragiques des muscles squelettiques et du myocarde.



L'examen bactériologique permet d'isoler des germes de surinfection, tels qu'*E. coli* ou *staphylococcus aureus*.

Examens complémentaires

L'examen histologique montre une hyperplasie de la pulpe blanche, avec présence de volumineuses inclusions intranucléaires pâles, permettant de confirmer l'hypothèse d'Adénovirose splénique.



Rate de pintade (grossissement X400): Splénite nécrosante (la nécrose est au centre de la photo), avec corps d'inclusion intranucléaires (en périphérie de la nécrose), caractéristiques d'une adénovirose de type II (inclusions volumineuses, pâles, déformant le noyau). Les inclusions sont indiquées par des flèches.
O. Albaric. ENVN

Dans l'un des cas, des sangs ont été prélevés avant abattage, pour être traités par un kit ELISA entérite hémorragique. Le seuil de positivité est de 147. Les titres sont similaires à ceux que l'on obtient sur des dindes après un passage de virus sauvage de l'entérite hémorragique.

Sérum n°	classe	titre
1	15	25811
2	0	1
3	4	3132
4	13	19677
5	2	1187
6	9	10267
7	15	24593
8	8	9320
9	7	7612
10	8	8585
11	1	175
12	6	5855
13	7	6612
14	14	22384
15	2	1855
16	8	8005
17	14	22007
18	6	5069
19	11	14723

Moyenne : 10 000 CV : 81

Le kit synbiotics utilisé au laboratoire Bio Chêne Vert a été testé avec des sérums positifs vis-à-vis de EDS, ADENO1, ADENO4 et EH, le titre obtenu n'est positif que pour le sérum EH.

Des organes congelés ont été envoyés au laboratoire LSI pour être analysés par PCR conventionnelle. La présence du virus de l'entérite hémorragique a été mise en évidence dans les foies.

Etude bibliographique

Massi a rapporté des cas cliniques similaires sur des pintades âgées de 2 à 5 mois, le nombre de cas augmentant depuis 1992. Il décrit les mêmes lésions avec de plus une altération du comportement, et des lésions d'ascite et d'hydropéricarde. L'examen histologique, la microscopie électronique et l'IDG sont en faveur d'une forte parenté antigénique avec les Adénovirus aviaires du groupe II.

Discussion

Le séquençage du génome viral permettrait de mesurer le degré de parenté antigénique avec le virus de l'entérite hémorragique. Il est toutefois intéressant de noter que la plupart des cas surviennent dans des bâtiments où le lot de pintades fait suite à un lot de dindes ; avec ou sans épisode pathologique entérite hémorragique ou de type « gros foie-grosse rate », avec ou sans vaccination Dindoral.

Le virus de l'entérite hémorragique est très résistant dans l'environnement : il résiste 1h à 65°C, 4 semaines à 37°C, 6 mois à 4°C ; il est sensible à l'hypochlorite de sodium à 1% ou au glutaraldéhyde à 2%. Il faut donc conseiller un protocole de décontamination particulier lorsque l'on prévoit une mise en place d'un lot de pintades faisant suite à un lot de dindes.

Conclusion

Des cas de maladie de la rate marbrée sont régulièrement signalés dans des élevages de pintades du grand Ouest, provoquant des mortalités brutales et relativement importantes. Le virus responsable est très proche sinon identique à celui de l'entérite hémorragique de la dinde, ce qui pourrait amener à compléter les consignes de conduite d'élevage en pintade.

Références :

Massi, P., Adenovirus-associated haemorrhagic disease in guinea fowl. *Avian Pathology* (1995) 24, 227-237.

Remerciements :

Paul Morillon (Mérial), Olivier Albaric (Ecole Vétérinaire de Nantes), Jean-Louis Pinsard (Bio Chêne Vert), Sandrine le Rouzic et Pascal Vicaud, ont apporté leur contribution à l'étude de ces cas cliniques.

Entérite virale des volailles de chair : Quelle implication des *astrovirus* ?

Jean-Luc GUERIN, Jean-Yves DOUET et Xavier DUBORD
ENV TOULOUSE, CLINIQUE DES ELEVAGES AVICOLES & PORCINS

Depuis 2003, les maladies digestives sont devenues une dominante pathologique en volaille de chair. Des changements dans les pratiques alimentaires et la conduite d'élevage, ont entraîné une augmentation sensible de la prévalence de ces affections notamment en production de dinde et de pintade.

Après une description épidémioclinique des syndromes entéritiques rencontrés sur le terrain chez ces deux espèces, nous verrons quels agents peuvent être mis en cause et les approches diagnostiques qui sont actuellement développées pour les caractériser.

Description épidémioclinique

Depuis 2003, la production de dinde de chair française connaît l'émergence d'un nouveau syndrome entéritique ; ainsi, des difficultés de démarrage et des retards de croissance avant 28 jours d'âge, accompagnés d'une forte hétérogénéité, sont rencontrés sur le terrain. Les lots atteints présentent frilosité, prostration et piallements, auxquels s'associent une baisse de la consommation alimentaire, une augmentation de la consommation d'eau et l'apparition d'une diarrhée qui tend souvent vers la chronicité. Dans le même temps, il a été noté une recrudescence des cas de candidose [2]. Bien que confirmées par le laboratoire, les entérites sont souvent classées comme « non spécifiques » et associées au niveau lésionnel à une atrophie des organes lymphoïdes et notamment du thymus.

Ce syndrome est rencontré depuis la fin des années 90 aux USA et a été décrit sous le nom de « Poultry Growth depression » (PGD). Il est associé à deux syndromes voisins, le « Spiking Mortality Turkey » (SMT) se traduisant par une mortalité aiguë et le « Poultry Enteritis Mortality Syndrome » (PEMS), à l'origine d'une mortalité moins intense, mais persistante [1]. Ces syndromes ont en commun de déclencher des entérites et des aplasies des organes lymphoïdes. Ils ont été à l'origine d'importantes pertes économiques pour la production de dinde en Amérique du Nord.

De la même manière, les entérites ont pris une place prépondérante dans la pathologie du pintadeau. Depuis 2004, la production française connaît l'émergence d'une forme particulièrement sévère de syndrome entéritique : les lots atteints présentent un arrêt de croissance, de l'hétérogénéité et une mortalité anormalement élevée. Le tableau lésionnel se résume le plus souvent à une entérite catarrhale. Ce syndrome se distingue de la maladie foudroyante ou « maladie X », qui est marquée par une entérite congestivo-hémorragique sévère, très régulièrement associée à une pancréatite nécrosante.

Une étude a été conduite depuis 2005 pour caractériser ce syndrome : à l'examen nécropsique, les animaux malades présentent systématiquement une entérite catarrhale « blanche ». Les lésions histologiques sont par contre d'intensité très variable et parfois très faible en dépit de signes cliniques et d'une mortalité intenses ; il est noté des infiltrations diffuses de l'appareil digestif et des atrophies des organes lymphoïdes. Ce tableau clinique est très évocateur du syndrome « PEMS » du dindonneau [3].



→ Une image lésionnelle récurrente lors du syndrome entérite-mortalité : les animaux malades présentent systématiquement une entérite catarrhale « blanche »

Quelles hypothèses étiologiques ?

Ces deux syndromes, bien caractérisés sur les plans épidémio-clinique et lésionnel, ont également en commun une étiologie complexe et multifactorielle. En effet, les premières investigations concernant le PEMS avaient mis en évidence l'implication potentielle d'agents viraux, bactériens ou parasitaires [6].

Ainsi, un certain nombre de virus ont pu être reliés de manière plus ou moins forte à la maladie : le *coronavirus* de la dinde (TcoV), des *astrovirus* aviaires (TastV1 et surtout, TAstV2), des *réovirus* mais également des *rotavirus* ou encore des *torovirus*. Les *coronavirus* et les *astrovirus* sont retrouvés dans les épithéliums des villosités intestinales et de la bourse de Fabricius. Leur réplication est à l'origine de troubles métaboliques de type « malabsorption » et d'une modification de la flore intestinale. La baisse d'immunité consécutive est, quant à elle, responsable d'une sensibilité accrue des animaux aux maladies intercurrentes. Dans le cas des infections à TAstV2 chez la dinde, cette immunodépression pourrait être liée à une réplication extradigestive du virus. La recrudescence des cas de candidose en élevage de dinde connaissant des problèmes de type PEMS est à ce titre très évocatrice. Les *rotavirus* ont un tropisme plus marqué pour le système digestif, mais sont régulièrement détectés en l'absence de tout signe clinique.

Des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) ont également été isolés de cas terrains de PEMS [4].

L'investigation de l'étiologie exacte de ces syndromes est rendue délicate par la multiplicité des candidats potentiels. La démarche consiste tout d'abord à isoler un agent de prélèvements de cas terrains, à reproduire expérimentalement les signes cliniques observés et enfin à « mettre un nom » sur le ou les suspects. L'« isolement » est évidemment très difficile à vérifier, à partir de contenu de tube digestif ! La mise en culture, voie classique en virologie, est extrêmement aléatoire sur les virus entéritiques. Par exemple, l'*astrovirus* associé au PEMS de la dinde est cultivable sur embryon de dinde, mais le virus produit doit être récolté dans l'intestin des embryons....

A ce titre, les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis une avancée considérable dans la mise en évidence des virus candidats. La détection de génomes viraux est beaucoup plus puissante que les méthodes traditionnellement employées, comme la microscopie électronique ; elle permet en outre de tester rapidement et à moindre coût plusieurs agents, autorisant plus facilement la création de tests diagnostiques de « routine ».

Quelles approches de contrôle ?

a. Sur le plan diagnostique

Si la détection des virus entériques est très intéressante pour mieux connaître les agents concernés, leur épidémiologie et adapter les mesures de biosécurité, force est de constater qu'en l'absence de mesures spécifiques de contrôle (vaccination par exemple), la recherche systématique d'agents viraux dans le cadre du diagnostic de routine sera plus difficile à justifier. Dans la situation actuelle, ce travail d'investigation étiologique fait l'objet de travaux de recherche appliquée menés sur la dinde (AFSSA, Ploufragan) et sur la pintade (ENV Toulouse).

b. Gestion des cas

A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique pour lutter contre le(s) virus impliqué(s) dans les syndromes entériques. L'objectif est donc d'aider les animaux à « franchir le cap » de l'infection aiguë. Une attention particulière doit être apportée à la maîtrise de l'ambiance et à la tenue de la litière. La température de consigne doit être augmentée d'un à deux degrés. Il est important de stimuler la prise alimentaire des animaux et éventuellement d'apporter un complément de vitamines, pour compenser les pertes liées à l'entérite. L'utilisation d'antibiotiques à large spectre est envisageable pour contrôler les surinfections bactériennes, notamment en cas de forte mortalité. Il faut par contre prendre garde aux déséquilibres de flore provoqués par des traitements trop longs ou mal maîtrisés, qui peuvent favoriser l'apparition de candidose.

La prévention de ces infections est étroitement liée au respect strict des règles de biosécurité :

- **Le contrôle du statut des intrants** sur le site d'élevage et en particulier les risques de contaminations d'origine humaine : les visiteurs, les camions de livraison d'aliment ou d'enlèvement des volailles, les équipes d'intervention, sont autant de sources possibles d'introduction de nouveaux agents infectieux sur le site.

- **La protection sanitaire du site et de chaque bâtiment.** La pratique du changement de tenue, avec une cotte et des bottes dédiées à chaque bâtiment, est la seule solution réaliste et efficace. Les pédiluves sont souvent des cautions, qui servent plus à se donner bonne conscience qu'à désinfecter efficacement les bottes. Il a été montré que trop souvent, le désinfectant y est tellement vite neutralisé que le pédiluve devient un remarquable milieu de culture.

- **L'application de protocoles rigoureux de nettoyage et désinfection**, pour éviter la contamination précoce de volailles d'un jour, introduites dans un milieu contaminant, alors que leurs défenses immunitaires sont encore peu efficaces.

Les *astrovirus* sont des agents particulièrement résistants dans le milieu extérieur : ils résistent notamment aux désinfectants homologués, aux concentrations usuelles [5]. Peu de données validées permettent d'établir à ce jour l'efficacité de tel ou tel désinfectant. Ce que l'on sait par contre de manière sûre, c'est qu'un nettoyage insuffisant rendra totalement inopérant l'application ultérieure d'un désinfectant, aussi performant et concentré soit-il.

- **La lutte contre les nuisibles** (ténébrions, mouches, rongeurs) qui sont autant de véhicules pour les agents infectieux d'un bâtiment à l'autre, ou d'une bande à l'autre (survie des ténébrions dans les isolants pendant le vide sanitaire)

- **La séparation stricte des générations de volailles** : il est acquis que la coexistence de plusieurs générations de volailles sur un même site favorise la circulation des agents pathogènes. Une séparation très stricte doit donc être observée, notamment lors des interventions humaines. En cas de diffusion d'un agent infectieux, seul un vide sanitaire global permettra l'assainissement du site, s'il est accompagné de mesures de nettoyage et désinfection.

En conclusion, la lutte contre les entérites virales est complexe car elle fait appel à des notions d'infectiologie, d'équilibre de la flore digestive des jeunes animaux, de zootechnie pour améliorer les défenses et la résistance naturelle de l'animal. L'évolution du contexte réglementaire de l'alimentation animale a également fragilisé la santé digestive des volailles. C'est particulièrement flagrant en production de dinde ou de poulet standard, mais la pintade ne fait pas exception à cette règle.

Références bibliographiques

- 1 **Barnes HJ, Guy JS (2003)**
Poult enteritis mortality syndrome.
In: *Diseases of poultry*, 11th edition, pp 320–326
- 2 **Germain M., Rousseau A.**
Syndrome entérite, frilosité, baisse de croissance de la dinde : étude de cas de terrain en France en 2004.
6^{èmes} Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 30 et 31 mars 2005
- 3 **Guérin J-L., Grenier B., Boissieu C., Lacroux C., Albaric O.,**
Syndrome entérite-mortalité du pintadeau : Etude pathologique et évaluation du rôle étiologique d'un astrovirus.
7^{èmes} Journées de la Recherche Avicole, Tours, 28 et 29 mars 2007
- 4 **Pakpinyo S.; Ley D. H; Barnes. H. J.; Vaillancourt J. P.; Guy J. S.**
Prevalence of Enteropathogenic Escherichia coli in Naturally Occurring Cases of Poult Enteritis-Mortality Syndrome
Avian Diseases, Vol. 46, No. 2. (Apr. - Jun., 2002), pp. 360-369.
- 5 **Schultz-Cherry S., King D. J., Koci M. D.**
Inactivation of an Astrovirus Associated with Poult Enteritis Mortality Syndrome
Avian Diseases, Vol. 45, No. 1 (Jan. - Mar., 2001), pp. 76-82
- 6 **Vaillancourt J-P., Barnes J., Guy J., Carver D., Wages D., Brugere-Picoux J.**
Syndrome entéritique mortel du dindonneau
Bull Acad. Vét. De France, 1997, (70), p 243-250

LE BOTULISME, EPIDEMIOLOGIE ET RISQUE POUR LA SANTE PUBLIQUE

Dr Michel Robert POPOFF

BACTERIES ANAEROBIES ET TOXINES, INSTITUT PASTEUR, PARIS

Introduction

Le botulisme est une affection nerveuse commune à l'homme et aux animaux qui est le plus souvent d'origine alimentaire et qui se caractérise par des paralysies flasques fréquemment mortelles par insuffisance respiratoire. Cette maladie est due à l'action de neurotoxines botuliques (BoNT) produites par des bactéries anaérobies et sporulées, dénommées *Clostridium botulinum*. Les toxines botuliques sont les toxines les plus puissantes connues. Selon leurs propriétés antigéniques, elles se divisent en sept toxinotypes (A, B, C, D, E, F et G). Le botulisme humain est associé aux types A, B et E, et exceptionnellement aux types C et F, alors que les types C et D sont essentiellement responsables du botulisme animal.

AGENTS RESPONSABLES DU BOTULISME

Groupes de *Clostridium botulinum*

Les toxines botuliques sont produites par diverses espèces de *Clostridium* qui sont des bactéries anaérobies strictes et sporulées. L'espèce *Clostridium botulinum* désignait initialement les bactéries productrices d'une toxine induisant une paralysie flasque chez les animaux de laboratoire. Ces bactéries dénommées ainsi *C. botulinum* sont très hétérogènes et sont divisées en quatre groupes sur la base des propriétés physiologiques, biochimiques et génétiques. En fait, ces quatre groupes correspondent à quatre espèces bactériennes distinctes sur un plan taxonomique. D'ailleurs, le groupe IV est considéré comme une espèce à part entière, *Clostridium argentinense*. Il faut noter que chacun des quatre groupes contient des souches non toxigènes indifférenciables des souches toxigènes d'après leurs caractères bactériologiques.

Mais des souches appartenant à d'autres espèces de *Clostridium* sont également capables de produire une toxine botulique. C'est le cas de certaines souches de *Clostridium butyricum* qui synthétisent une neurotoxine de type E, et de certaines souches de *Clostridium baratii* qui produisent une neurotoxine de type F. Ces souches neurotoxigènes sont phénotypiquement et génétiquement apparentées aux souches types de *C. butyricum* et *C. baratii* respectivement et non à celles de *C. botulinum*.

Habitat

L'habitat principal des *Clostridium* neurotoxigènes, comme des autres espèces de *Clostridium*, est l'environnement. Grâce à leurs spores, qui sont résistantes aux conditions extrêmes (chaleur, sécheresse, privation de nutriment, radiation, oxygène, agents chimiques), ces bactéries sont capables de survivre pendant de très longues périodes. Ainsi, les *Clostridium* sont ubiquistes et largement distribués dans l'environnement. Cependant, la germination des spores et la division bactérienne n'a lieu qu'en conditions anaérobies et en présence suffisante de nutriments. Ceci restreint l'habitat des *Clostridium* à des zones anaérobies ou de faibles tensions en oxygène et contenant des quantités suffisantes de matière organique.

Les différents groupes de *C. botulinum* n'ont pas une répartition géographique identique. L'habitat principal de *C. botulinum* A, B, E, F et G est le sol, et les sédiments marins et d'eau douce. Les toxinotypes A et B sont retrouvés plus volontiers dans les échantillons de sol, mais avec des localisations géographiques différentes. *C. botulinum* A est prédominant dans la partie Ouest des Etats Unis, en Amérique du Sud et en Chine, tandis que *C. botulinum* B est plus fréquent dans la partie Est des Etats Unis et en Europe. *C. botulinum* E qui a la particularité de se multiplier à basse température (2-3°C) est préférentiellement retrouvé dans les sédiments marins et d'eau douce ainsi que dans le contenu intestinal des poissons et autres animaux marins des régions Nord de l'hémisphère Nord (Alaska, Canada, Scandinavie, régions Nord de l'Europe, de l'Asie et du Japon). *C. botulinum* C et D dont la température optimum de croissance se situe autour de 40°C et qui sont exigeants en matière organique, sont localisés essentiellement dans des zones riches en matière organique des pays chauds (régions tropicales, régions tempérées en saison chaude). Les cadavres d'animaux morts de botulisme ou porteurs de *C. botulinum* dans leur tube digestif, sont les principaux réservoirs de ces micro-organismes (Popoff, 1995; Popoff and Marvaud, 1999).

Toxines botuliques et complexes botuliques

Les neurotoxines botuliques (BoNT) sont synthétisées sous forme d'une seule chaîne protéique de 150 kDa environ qui est peu ou non toxique. Ces protéines ne possèdent pas de séquence signal, et leur sécrétion intervient par un processus encore mal défini indépendant de la lyse bactérienne. L'activation des neurotoxines fait intervenir une protéolyse qui clive la protéine précurseur dans son tiers N-terminal en deux fragments dénommés chaîne légère (environ 50 kDa) et chaîne lourde (environ 100 kDa). Les deux chaînes restent réunies par un pont disulfure. Les souches protéolytiques de *C. botulinum* secrètent une protéase capable d'activer les neurotoxines à l'extérieur de la bactérie. L'activation peut avoir lieu également par des protéases d'origine digestives. La trypsine, par exemple, permet d'activer efficacement les BoNT.

Les BoNT sont associées à d'autres protéines non toxiques pour former des complexes de grande taille. Ces protéines comprennent une protéine appelée non toxique non hémagglutinine (NTNH) qui a une taille proche de celle des neurotoxines (139 kDa) et des protéines qui ont une activité hémagglutinante (HA) dont les tailles sont 34, 17 et 70 kDa chez *C. botulinum* A. La neurotoxine s'associe à NTNH pour former des complexes de taille moyenne (300 kDa) (M), et leur association aux HA est à l'origine des complexes de grande taille (500 kDa) (L). Des complexes de très grande taille (900 kDa) (LL), observés notamment chez *C. botulinum* A, résultent d'une dimérisation des complexes L. Les protéines NTNH sont très conservées au niveau de leur séquence en acides aminés (70-80% d'identité) et elles présentent peu d'homologie avec les BoNT (31-39% d'identité). Toutefois, les 100 premiers acides aminés des protéines NTNH sont les plus apparentés aux acides aminés correspondants des BoNT ce qui pourrait rendre compte de la liaison NTNH-neurotoxine. Le rôle des complexes est encore mal compris. Ils pourraient protéger les BoNT vis à vis des conditions dénaturantes, telles que acidité de l'estomac et protéases digestives.

Mode d'action des toxines botuliques

Le mode d'action moléculaire des neurotoxines clostridiennes qui ont pour effet le blocage de la libération des neuromédiateurs par les neurones affectés, fait intervenir quatre étapes: liaison à un récepteur sur la terminaison amyélinique de l'axone des neurones, internalisation, translocation à travers la membrane des vésicules d'endocytose et modification enzymatique d'une cible intracellulaire (revues dans (Schiavo *et al.*, 2000; Popoff and Carlier, 2001; Meunier *et al.*, 2002; Poulain *et al.*, 2006)).

Liaison au récepteur

Les toxines botuliques transitent par le tube digestif, traversent la barrière intestinale par un mécanisme encore mal compris, puis diffusent par le sang et/ou la lymphe jusqu'aux motoneurones où elles se fixent sur les extrémités non myélinisées de leur axone. Un modèle de double récepteur comprenant une glycoprotéine et un ganglioside tels que G_{D1B} , G_{T1B} et G_{Q1B} a été proposé. Des protéines de la membrane des vésicules synaptiques ont été identifiées comme étant les récepteurs spécifiques, SV2C pour la neurotoxine botulique A et la synaptotagmine 1 et 2 pour les types de toxine botulique B et G (Nishiki *et al.*, 1996; Rummel *et al.*, 2004; Mahrhold *et al.*, 2006).

Internalisation

Les neurotoxines clostridiales ne traversent pas directement la membrane cytoplasmique. Elles sont internalisées par endocytose dans des compartiments intracellulaires acides. Les neurotoxines seraient internalisées dans des vésicules synaptiques, au cours du recyclage exocytose/endocytose. En effet les vésicules synaptiques, après leur phase d'exocytose libérant le neuromédiateur dans la fente synaptique, sont recyclées par endocytose et c'est au cours de cette étape que les protéines membranaires, SV2C et synaptotagmine, sont exposées à l'extérieur et sont capables d'interagir avec les neurotoxines. Cependant, la nature des vésicules permettant l'endocytose des neurotoxines botuliques restes à préciser.

Translocation dans le cytosol

Une fois internalisée dans des vésicules d'endocytose à l'extrémité des motoneurones, la chaîne légère traverse la membrane vésiculaire pour être libérée dans le cytosol. Les chaînes lourdes insérées dans la membrane vésiculaire formeraient un sillon hydrophile. La chaîne légère, partiellement dépliée sous l'effet du pH acide, s'engagerait dans ce sillon, sa partie hydrophile du côté des chaînes lourdes et sa partie hydrophobe faisant face aux lipides membranaires.

Blocage de la libération d'acétylcholine

Les neurotoxines botuliques sont des protéases à zinc qui clivent une des trois protéines formant les complexes SNAREs qui ont un rôle clé dans le processus de fusion membranaire entre les vésicules synaptiques et la membrane présynaptique. Les neurotoxines botuliques B, D, F et G clivent la protéine VAMP, les neurotoxines botuliques A et E clivent SNAP25 et la neurotoxine botulique C1 clive à la fois la syntaxine et SNAP25. Les neurotoxines clivent leurs substrats quand ils sont sous forme monomérique et non quand ils sont associés dans le complexe SNARE. Lorsqu'une des trois protéines VAMP, SNAP25 ou la syntaxine est clivée par une neurotoxine clostridienne, elle peut former des complexes SNAREs, mais ceux-ci ne sont pas fonctionnels. La fusion des vésicules avec la membrane présynaptique n'intervient alors pas et il n'y a pas de libération de neuromédiateur. Comme les protéines SNAREs sont recyclées entre forme monomérique et oligomérique, les neurotoxines clivent progressivement la totalité de leur substrat. Mais, les signes cliniques apparaissent bien avant. Chez l'animal, une inhibition de libération d'acétylcholine de 20% au niveau de la jonction neuromusculaire est suffisante pour empêcher la contraction musculaire. De plus, quand 10-15% des fibres musculaires du diaphragme sont paralysées, des troubles respiratoires avec asphyxie surviennent. Ceci rend compte de l'extrême activité toxique des neurotoxines clostridiennes.

Formes de botulisme

Le botulisme humain est dû aux neurotoxines de type A, B et E produites par *C. botulinum* et *C. butyricum*, et exceptionnellement aux types C et F. Le tableau clinique est dominé par une paralysie neuro-musculaire sans anomalie du système nerveux sensitif. Selon le mode d'acquisition, on distingue trois principales formes de botulisme: intoxication botulique, toxoinfection botulique, et botulisme par blessure.

L'intoxication botulique survient après consommation d'aliments dans lesquels un *Clostridium* neurotoxigène s'est développé et a produit des quantités suffisantes de toxine. Il s'agit d'aliments conservés, présentant des conditions d'anaérobiose, non acides (pH > 4,5), et ayant une faible teneur en sel ou sucre. L'ingestion de toxine préformée dans l'aliment est responsable de l'ensemble des symptômes. C'est la cause la plus commune de botulisme d'origine alimentaire chez l'adulte. Il survient sous forme de cas isolés ou de foyers plus ou moins étendus (deux à plus d'une centaine de personnes).

L'ingestion de spores ou de formes végétatives de *Clostridium* neurotoxigènes peut dans certaines circonstances, s'accompagner d'une multiplication bactérienne et de production de toxine dans le contenu intestinal. Habituellement, la flore digestive résidente prévient la colonisation de l'intestin par une bactérie étrangère apportée par l'alimentation. Chez les jeunes enfants, une flore digestive incomplètement constituée ou partiellement fonctionnelle, peut permettre l'implantation de *Clostridium* neurotoxigènes dans l'intestin, c'est le botulisme infantile qui s'observe chez des enfants de moins d'un an avec 95,6% des cas intervenant entre 6 semaines et 6 mois (Brook, 2007). Selon, diverses enquêtes épidémiologiques, une dizaine à une centaine de spores de *C. botulinum* sont suffisantes pour causer la maladie chez un jeune enfant (Arnon, 1986).

La toxi-infection botulique survient aussi chez les adultes. Les facteurs prédisposant tels que chirurgie intestinale, antibiothérapie, inflammation chronique, lésions chroniques de la muqueuse intestinale, ou anomalies anatomiques ou fonctionnelles de l'intestin permettraient la croissance de *Clostridium* neurotoxigènes dans le tube digestif, ainsi que la production de toxine *in situ*. Cette forme de botulisme est suspectée en l'absence de consommation d'aliment à risque ou de blessure. Elle se caractérise par une excrétion prolongée de *C. botulinum* et sa toxine dans les selles.

Les plaies peuvent être colonisées par *C. botulinum* et provoquer l'apparition d'un botulisme. Cependant, l'incidence du botulisme par blessure est beaucoup moins fréquente que celle du tétanos. Ce mode de contamination est analogue à celui du tétanos ou d'une gangrène à *Clostridium*. Le botulisme par blessure était extrêmement rare jusqu'aux années 1990. Depuis, son incidence s'est significativement accrue aux Etats Unis puis en Europe à compter des années 2000, et de façon presque exclusive chez les utilisateurs de drogue par injection. Les personnes à risque sont essentiellement les utilisateurs d'héroïne (black tar heroin) par injection intramusculaire ou sous-cutanée et non intraveineuse.

Botulisme humain en France

L'intoxication alimentaire est de loin la forme de botulisme la plus fréquente en France. Trois cas seulement de botulisme infantile ont été diagnostiqués (un cas de type A et deux de type B entre 2004 et 2006) (Carlier *et al.*, 2007). Aucun cas de botulisme par blessure n'a été répertorié, mais deux formes de botulisme de type B ont été identifiées chez deux jeunes toxicomanes à la suite d'inhalation de cocaïne en 2006 (Roblot *et al.*, 2006).

Dans la période 1956-1970, les analyses réalisées pour le diagnostic du botulisme à l'Institut Pasteur, indiquent une incidence de cette intoxication d'environ 22 cas par an dont 5% s'accompagnaient de mortalité.

Aux cours des années suivantes, de 1971 à 1978, on enregistre un nombre nettement plus élevé des cas de botulisme avec une moyenne annuelle d'environ 70 cas par an. Cette apparente recrudescence de botulisme est liée à une amélioration du diagnostic de cette affection à compter de 1971. En effet, le dépistage de la toxine botulique était réalisé dans le sérum des malades et non plus uniquement dans les aliments suspects, qui souvent n'étaient plus disponibles après survenue d'un foyer de botulisme (Sebald and Saimot, 1973). Au cours de la période 1956-1979,

La grande majorité des cas sont de type B, et l'aliment responsable est le plus souvent un jambon de préparation familiale ou artisanale (63,7% des foyers). Dans 30 foyers (7%) représentant plus de 110 cas (plus de 12%) dont 6 décès, le botulisme était dû à un aliment du commerce ou était survenu dans un restaurant ou cantine. Les aliments incriminés étaient: jambon, saucisses, andouillettes, anchois, crabe, crevettes, fromages, asperges, poires, paëlla ...) (Sebald *et al.*, 1980).

A compter de 1979 jusqu'à nos jours, l'incidence des cas confirmés de botulisme reste stable aux alentours de 20-30 cas annuels (Tableau 2). Par contre, la mortalité due au botulisme a diminué progressivement et est actuellement exceptionnelle. Le type B est le plus commun, et c'est la forme la plus bénigne de botulisme comparée au type A ou E. Il faut souligner que si cette maladie est rare (environ 5 cas pour 100 000 habitants), elle reste une maladie grave qui peut être rapidement mortelle. Un rapport de 1994 fait état que les cas déclarés de botulisme représenteraient 25 à 50 % des cas réels par suite de méconnaissance et de non diagnostic ou de non déclaration de cette affection (Roblot *et al.*, 1994). Mais les événements récents de bioterrorisme dont la toxine botulique est considérée comme l'une des principales armes potentielles, et l'utilisation thérapeutique de cette toxine de plus en plus répandue ont apporté une plus grande sensibilisation du milieu médical au botulisme. De ce fait, le botulisme est mieux pris en compte dans le diagnostic différentiel des affections nerveuses de type paralysie flasque. Ainsi, l'incidence annuelle du botulisme enregistrée ces dernières années reflèterait d'avantage la réalité.

Malgré les changements d'habitudes alimentaires au cours de ces dernières décennies marquées notamment par une diminution progressive des conserves familiales, le botulisme ne tend pas à disparaître en France. Par contre, les aliments d'origine commerciale sont de plus en plus impliqués ou suspectés. Ainsi, la proportion d'aliments du commerce responsables de botulisme était de 7% dans la période 1956-1979, 10% dans la période 1991-1995, et 24% dans la période 1996-2000 (Sebald *et al.*, 1980; Haeghebaert *et al.*, 2002). Les jambons et autres charcuteries qui restent une des principales causes de botulisme en France sont de plus en plus préparés par des charcutiers artisanaux ou industriels, et commercialisés. Les nouvelles techniques de conservation des aliments, comme produits non traités par la chaleur ou à une température en dessous du seuil sporicide et conservés sous vide, réfrigérés, ou stockés à température ambiante, sont favorables à une croissance de *C. botulinum* du group II. Parmi des foyers récents de botulisme dus à des produits industriels, citons une soupe de poisson commercialisée en tétrapack et contaminée par *C. botulinum* A en 1999, et des saucisses à base de viande de poulet responsable d'un botulisme B chez une dizaine de personnes en 2003. Si des foyers étendus de botulisme ont été observés à l'étranger, les produits commercialisés sont le plus souvent à l'origine de cas isolés en France. En effet, la contamination par *C. botulinum* est généralement très hétérogène. Le plus souvent pas plus de 2 à 8% des unités d'un lot de production sont contaminées rendant compte du faible nombre de personnes atteintes lors de distribution commerciale d'un produit contaminé (Lund and Peck, 2000).

Le botulisme de type E est relativement rare en France. Le vecteur est généralement des marinades de poissons ou des produits de la mer. Un cas de botulisme E survenu en 2002 a été attribué à la consommation d'une confiture de châtaigne faite maison dont l'expertise a révélée la présence de toxine botulique E. Malheureusement, la recherche de *Clostridium* toxinogène fut infructueuse. Ce type d'aliment est plus volontiers contaminé par *Clostridium butyricum* dont certaines souches produisent une neurotoxine de type E et sont responsables de botulisme humain, notamment en Chine (Meng *et al.*, 1997).

CONCLUSION

Actuellement, le botulisme est relativement rare chez l'homme, mais plus commune chez les animaux, notamment les animaux d'élevage comme les volailles. Cette affection grave due à des bactéries de l'environnement produisant de puissantes toxines, nécessite une surveillance attentive et renforcée pour une meilleure compréhension de son épidémiologie et mettre en oeuvre des mesures de prévention et de contrôle adaptées.

Références

- Arnon, S.S. (1986). Infant botulism: anticipating the second decade. *J. Infect. Dis.* 154, 201-206.
- Brook, I. (2007). Infant botulism. *J Perinatol* 27, 175-180.
- Carlier, J.P., Espié, E., and Popoff, M.R. (2007). Le botulisme en France, 2003-2006. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* 31-32, 281-284.
- Haeghebaert, S., Popoff, M.R., Carlier, J.P., Pavillon, G., and Delarocque-Astagneau, E. (2002). Caractéristiques épidémiologiques du botulisme humain en France, 1991-2000. *Bul. Epidemiol. Hebdo.* 14, 57-59.
- Lund, B.M., and Peck, M.W. (2000). *Clostridium botulinum*. In: *The Microbiology Safety and Quality of Food*, vol. II, eds. B.M. Lund, T.C. Baird-Parker, and G.W. Gould, Gaithersburg MD: Aspen Publishers, 1057-1109.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett* 580, 2011-2014.
- Meng, X., Karasawa, T., Zou, K., Kuang, X., Wang, X., Lu, C., Wang, C., Yamakawa, K., and Nakamura, S. (1997). Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2160-2162.
- Meunier, F.A., Herreros, J., Schiavo, G., Poulain, B., and Molgo, J. (2002). Molecular mechanism of action of botulinum neurotoxins and the synaptic remodeling they induce in vivo at the skeletal neuromuscular junction. In: *Handbook of Neurotoxicology*, vol. 1, ed. J. Massaro, Totowa, NJ: Humana Press, 305-347.
- Nishiki, T., Tokuyama, Y., Kamata, Y., Nemoto, Y., Yoshida, A., Sato, K., Sekiguchi, M., Taakahashi, M., and Kozaki, S. (1996). The high-affinity of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides G_{T1B}/G_{D1a}. *FEBS Lett.* 378, 253-257.
- Popoff, M.R. (1995). Ecology of neurotoxicogenic strains of Clostridia. In: *Clostridial neurotoxins*, vol. 195, ed. C. Montecucco, Heidelberg: Springer-Verlag, 1-29.
- Popoff, M.R., and Carlier, J.P. (2001). Botulisme, épidémiologie, approches thérapeutiques et préventives, utilisation thérapeutique des neurotoxines. *Antibiotiques* 3, 149-162.
- Popoff, M.R., and Marvaud, J.C. (1999). Structural and genomic features of clostridial neurotoxins. In: *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, vol. 2, eds. J.E. Alouf and J.H. Freer, London: Academic Press, 174-201.
- Poulain, B., Stiles, B.G., Popoff, M.R., and Molgo, J. (2006). Attack of the nervous system by clostridial toxins: Physical findings, cellular and molecular actions. In: *The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, eds. J.E. Alouf and M.R. Popoff, Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 348-389.
- Roblot, F., Popoff, M., Carlier, J.P., Godet, C., Abbadie, P., Matthis, S., Eisendorn, A., Le Moal, G., Becq-Giraudon, B., and Roblot, P. (2006). Botulism in patients who inhale cocaine: the first cases in France. *Clin Infect Dis* 43, e51-52.
- Roblot, P., Roblot, J.L., Fauchère, J.L., Devilleger, A., Maréchaud, R., Breux, J.P., Grollier, G., and Becq-Giraudon, B. (1994). Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers France. *J. Med. Microbiol.* 40, 379-384.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004). Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279, 30865-30870.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 80, 717-766.
- Sebald, M., Billon, J., Cassaigne, R., Rosset, R., and Poumeyrol, G. (1980). Le botulisme en France. Incidence, mortalité, aliments responsables avec étude des foyers dus à un aliment qui n'est pas de préparation familiale. *Med. Nut.* 16, 262-268.
- Sebald, M., and Saimot, G. (1973). Le diagnostic biologique du botulisme. *Med. Mal. Inf.* 3, 83-85.

Le botulisme aviaire : données épidémiologiques du RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture)

**Dr Rozenn SOUILLARD, Jean Yves TOUX,
Dr Sophie LEBOUQUIN, Virginie MICHEL.**
AFSSA - UNITE EPIDEMIOLOGIE ET
BIEN - ETRE EN AVICULTURE ET CUNICULTURE

Résumé

Depuis sa création en 1987, le RNOEA (Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture) animé par l'Unité EBEAC (Epidémiologie et Bien - Etre en Aviculture et Cuniculture) de l'AFSSA Ploufragan, permet de surveiller l'évolution épidémiologique des maladies aviaires en France, en collectant les diagnostics transmis de manière volontaire par les vétérinaires correspondants du Réseau. Au cours de l'année 2007, une recrudescence des cas de botulisme signalés au RNOEA a été observée. En effet, de 1989 à 2006, le nombre maximal de cas de botulisme signalés annuellement au RNOEA a été de 28 cas en 2006. Ce nombre a fortement augmenté en 2007, puisque 121 cas de botulisme ont été signalés au RNOEA durant l'année. La particularité des signalements de botulisme en 2007 est qu'ils sont restés fréquents pendant les mois d'automne, alors que les années précédentes la saisonnalité avait été très marquée en été. Par ailleurs, les dindes et les poulets sont les 2 productions avicoles les plus touchées par le botulisme. De 1997 à 2006, les dindes étaient plus concernées par cette infection que les poulets (50 cas de botulisme signalés chez les dindes et 39 cas chez les poulets pendant ces 10 années). Mais au cours de l'année 2007, cette tendance s'est inversée, puisque le poulet est devenu la production avicole la plus touchée par le botulisme (57 cas signalés chez le poulet et 42 cas chez la dinde en 2007). Concernant les toxines botuliques, les toxines C et D sont les types les plus fréquemment identifiés en 2007, comme cela était déjà le cas les années précédentes. La surveillance épidémiologique des élevages avicoles se poursuit grâce à la participation des vétérinaires correspondants du RNOEA.

Introduction

Le RNOEA, Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture, créé en 1987 et animé par l'unité EBEAC de l'AFSSA Ploufragan, est un réseau d'épidémiosurveillance qui permet de suivre l'évolution épidémiologique des maladies aviaires en France, grâce à la participation volontaire des correspondants vétérinaires spécialisés en aviculture.

Au cours de l'année 2007, une recrudescence des signalements de botulisme a été observée via le RNOEA. Le botulisme est une infection majeure en aviculture entraînant des pertes économiques importantes dans les élevages atteints et présentant un risque de contamination humaine. Grâce aux données transmises par les vétérinaires correspondants du RNOEA, une synthèse des signalements de botulisme a été réalisée par les gestionnaires du Réseau. L'évolution du nombre de signalements de botulisme depuis 1989, les productions avicoles concernées par cette maladie et les types de toxines botuliques identifiées sont ainsi présentés.

Matériel et méthode

Les données collectées par le RNOEA proviennent des observations transmises de manière volontaire par 50 vétérinaires adhérents du Réseau. La répartition géographique des correspondants est nationale, même si la majorité d'entre eux est localisée dans le Grand Ouest de la France : 42% en Bretagne et 18% dans les Pays de la Loire, les 2 principales régions avicoles Françaises. Le nombre de 50 correspondants participants au RNOEA est resté globalement stable depuis 1990.

Tous les 2 mois, les correspondants transmettent aux gestionnaires du RNOEA le relevé des observations réalisées au cours de leur activité, quelles que soient les productions avicoles concernées (dindes, poulets, poules pondeuses, pintades, canards, oies, gibier). La transmission de ces données est basée sur le volontariat. Pour cela, les correspondants remplissent un questionnaire mensuel sur lequel ils indiquent pour chaque maladie observée en élevage : sa localisation (le département), la production avicole concernée et le nombre de troupeaux atteints.

Pour chaque production avicole, un bilan de l'ensemble des maladies signalées par les correspondants est réalisé annuellement. Dans une production considérée, pour chaque maladie, le nombre de signalements collectés dans l'année correspond au nombre de troupeaux suivis par les correspondants du RNOEA et atteints par la maladie.

Ainsi, une synthèse du nombre de troupeaux de volailles atteints de botulisme a été réalisée à partir des signalements transmis par les correspondants du RNOEA depuis 1989.

Résultats

◆ Evolution du nombre de cas de botulisme signalés au RNOEA depuis 1989

Jusqu'en 1991, le botulisme était une maladie rarement signalée par les correspondants du RNOEA : 4 à 5 cas par an (Figure 1). Par la suite, le nombre de signalements de botulisme a augmenté de manière régulière pour atteindre une vingtaine de cas entre 1995 et 1998. Puis, depuis 2000, le nombre de signalements a diminué jusqu'à 3 cas signalés en 2004.

C'est depuis l'année 2005 qu'une recrudescence des cas de botulisme a été observée au sein du RNOEA : de 3 cas collectés en 2004, ce nombre a régulièrement augmenté en passant à 12 cas en 2005 et à 28 cas en 2006. Puis, une explosion des cas de botulisme a été observée en 2007 : 121 cas de botulisme ont été collectés dans l'année par le RNOEA. Le nombre de cas de botulisme a été multiplié par 4 en un an, entre 2006 et 2007.

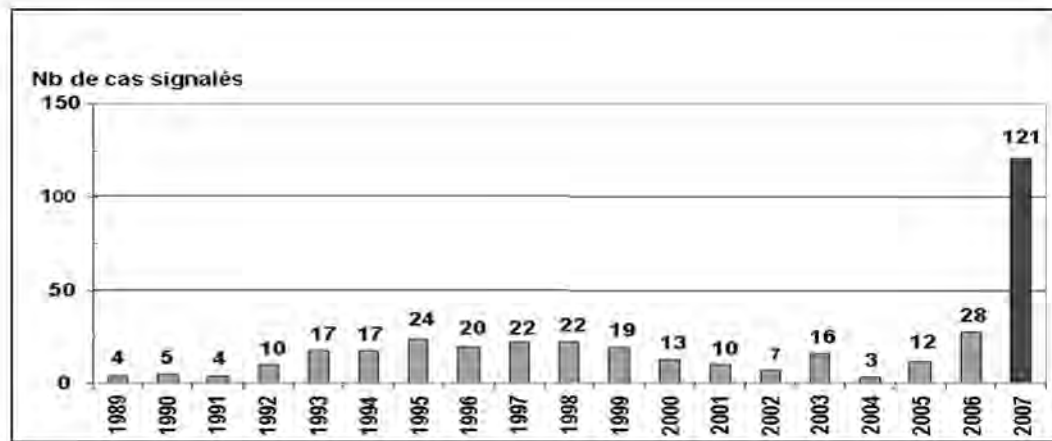


Figure 1 : Evolution du nombre de signalements annuels de botulisme transmis au RNOEA entre 1989 et 2007

♦ La saisonnalité des cas de botulisme signalés au RNOEA

Une saisonnalité marquée des signalements de botulisme est observée pendant les mois d'été (Figure 2). Entre 1997 et 2006, plus de 30 cas ont été signalés chaque mois en juillet, août et septembre. Une progression a été observée au printemps, puisque 5 cas ont été signalés en avril, 10 cas mai et 14 en juin. Une diminution du nombre de cas a lieu à l'automne : de 30 cas en septembre, les signalements de botulisme sont passés à 6 cas en octobre, 5 cas en novembre et 2 cas en décembre. Ainsi, 61,2% des cas de botulisme signalés au RNOEA entre 1997 et 2006 ont été observés pendant les mois d'été et 8,5% des cas à l'automne.

Au cours de l'année 2007, cette même saisonnalité a été observée : plus de 20 cas ont été signalés chaque mois en juillet, août et septembre 2007. Cependant, contrairement aux années précédentes, le nombre de cas de botulisme est resté élevé à l'automne 2007, puisque 19 cas ont encore été collectés en octobre et 10 cas en novembre. En effet, 56% des cas de botulisme signalés au RNOEA en 2007 ont été observés pendant les mois d'été et 25,6 % des cas à l'automne.

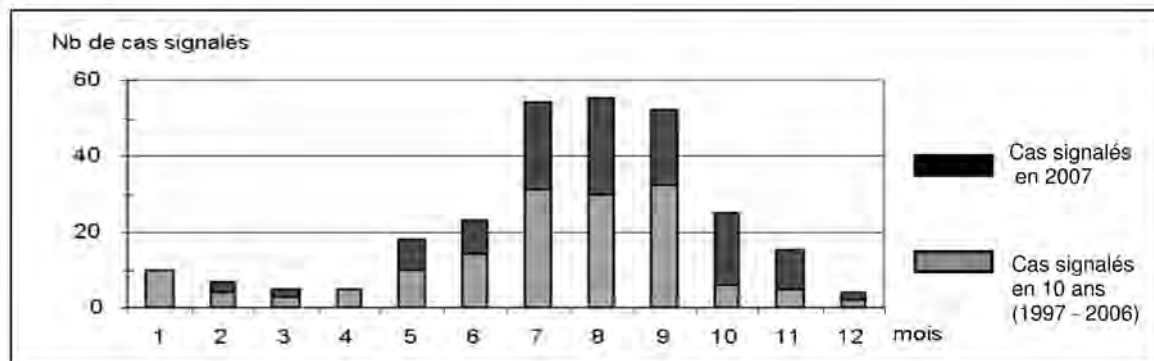
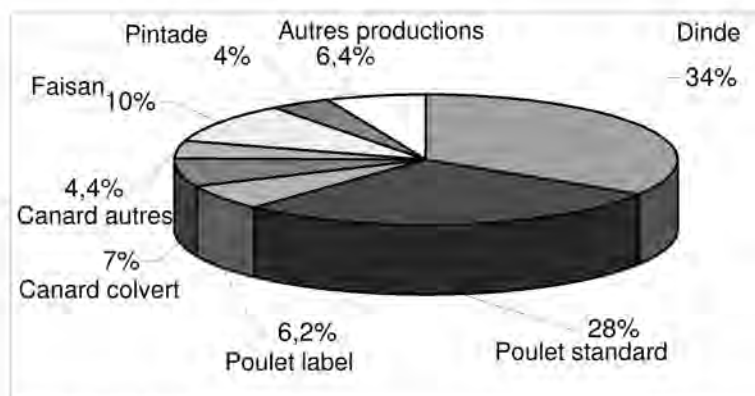


Figure 2 : Répartition mensuelle des signalements de botulisme transmis au RNOEA entre 1997 et 2007

◆ Les productions avicoles concernées par les signalements de botulisme au RNOEA

Les dindes et les poulets sont les 2 productions avicoles les plus concernées par les signalements de botulisme transmis au RNOEA entre 1997 et 2007 (Figure 3) : 34% des cas de botulisme collectés entre 1997 et 2007 ont été signalés chez la dinde et 34.2% chez le poulet (28% chez le poulet standard et 6.2% pour le poulet label). Les autres productions avicoles sont moins touchées par la maladie : 11,4 % des cas de botulisme collectés par le RNOEA concernent les canards (7% les canards colvert et 4.4% les autres canards), 10% les faisans et 4 % les pintades.

Figure 3 : Répartition des signalements de botulisme transmis au RNOEA entre 1997 et 2007



selon les productions avicoles concernées.

Les nombres de cas de botulisme signalés au RNOEA en 2007 et au cours des 10 années précédentes (de 1997 à 2006) selon les productions avicoles touchées ont été comparés (Figure 4). On observe que la recrudescence des cas de botulisme observée en 2007 concerne plus particulièrement les poulets, devenant en 2007 plus touchés que les dindes par le botulisme. En effet, chez les poulets, alors que 39 cas de botulisme avaient été signalés entre 1997 et 2006 (30 cas chez les poulets standards et 9 cas chez les poulets labels), au cours de la seule année 2007, 57 cas ont été observés (47 cas chez les poulets standards et 10 cas chez les poulets label). Ainsi, entre 1997 et 2006, 25,6% des cas de botulisme concernaient le poulet, et en 2007, ce pourcentage a été de 47%.

On observe également dans une moindre mesure cette même évolution dans la production pintades, puisque seulement 3 cas de botulisme avaient été signalés en 10 ans (2% des cas signalés) et au cours de l'année 2007, 9 cas ont été transmis par les correspondants du RNOEA dans cette production (7,5% des cas signalés).

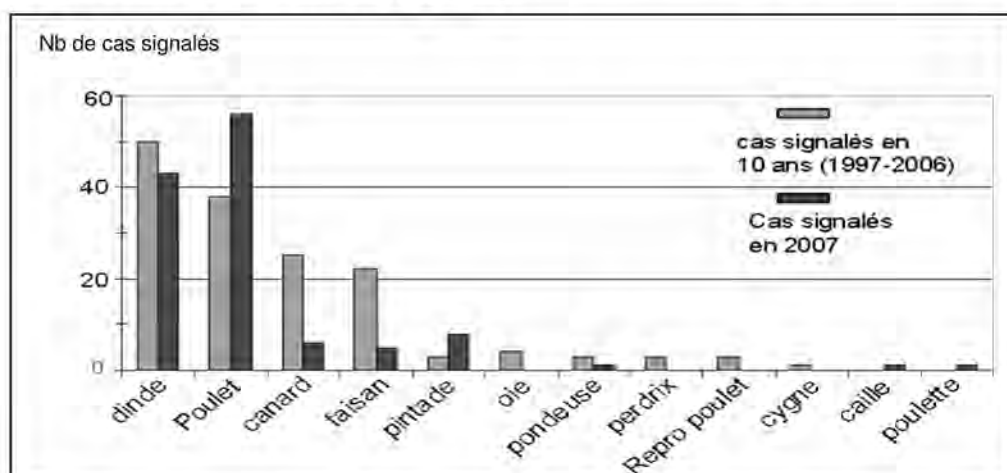
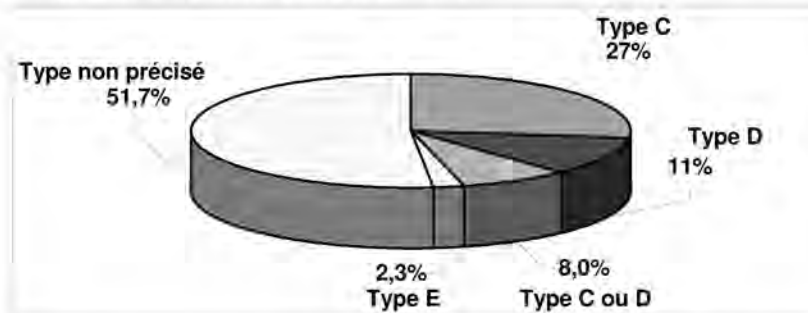


Figure 4 : Nombres de cas de botulisme signalés au RNOEA de 1997 à 2006 et en 2007 selon les productions avicoles concernées.

◆ Les types de toxines botuliques identifiées dans les cas de botulisme signalés au RNOEA :

Dans plus de la moitié des cas de botulisme signalés au RNOEA entre 1997 et 2007 (51,7%), le type de la toxine botulique n'a pas été précisé par les correspondants (Figure 5). La toxine la plus fréquemment signalée est la toxine C, identifiée dans 27 % des cas de botulisme. La toxine D est identifiée dans 11 % des cas et la toxine E est très rarement signalée (2,3% des cas de botulisme). Par ailleurs, dans 8% des cas de botulisme signalés au RNOEA, la distinction entre les toxines C et D n'a pas été précisée par les correspondants.

Figure 5 : Répartition des signalements de botulisme transmis au RNOEA entre 1997 et 2007 selon les types de toxines botuliques identifiées.



Les nombres de signalements de botulisme collectés en 2007 et au cours des 10 années précédentes selon les types de toxines identifiées ont été comparés (Figure 6). Comme pour les 10 années précédentes, dans plus de la moitié des cas de botulisme signalés au RNOEA en 2007 (52%), la toxine botulique n'a pas été précisée (63 cas de types botuliques non précisés en 2007 parmi les 121 cas de botulisme signalés). Les toxines les plus fréquemment signalées en 2007 restent les types C et D, comme les années précédentes. Au cours de l'année 2007, 29 cas de botulisme de type C ont été signalés, 15 cas de botulisme de type D et 14 cas de botulisme dont les types C ou D n'ont pas été distingués. Par ailleurs, aucune toxine de type E n'a été signalée en 2007, alors que 6 cas avaient été transmis entre 1997 et 2006 par les correspondants du RNOEA (1 cas en 1997, 3 cas en 1998, 1 cas en 2000 et 1 cas en 2001).

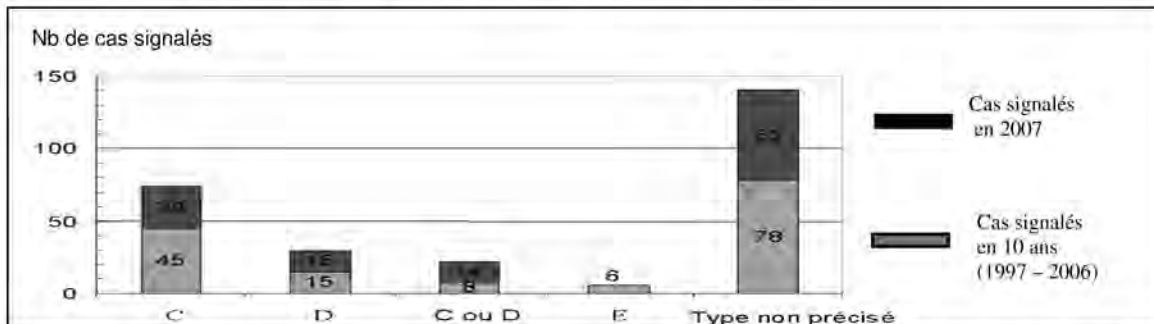


Figure 6 : Nombres de cas de botulisme signalés au RNOEA de 1997 à 2006 et en 2007 selon les types de toxines identifiées.

Conclusion

Grâce aux données transmises par les correspondants du RNOEA, la recrudescence des cas de botulisme observée en 2007 dans les élevages de volailles français a pu être détectée et décrite (saisonnalité de la maladie, productions avicoles concernées et type de toxines identifiées). La surveillance épidémiologique du botulisme dans les élevages avicoles en 2008 se poursuit, avec notamment l'envoi d'un questionnaire épidémiologique aux vétérinaires correspondants du réseau permettant de mieux décrire les cas de botulisme rencontrés sur le terrain. Les informations, transmises de manière volontaire par les correspondants au RNOEA, ne sont pas exhaustives, mais elles fournissent, une image descriptive et évolutive de la situation sanitaire des élevages de volailles en France. Depuis la création du RNOEA en 1987, l'émergence de diverses maladies ou agents pathogènes a ainsi pu être observée, notamment celle d'*Ornithobacterium rhinotracheale* en 1995 et de l'histomonose en 2002. La poursuite de l'animation du RNOEA permet de surveiller l'évolution épidémiologique des maladies dans les élevages de volailles français.

SENSIBILITE DES GERMES BACTERIENS D'ORIGINE AVIAIRE AUX ANTIBIOTIQUES : DONNEES TERRAIN RECENTES ET EVOLUTION

Dr Jean DELAPORTE et Gilbert INIZAN
BAYER SANTE ANIMALE

Depuis le début de la commercialisation de l'enrofloxacin pour le traitement des animaux de rente et plus particulièrement le traitement des dindes et poulets de chair (1992), nous collectons chaque année les résultats d'antibiogrammes réalisés par les principaux laboratoires d'analyses vétérinaires.

Le premier objectif est d'avoir chaque année un état précis des sensibilités des bactéries à l'enrofloxacin et aux autres antibiotiques dans les différentes espèces des productions animales.

Le deuxième objectif est de suivre l'évolution dans le temps de la sensibilité des bactéries à notre molécule et aux autres antibiotiques couramment prescrits.

Selon la présentation des résultats, les interprétations et conclusions peuvent être sinon différentes au moins nuancées.

Ainsi la comparaison annuelle des résultats d'antibiogrammes sous forme d'histogrammes ne montre pas de différences notables. C'est une approche globale par la différenciation de 3 groupes :

- Sensible : forte probabilité de succès thérapeutique
- Résistant : forte probabilité d'échec thérapeutique
- Intermédiaire : succès thérapeutique imprévisible

Cette présentation ne permet pas d'évaluer l'évolution.

Par contre, la présentation des résultats par répartition de diamètre permet une interprétation beaucoup plus fine.

Ainsi, dans le groupe « sensible », nous pouvons avoir des germes très sensibles et d'autres moins dont les diamètres d'inhibition se rapprochent de la zone « intermédiaire ». Dans le groupe « intermédiaire », certains diamètres seront proches ou éloignés de la zone « sensible ».

Cette présentation permet aussi de mettre en évidence par la répartition des diamètres l'existence des groupes distincts au sein d'une même population de germes qui conduira à la notion de population unimodale, bimodale ou multimodale.

La pluralité des groupes au sein d'une même population traduit l'évolution d'une population. Une population bimodale au sein du groupe sensible, signifie que la sensibilité d'une partie de cette population est en train d'évoluer et de devenir moins sensible.

La connaissance de la situation actuelle de la sensibilité des germes est essentielle car c'est un critère important dans le choix de l'antibiotique lors de la prescription. Aussi, nous devons nous préoccuper de l'évolution de la sensibilité des germes aux antibiotiques et nous devons tout faire pour préserver le plus longtemps possible la plus grande sensibilité.

Cela passe par une approche thérapeutique raisonnée et une utilisation responsable des antibiotiques et plus particulièrement pour les Fluoroquinolones.

C'est pour cette raison que le concept de la Concentration de Prévention des Mutants est très intéressant pour les Fluoroquinolones. Il consiste à prescrire des doses nécessaires d'antibiotiques pour obtenir une concentration de l'antibiotique capable d'empêcher l'émergence et surtout la multiplication des bactéries mutantes.

L'arrivée de multiples génériques de Fluoroquinolones sur le marché français risque de se traduire par une utilisation moins raisonnée, donc moins responsable. Une utilisation accrue et le non respect du concept de la Concentration de Prévention des Mutants augmenteront le risque d'apparition rapide des résistances.

Si cette éventualité devait se confirmer, dans le contexte européen d'utilisation raisonnée des Fluoroquinolones, elle pourrait être à l'origine d'une remise en question de l'utilisation des Fluoroquinolones en médecine vétérinaire.

Maintien des coccidiostatiques et histomonostatiques sous la réglementation actuelle des additifs en alimentation animale

Gilbert LEBAS
LILLY FRANCE-ELANCO

Le Règlement (UE) 1831/2003 permettait la possibilité de reconsidérer le statut futur des coccidiostatiques en vue de leur éventuelle élimination à terme en tant qu'additifs. La Commission Européenne devait réaliser un rapport au Parlement et au Conseil européens. A l'heure qu'il est en avril 2008, ce rapport serait achevé et recommanderait le maintien de la réglementation régissant les coccidiostatiques. La situation devrait donc normalement rester en l'état et les coccidiostatiques maintenus sous le régime 1831/2003 des additifs en alimentation animale. Une action collective des professionnels a été menée dans les pays membres et au niveau des institutions européennes dans un esprit de partenariat des différents métiers des filières afin de présenter un argumentaire cohérent et solide, seul capable de donner lieu à une décision équilibrée et un statut réglementaire durable au bénéfice de tous.

Ci après sont résumés les points clefs du débat : causes et coûts de la maladie, moyens de lutte disponibles et enfin appréciation du bénéfice et des risques à l'intention des experts et du législateur et sa conclusion : pour une protection adéquate de la santé publique et du bien-être animal à moindre coût pour les filières.

La coccidiose est bien connue des professionnels de la volaille : c'est un hôte protozoaire parasite spécifique du genre *Eimeria*, très répandu dans l'environnement. Il peut être transporté dans sa forme sporulée chez l'oiseau et est très résistant dans le milieu extérieur et aux désinfectants, ce qui le rend quasiment impossible à éradiquer. Une fois ingérée par l'hôte, la coccidie envahit rapidement les tissus intestinaux, se multiplie massivement et est excrétée en oocystes qui vont réinfecter les animaux par la litière et les bâtiments environnants.

En l'absence de traitement, l'effet sur l'hôte peut aller d'une inflammation intestinale bénigne qui va provoquer un ralentissement de la croissance à des diarrhées hémorragiques entraînant des mortalités, selon la gravité de l'infection et les espèces concernées. La coccidiose a un impact considérable sur le bien-être animal à cause de la morbidité et de la mortalité associées directement par la coccidiose et indirectement à cause des pathologies secondaires. Chez les poulets et moins souvent chez les dindes, une mortalité de 5-6% à 12-15% et une morbidité pouvant aller jusqu'à 100% peut être enregistrée au cours de graves épidémies de coccidiose clinique. La mortalité et la morbidité sont également aggravées lorsque la coccidiose agit en synergie avec les maladies affaiblissant l'immunité, comme la maladie de Marek. La morbidité affecte directement le bien-être des oiseaux par les souffrances dues à la maladie, mais également par le fait que des oiseaux malades deviennent plus faibles et, par conséquent, souffrent de l'absence d'accès à la nourriture et à l'eau.

La coccidiose est un problème de santé très répandu et probablement l'une des maladies les plus coûteuses de la production avicole. Il est pratiquement impossible d'imaginer ce que serait l'impact économique si les coccidiostatiques devenaient indisponibles ou moins accessibles.

Même aujourd'hui, avec la totalité des coccidiostatiques disponibles, des épisodes subcliniques, voire exceptionnellement cliniques, peuvent se produire. Les estimations des pertes économiques dans ces situations varient beaucoup selon les différents auteurs. Selon Williams en 1998, le coût global engendré par les coccidioses en aviculture s'élevait à 800 millions de dollars. Selon Weber en 2000, il avoisinait 1,5 milliards de dollars. Au niveau national, le coût d'une coccidiose peut être

évalué à 50 euros pour 1000 poulets, coût qu'il faut doubler en cas de complications intestinales. L'impact économique d'un affaiblissement de nos moyens de lutte est donc potentiellement majeur pour la santé le bien être animal et l'économie de la production.

Parce que la coccidiose est impossible à éradiquer et peut avoir des effets dévastateurs si on la laisse se développer, la prévention par l'utilisation des coccidiostatiques est indispensable en élevage conventionnel.

L'administration de ces molécules est généralement préventive et continue via l'alimentation, mais peut aussi quelquefois être administrée dans l'eau de boisson lorsque le traitement est nécessaire. Les vaccins contre la coccidiose chez les volailles ont également une place dans le contrôle de la maladie mais ils sont le plus communément utilisés dans les troupeaux de reproducteurs.

Le Règlement (UE) 1831/2003 incluait la possibilité de reconsidérer le statut futur des coccidiostatiques en vue de leur éventuelle élimination à terme. Aujourd'hui, cinq ans après, les filières européennes de production ont acquis une expérience supplémentaire qui souligne fortement le fait qu'il existe un besoin continu de coccidiostats pour assurer une production avicole compétitive et durable.

Impact du retrait du marché : un retrait du marché des coccidiostatiques efficaces conduirait à une situation inacceptable en terme de santé et de bien être animal. Une indisponibilité des coccidiostatiques entrainerait une diminution de la production de volaille en Europe et provoquerait un recours plus important aux importations.

Il est important de souligner le fait que, malgré les grands programmes de recherche entrepris par les fabricants de coccidiostatiques, menés sur de nombreuses années, aucune alternative vraiment efficace de contrôle de la coccidiose dans les situations de terrain n'a été découverte. D'où la nécessité de préserver le statut des produits actuellement disponibles. Ceci explique que près de la moitié des aliments pour volailles en Europe contiennent un coccidiostatique. Une élimination progressive des additifs coccidiostatiques pour l'alimentation animale ne serait pas réaliste car cela entrainerait des effets néfastes sur la santé animale et le bien-être et, par conséquent, sur la production de volailles de l'UE, d'autant plus que des solutions de rechange efficaces ne sont pas disponibles.

Absence de risques : Comme les coccidiostatiques (ionophores et molécules de synthèse) ne sont pas utilisés en médecine humaine, il n'y a pas de problème de santé publique du type résistance aux antibiotiques. En effet, en raison du mode d'action unique de certains coccidiostatiques, le potentiel de création de résistance bactérienne est négligeable, voire nul. Par ailleurs tous les autres aspects sanitaires et environnementaux de l'impact des coccidiostatiques sont étudiés dans les dossiers d'autorisation soumis au niveau européen.

Compétitivité : les additifs coccidiostatiques sont d'un coût plus faible pour une efficacité supérieure en terme de contrôle et de maintien des performances comparés aux autres solutions.

Des acteurs importants de la production de volailles européenne : fabricants de coccidiostatiques (IFAH-Europe), les fabricants d'aliments (FEFAC), les coopératives (COPA COGECA) et l'industrie de la volaille (AVEC), les vétérinaires spécialisés en production avicole (PVSG), ont affirmé ensemble ou séparément auprès des autorités européennes que le régime actuel, selon lequel les produits sont autorisés en vertu du Règlement 1831/2003 devrait être maintenu. Des systèmes de contrôles sont en place, ils sont bien compris des opérateurs et pris en compte par les systèmes d'assurance qualité, tels que BPF (Bonnes Pratiques de Fabrication) et HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point).

En conclusion, voici les points clefs qui justifient la recommandation du maintien de la situation actuelle :

- Un programme d'utilisation strict, y compris la posologie et la durée d'utilisation, sans déviations possibles.

- Distribution restreinte par le biais d'établissements autorisés facilitant le contrôle par les autorités.
- Adoption de LMR pour les coccidiostatiques, facilitant les inspections et la protection des consommateurs.
- Existence de programmes de surveillance sur l'utilisation des coccidiostatiques.
- Traçabilité complète sur l'utilisation des coccidiostatiques.
- Bonnes pratiques dans la production, l'utilisation et la distribution des aliments pour animaux, y compris les principes HACCP.
- Le strict respect du cadre réglementaire par tous les partenaires tout au long de la filière.

Etude de la sensibilité à la phénoxyéthylpénicilline (PHENOXYPEN[®]) de certaines bactéries pathogènes aviaires d'actualité

Dr Eric BOUSQUET¹, Jean-Louis PINSARD², Damien MARTIN²,
Annie RESTIF², Dr Jean-Marie WATIER¹

¹VIRBAC

²BIO CHENE VERT

La phénoxyéthylpénicilline est une pénicilline à spectre étroit active essentiellement sur les bactéries gram + (*Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.*) et sur quelques bactéries gram – (*Haemophilus sp.*, *Pasteurella sp.*). Elle est stable en milieu acide et peut être administrée par voie orale (Prescott et al 2000). Une spécialité à base de phénoxyéthylpénicilline a été récemment mise sur le marché en aviculture sous forme de poudre orale soluble (Phenoxypen[®]). Cette étude a été menée afin de déterminer la sensibilité de pathogènes aviaires à cette molécule à la fois par la technique de l'antibiogramme et selon la méthode de référence par dilution en milieu gélosé (détermination des concentrations minimales inhibitrices : CMI). La corrélation entre les 2 méthodes permet de définir un diamètre critique à partir duquel une souche testée peut être classée sensible à la phénoxyéthylpénicilline selon un antibiogramme de routine.

1 Matériels et méthodes

1.1 Souches bactériennes

18 souches de *Staphylococcus aureus* et 17 souches d'*Enterococcus cecorum* ont été testées. Toutes les souches avaient été isolées à partir de poulets en 2006 ou en 2007 (*S. aureus* : origine essentiellement articulaire et *E. cecorum* : origine vertébrale, fémorale ou péricardique). L'échantillonnage des souches de *S. aureus* reflète la proportion de souches aviaires sensibles à la pénicilline G selon la base de données du laboratoire Bio Chêne Vert (soit 5 souches parmi 18 testées résistantes à la pénicilline G). Trois souches de référence ont également été testées : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et 25923, et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

1.2 Inoculum

Les colonies (obtenues à partir d'une culture de 24 h pour *S. aureus* et de 48 h pour *E. cecorum* sur gélose au sang) sont mises en suspension dans du bouillon tryptone sel afin d'obtenir une suspension à 10⁸ bactéries par ml. Cette suspension est diluée au 1/10 pour la détermination de la CMI en milieu gélosé et au 1/100 pour la réalisation de l'antibiogramme. Un dénombrement de contrôle sur gélose au sang est effectué pour 5 souches bactériennes par série.

1.3 Détermination des CMI en milieu gélosé

effectué en spots à partir d'un multi-inoculateur de Steers délivrant 1 µl d'inoculum, soit environ 10⁴ bactéries par spot. Pour *Staphylococcus aureus*, la lecture est réalisée après 24 h d'incubation en étuve à 37°C en atmosphère normale. Pour *Enterococcus cecorum*, elle est effectuée après 24 h et 48 h d'incubation en étuve à CO₂ à 37°C (atmosphère enrichie avec 5% de CO₂).

La CMI retenue est la concentration d'antibiotique la plus faible inhibant toute croissance visible à l'œil nu (la présence de 1 à 3 colonies ou la présence d'un voile à la limite de la visibilité n'est pas retenue).

1.4 Antibiogrammes

Une boîte de Pétri contenant une gélose Mueller Hinton estensemencée à partir de chaque inoculum. Deux disques de phénoxyéthylpénicilline (10 UI par disque, Oxoid) sont déposés sur chaque boîte. La lecture des diamètres d'inhibition est faite après 24 h et 48 h d'incubation dans les mêmes conditions que pour la détermination des CMI.

1.5 Analyse des données

Pour chaque souche, la moyenne arithmétique des 2 diamètres d'inhibition a été prise en compte. La droite de concordance est obtenue par régression linéaire entre le diamètre d'inhibition et le logarithme en base 2 de la CMI.

2. Résultats

Les lectures de CMI et d'antibiogrammes ont été identiques après 24 h et 48 h d'incubation. La technique de l'antibiogramme s'est avérée reproductible dans la mesure où l'écart entre les deux diamètres d'inhibition n'excède jamais 1 mm pour une souche donnée. De la même façon, les deux déterminations de CMI ont conduit aux mêmes résultats sur l'ensemble des souches.

La répartition des CMI vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* est bimodale : les souches sensibles à la pénicilline G ont une CMI inférieure ou égale à 0,03 µg/ml et celles résistantes à la pénicilline G ont une CMI égale à 0,25 µg/ml.

Toutes les souches d' *Enterococcus cecorum* ont une CMI inférieure ou égale à 0,06 µg/ml (Tableau).

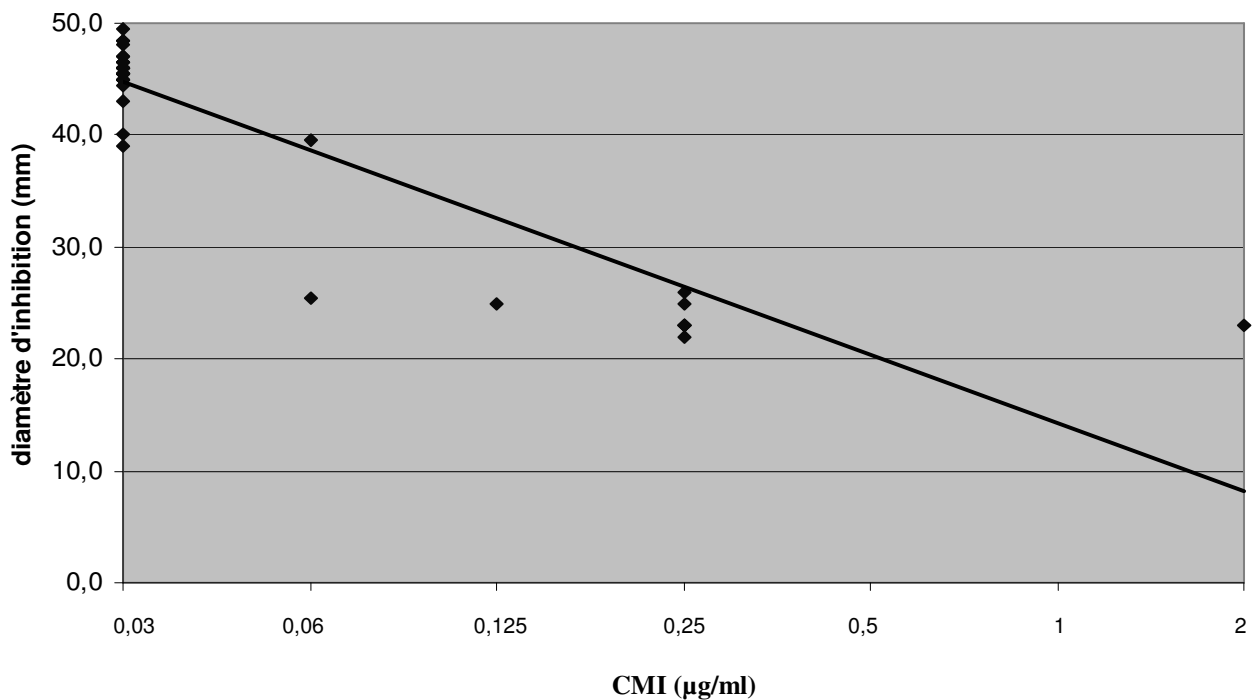
Tableau : Répartition des CMI (nombre de souches)

CMI (µg/ml)	<i>S. aureus</i>	<i>E. cecorum</i>
≤0,03	13	16
0,06	-	1
0,25	5	-

La droite de concordance construite à partir de toutes les souches testées y compris les souches de référence, conduit à un coefficient de corrélation $r = 0,905$ (figure).

La concentration critique définie pour la pénicilline G vis-à-vis de *Staphylococcus sp.* et applicable à la phénoxyéthylpénicilline est de 0,25 µg/ml (CA-SFM 2007). En d'autres termes, une souche est classée sensible à la phénoxyéthylpénicilline si la CMI vis-à-vis de cet antibiotique est inférieure ou égale à 0,25 µg/ml. Sur la base de cette concentration seuil, le diamètre critique calculé à partir de la droite de concordance construite dans cette étude est égal à 27 mm. La recommandation est donc de considérer une souche comme sensible à la phénoxyéthylpénicilline si le diamètre d'inhibition est supérieur ou égal à 27 mm (antibiogramme effectué à partir d'un disque de phénoxyéthylpénicilline).

Figure : Droite de concordance entre diamètre d'inhibition et CMI (n=41)



3. Discussion

Staphylococcus aureus est responsable d'arthrites chez le poulet, en particulier sur les reproducteurs et les souches lourdes (Rechidi-Sidhoum et Brugère-Picoux 1992). *Enterococcus cecorum* est impliqué dans des spondylites et des nécroses de la tête fémorale, notamment sur les poulets de souches lourdes (Devriese et al 2002, Aziz et Barnes 2007). Ces pathologies sont émergentes car liées au développement de ce type de production en France.

L'activité *in vitro* de la phénoxyéthylpénicilline sur les souches testées dans cette étude et l'absorption per os de cette molécule en font une alternative au traitement de ces pathologies aviaires, sous réserve de confirmation par des essais terrain.

Références

Aziz T. et Barnes J. Is spondylitis an emerging disease in broiler breeders ? World Poultry 2007, 23, 44-45.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Groupe de Travail : Antibiogramme Vétérinaire. Recommandations 2007.

Courvalin P., Leclercq R., Bingen E. L'antibiogramme. 2^{ème} édition, ESKA, Paris, 2006.

Devriese L.A., Cauwerts K., Hermans K., Wood A.M. *Enterococcus cecorum* septicemia as a cause of bone and joint lesions resulting in lameness in broiler chickens. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 2002, 71, 219-222.

Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D. Antimicrobial Therapy. Third edition, Iowa State University Press, 2000.

Rechidi-Sidhoum N. et Brugère-Picoux J. Autres affections bactériennes. In Manuel de pathologie aviaire. Brugère-Picoux J. et Silim A. Maisons-Alfort 1992, 267-272.

Les bonnes pratiques vétérinaires pour la gestion du médicament

Dr Philippe LE COZ
SELVET CONSEIL

Introduction

Lors des RIPPA 2004, j'étais intervenu sur un sujet qui est de plus en plus d'actualité : "La maîtrise des antibiotiques : les outils au service du vétérinaire" en insistant sur trois points :

- L'amélioration de la précision du diagnostic avec en tout premier lieu le recours au laboratoire,
- La formation de l'éleveur par le binôme vétérinaire - technicien,
- Le développement de traitements alternatifs.

Je pourrais aujourd'hui reprendre ces points pour traiter des "bonnes pratiques vétérinaires pour la gestion du médicament", mais je souhaite insister sur deux notions importantes dans un contexte réglementaire lui-même nouveau. Le vétérinaire professionnel du médicament qui doit aujourd'hui faire la "preuve" de son professionnalisme :

1. au niveau de son cabinet,
2. au niveau de l'élevage.

1. Un contexte réglementaire qui change le paysage pour longtemps.

Le "paysage" a effectivement complètement changé et en particulier pour les productions animales. Depuis les grandes crises (Dioxine, EBS, ...), tout un arsenal réglementaire s'est mis en marche pour "sécuriser" les denrées d'origine animale destinées à l'alimentation humaine.

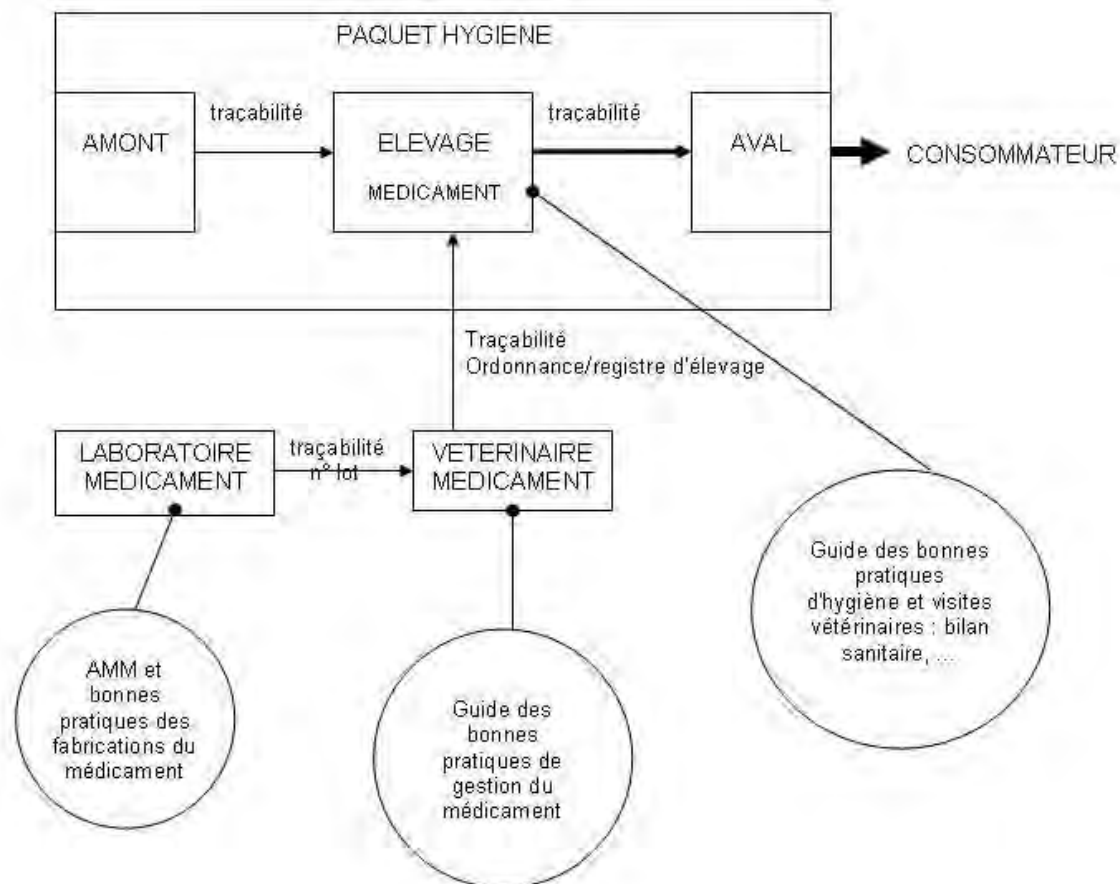
Chaque maillon de la chaîne est concerné aussi bien en avant qu'en aval de l'élevage. Toutes ces mesures sont regroupées sous le terme "PAQUET HYGIENE" avec le slogan bien connu "de la fourche à la fourchette". A chaque étape de ce "paquet", on retrouve deux outils récurrents :

- traçabilité,
- bonnes pratiques (obligations et recommandations).

Mais où se situent le vétérinaire et le médicament dans cette chaîne ?

- Si l'action du vétérinaire n'est pas directement traitée dans le "paquet hygiène", plusieurs mesures complémentaires nouvelles sont venues définir son rôle et ses obligations dans la chaîne alimentaire :
 - 1) Le décret du 24 avril 2007 et l'arrêté du 6 mars 2007 qui fixent les nouvelles règles de prescription et de délivrance du médicament avec, en particulier la définition et les modalités du suivi régulier d'élevage. Ces mesures s'articulent avec l'arrêté du 5 juin 2000 sur la définition du registre d'élevage, outil essentiel de traçabilité entre le vétérinaire, l'éleveur et l'animal.
 - 2) Le projet de visite annuelle ou bisannuelle par le vétérinaire sanitaire de chaque élevage pour le compte de l'Etat afin de remplir des missions d'audit et de qualification, en particulier dans le cadre du "paquet hygiène".
- Pour le médicament considéré comme un "intrant" particulier de l'élevage, toutes les étapes devront être "surveillées".
 - 1) Fabricant : les contrôles sont en place depuis longtemps :
 - AMM : autorisation de mise sur le marché
 - BPF : bonnes pratiques de fabrication du médicament

- 2) Vétérinaire (ou ayant droit) : la mise en place de bonnes pratiques de gestion du médicament, une démarche initiée par la profession vétérinaire.
- 3) Elevage : relais pris par le "paquet hygiène" avec la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène qui intègre tout un volet sur le médicament.



2. Les bonnes pratiques de gestion du médicament par les vétérinaires

Le vétérinaire aura à démontrer de plus en plus son professionnalisme dans la gestion du médicament. Si les règles de prescription et de délivrance sont aujourd'hui claires, la gestion proprement dite du médicament depuis sa réception du laboratoire (ou de grossiste) jusqu'à sa délivrance au client n'est pas soumise à des textes officiels.

Sentant cette nécessité, la profession vétérinaire par l'intermédiaire de sa principale représentation technique, la SNGTV (Société Nationale des Groupements Techniques Vétérinaires), a décidé de travailler sur un référentiel dans le cadre d'un Guide de Bonnes Pratiques afin d'accompagner les cabinets volontaires et d'obtenir à terme une reconnaissance officielle.

Le respect de "Bonnes Pratiques", cela veut dire quoi ?

Il s'agit d'une part, du respect d'obligations ou de recommandations établies par des professionnels, mais aussi d'autre part, du respect de procédures définies à "l'avance" sur des points critiques repérés dans le fonctionnement d'un cabinet au quotidien.

Comme toute démarche volontaire, celle-ci ne peut aboutir que si elle est réellement motivée et surtout, elle doit résulter de la volonté de tous les vétérinaires en exercice dans le cabinet.

En effet, l'individualisme parfois perçu comme une qualité par certains est un défaut majeur pour une telle entreprise.

Bien faite, cette démarche en dehors d'apporter une garantie suffisante aux clients, permet de renforcer la cohésion d'une équipe vétérinaire.

Tout le travail d'analyse puis de construction des différentes procédures demande de la disponibilité, ce qui manque souvent dans un cabinet vétérinaire. Il faut donc parfois imposer ces temps de réflexion et seul un associé qui s'investit complètement dans le dossier, pourra réussir auprès de ses confrères. A côté de la volonté, il y a la méthode et les vétérinaires ne sont en général pas familiarisés avec le monde de la "qualité" (vocabulaire, méthodes, ...) et par expérience, c'est un binôme associé professionnel de la qualité qui sera le plus efficace.

Les points importants dans le Guide de Bonnes Pratiques de gestion du médicament.

a) L'organisation du cabinet

- Qui s'occupe de quoi ?
- Qui remplace qui pendant les congés ?

Ce point paraît simple mais n'est souvent pas défini, pourtant il est très important dans la gestion des commandes, la gestion des fichiers informatiques (ordonnances, ...), la transmission des informations, etc.

b) Le référencement des médicaments

- La vérification de tous les fournisseurs et de leurs agréments.
- La procédure pour tout nouveau médicament acheté : fiche de référencement et information des personnes concernées.
- La liste des médicaments référencés accessible à tous les vétérinaires du cabinet.

c) La gestion des stocks

Gros chapitre et quand on défend que le médicament n'est pas un produit comme les autres, on doit appliquer chez soi des règles de stockage spécifiques.

- La formation de la personne qui réceptionne les médicaments (vétérinaire ou non vétérinaire) en particulier pour la chaîne du froid et les dates de péremption.
- La tenue des stocks avec l'affichage des produits gérés, le rangement par catégorie et le respect des températures de stockage (frigo et hors frigo).
- Le plan de nettoyage et de lutte contre les rongeurs.
- Les instructions de reprise des produits : doit-on reprendre un médicament non utilisé ? et si oui, avec quelles garanties ?
- Le suivi des dates de péremption : méthode et rythme.
- Le cas particulier pour certains vétérinaires des produits stockés (parfois entamés) dans le coffre des voitures.
- Enfin, le stockage va jusqu'à la délivrance à l'éleveur qui peut se faire au cabinet, à l'élevage par le vétérinaire ou enfin, à l'élevage par un transporteur. Différentes procédures sont donc à mettre en place pour chaque cas.

d) L'élimination des déchets

- Instructions propres au cabinet pour l'élimination des déchets : périmés, déchets à risques infectieux, déchets à risque chimiques, etc. ...

e) Le suivi des élevages et la délivrance des médicaments

Chapitre très important avec en particulier l'application des textes sur le suivi régulier des élevages (bilan sanitaire et protocole de soins).

Plusieurs paragraphes :

- Les modalités de formation des vétérinaires et du personnel non vétérinaire.
- L'identification des élevages au regard du suivi régulier en particulier au niveau des procédures informatiques.
- Le respect des règles de rédaction des ordonnances.
- La gestion du dossier médical (informatique ou papier) : rangement, mise à jour, consultation, ...
- Le système de traçabilité des prescriptions et des délivrances : archivage des ordonnances, classement informatique, ...
- Le cas particulier des prescriptions hors RCP : procédure justifiant le recours à une telle prescription.
- Enfin, un point qui sera certainement de plus en plus contrôlé par les auditeurs : la mise en place de conseils et recommandations (écrites) pour une bonne utilisation du médicament par le détenteur des animaux. Ce point est également repris dans le guide hygiène à destination des éleveurs (Paquet Hygiène).

Une fois prêt, le cabinet demandera l'audit de la SNGTV qui aboutira ou non à une reconnaissance valable 3 ans.

Conclusion

Comme toutes les prestations de service et encore plus du fait de la délivrance de médicaments, le vétérinaire doit s'engager dans une démarche "qualité" qu'elle porte le nom de "certification" ou de "bonnes pratiques".

Il doit faire savoir à ses clients qu'il est un vrai professionnel du médicament, il doit expliquer comment il travaille et les garanties qu'il apporte. Il ne peut pas rester seul à l'écart de ce mouvement général car cela le fragiliserait et cela ne ferait que conforter ses détracteurs qui mettent en avant son refus de la modernisation et l'accusent souvent d'être un frein à l'évolution des filières animales.

Les entérites chez la volaille : Comment interpréter les approches alternatives ?

Dieter VANCRAEYNEST, Maja MARIEN, Katelijne SMETS,
Fabienne NERAT, Maarten DE GUSSEM
ALPHARMA ANIMAL HEALTH

Introduction

Les maladies entériques sont une préoccupation importante en aviculture en raison de la perte de productivité et de l'augmentation de la mortalité. Ces dernières années, un grand nombre d'études réalisées dans l'UE ont mis l'accent sur la recherche de méthodes alternatives pour améliorer la santé intestinale. L'une des principales raisons de cette situation a été l'interdiction des antibiotiques promoteurs de croissance. Dans le même temps, un grand nombre de ces produits dits « alternatifs » sont utilisés pour l'amélioration de la croissance et la prévention des maladies. Cette revue porte sur les effets bénéfiques potentiels des probiotiques et des prébiotiques. Certaines des allégations particulières suggérées pour certains produits alternatifs seront également abordées.

Probiotiques

Il y a différentes façons de définir un probiotique. Selon la définition actuellement adoptée donnée par la FAO/OMS, les probiotiques sont : « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte ». Une autre définition est celle donnée par Fooks et Gibson (2002), selon laquelle « un probiotique est un aliment vivant d'origine microbienne qui a un effet bénéfique sur la santé ». Le concept de probiotique est apparu il y a environ 100 ans, le rôle positif joué par certaines bactéries ayant été pour la première fois décrit par le scientifique russe Metchnikoff au début du 20^e siècle.

Les bactéries intestinales bénéfiques offrent plusieurs avantages à leur hôte. Elles forment une barrière efficace contre des agents pathogènes gastro-intestinaux envahisseurs. On connaît très peu les espèces bactériennes primordiales qui fournissent cette barrière. De plus, ces espèces clés varient selon les différentes espèces animales. Cependant, les mécanismes fondamentaux intervenant pour limiter les agents pathogènes font l'objet d'un consensus : la compétition pour les nutriments et les sites de fixation sur la muqueuse intestinale, la production de composés antimicrobiens comme les bactériocines, la production d'acides gras à chaîne courte (AGCC), qui entraînent une baisse du pH de l'intestin, et la stimulation du système immunitaire jouent tous un rôle (Raibaud, 1992). Le mode d'action des probiotiques est donc assez complexe et une grande partie reste encore à élucider (Chichlowski et al. 2007). Toutefois, il est certain, contrairement à la croyance populaire, que ce mode d'action n'est pas limité à l'exclusion spatiale ou compétitive seule.

Beaucoup de probiotiques du commerce, chacun ayant ses propres allégations, sont aujourd'hui sur le marché pour une utilisation chez les volailles. Ces produits contiennent diverses bactéries, notamment les espèces des genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus* et des cultures mixtes non définies. Certains produits sont à base de levure *Saccharomyces cerevisiae* active. Les allégations de ces produits sont principalement axées sur la santé intestinale, mais peuvent fortement varier en fonction de l'espèce et de la souche utilisée.

Un nouveau concept, lié d'une certaine façon à la notion de probiotique, consiste à administrer des bactéries dites « dormantes ». Ces bactéries ne se multiplient pas dans le tractus gastro-intestinal, mais sont encore métaboliquement actives (Bernardeau et al., 2001). Elles sont capables de produire, entre autres, de l'acide lactique, des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène. En 2008, Timbermont et al. prouvent, dans un modèle d'infection, qu'un produit commercialisé contenant des cellules dormantes d'une souche spécifique de *Lactobacillus farciminis* et d'une souche spécifique de *Lactobacillus rhamnosus* a des effets bénéfiques en réduisant les lésions d'entérite nécrotique.

Prébiotiques

Le terme prébiotiques a été lancé en 1995 par Gibson et Roberfroid qui les définissent comme « des ingrédients alimentaires non digestibles qui affectent favorablement l'hôte en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une bactérie ou d'un nombre limité de bactéries dans le côlon ». En d'autres termes, les prébiotiques stimulent les propres probiotiques de l'hôte. Bien que les propriétés prébiotiques aient été attribuées à une vaste gamme de composés, seuls quelques-uns répondent au point critique de la définition, c'est-à-dire la fermentation sélective au sein de la microflore intestinale par les espèces considérées comme bénéfiques. Quelques prébiotiques utilisés dans l'alimentation des volailles sont les fructanes comme l'inuline, l'oligofructose et les fructooligosaccharides. L'inuline est composée d'un ensemble de molécules de saccharose dont les unités de fructose sont remplacées par des chaînes linéaires de fructanes à liaisons $\beta(2-1)$, de longueur comprise entre 1 et 65 unités de fructose environ. Les termes oligofructose (OF) et fructooligosaccharide (FOS) sont souvent utilisés de façon interchangeable du fait que les produits auxquels ils font référence sont assez comparables. Cependant, il est plus correct d'utiliser le terme d'OF quand il s'agit de fructanes naturels, extraits de racines de plantes, et le terme de FOS quand il s'agit d'un produit artificiellement synthétisé à partir du saccharose et du fructose par transfructosylation.

Nourrir des poulets de chair avec des fructanes prébiotiques peut améliorer le gain de poids, la conversion alimentaire et le poids de la carcasse (Yusrizal et Chen, 2003). En 2003, Kleessen et al. décrivent une diminution du nombre de *Clostridium perfringens* et une réduction des niveaux d'endotoxines bactériennes chez des poulets de chair recevant un aliment supplémenté avec des fructanes. En production de dindes, les données concernant l'effet des prébiotiques sont plus limitées. En 2005, Zdunczyk et al. démontrent que l'incorporation de 2% de fructanes dans l'alimentation des dindes conduit à une baisse du pH caecal et à une augmentation de la production caecale d'acides gras à chaîne courte, en particulier du butyrate. Ces paramètres sont plus fortement affectés par l'OF que par l'inuline. Aucun de ces deux fructanes n'a eu d'effet sur les indices de performances.

Les mannan-oligosaccharides (MOS) sont d'autres composés prébiotiques fréquemment utilisés en élevages de volailles. Outre la stimulation sélective de la flore intestinale bénéfique de l'hôte, ils sont également en mesure d'éliminer certaines espèces de bactéries Gram-négatives du tractus intestinal en empêchant leur fixation aux cellules épithéliales. Les produits à base de mannan-oligosaccharides disponibles sur le marché contiennent souvent des cellules de levure ainsi que des bêta (1,3 - 1,6) glucanes. En production de poulets de chair, selon Vancraeynest et al. (2006), les principales propriétés bénéfiques de ces produits sont une diminution des indices de conversion des aliments (IC), une augmentation du poids vif et une augmentation des titres en anticorps après la vaccination. Chez les poules pondeuses, Marien et al. (2006) démontrent que les produits contenant des MOS et des bêta-glucanes conduisent à une augmentation de la production et à une meilleure guérison lors de maladies. Les MOS et les bêta-glucanes ont aussi un effet bénéfique en production de dindes : Solis De Los Santos et al. (2006) mettent en évidence une amélioration de la maturation précoce de l'intestin des dindonneaux, tandis que Huff et al. (2006) démontrent que ces composés permettent

une meilleure résistance au stress dû au froid et à l'infection par *Escherichia coli*. Vancraeynest et al. (2008) montrent qu'une supplémentation de l'aliment avec des bêta (1,3-1,6) glucanes et des MOS permet d'obtenir une augmentation du poids final et une réduction de la mortalité chez des dindes élevées jusqu'à l'âge de 18 semaines.

Alternatives et allégations de prévention de maladies

Un des problèmes rencontrés avec de nombreux produits alternatifs est la revendication faite par les fournisseurs concernant la prévention des maladies et/ou leur traitement. Pour les produits autorisés comme additifs alimentaires, de solides travaux de recherche ont été effectués pour étayer les allégations qui sont faites. Toutefois, il y a sur le marché un grand nombre de produits vendus librement et non classés comme additifs alimentaires ou médicaments vétérinaires. Certains de ces produits sont commercialisés comme étant utiles pour la prévention ou le traitement de maladies spécifiques, de la coccidiose par exemple, sans que la preuve de leur efficacité ait été apportée. D'ailleurs, De Gussem et al. (2008c) montrent dans un modèle expérimental avec inoculation d'*Eimeria* que beaucoup de ces produits n'ont absolument aucun effet contre la coccidiose.

Une autre maladie concernée par les allégations de certains produits alternatifs est l'histomonose, provoquée par le protozoaire parasite *Histomonas meleagridis*. Cette maladie peut causer de graves pertes en production de dinde et actuellement il n'existe pas dans l'UE de produits approuvés pour sa prévention ou son traitement. Les résultats obtenus par Duffy et al. (2005) pour un type de produit alternatif semblaient très prometteurs. Toutefois, des essais d'infection expérimentale effectués par De Gussem et al. (2008a et b) n'ont mis en évidence aucun effet de ce produit, ni d'autres phytoproduits, contre *H. meleagridis* chez des dindes.

Références

- Bernardeau M., Vernoux J.P., Gueguen M., 2001. Usefulness of epifluorescence for quantitative analysis of lactobacilli in probiotic feed. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1103–1109.
- Chichlowksi M., Croom J., McBride B.W., Havenstein G.B., Koci M.D., 2007. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. *International Journal of Poultry Science* 6, 694-704.
- De Gussem M., Vancraeynest D., De Gussem J., Huyghebaert G., Marien M., 2008a. Comparison of impact on zootechnical performance of Histostat® and Natustat® in prevention of histomonosis and flagellates in turkeys. 23rd World Poultry Congress, Brisbane, Australia.
- De Gussem M., Vancraeynest D., De Gussem J., Huyghebaert G., Marien M., 2008b. Evaluation of the efficacy of phytoproducts and Histostat® against *Histomonas Meleagridis* in turkeys. 23rd World Poultry Congress, Brisbane, Australia.
- De Gussem M., Vancraeynest D., Reperant J.M., Marien M., 2008c. Efficacy of alternative products against turkey coccidiosis. 23rd World Poultry Congress, Brisbane, Australia.
- Duffy C., Sims M., Power R., 2005. *Avian Diseases*, 49, 423–425.
- FAO/WHO, 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Fooks L., Gibson G., 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88, S39-S49.
- Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.
- Huff G.R., Farnell M.B., Huff W.E., Rath N.C., Solis De Los Santos F., Donoghue A.M., 2006. Effects of a dietary yeast extract on haematological parameters, heterophil function, and bacterial clearance in turkey poults challenged with *Escherichia coli* and subjected to transport stress. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.
- Kleessen B., Elsayed N.A.A.E., Loehren U., Schroedl W., Krueger M., 2003. Jerusalem artichokes stimulate growth of broiler chickens and protect them against endotoxins and potential cecal pathogens. *Journal of food protection* 11, 2171-2175.
- Marien M., De Gussem M., Vancraeynest D., 2007. Evaluation of a yeast extract product, containing a guaranteed range of β -glucans, in free range laying hens. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.
- Metchnikoff, E. 1907. *Essais optimistes*. Paris. The prolongation of life. Optimistic studies. Translated and edited by P. Chalmers Mitchell. London: Heinemann, 1907.
- Raibaud P., 1992. Bacterial interactions in the gut. In: Fuller R., Ed.: *Probiotics: The scientific basis*. London, Chapman and Hall, pp. 9-24.

Solis De Los Santos F., Donoghue A.M., Farnell M.B., Huff G.R., Huff W.E., Donoghue D.J., 2006. Mannan-oligosaccharide yeast extract supplementation enhances early gut development in turkey poults. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.

Timbermont L., Lanckriet A., Gholamiandehkordi A., Marien M., Vancraeynest D., De Gussem M., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F., Van Immerseel F., 2008. Evaluation of the efficacy of a unique Lactobacillus-based product in a Necrotic Enteritis model in broilers. 23rd World Poultry Congress, Brisbane, Australia.

Vancraeynest D., De Gussem M., Marien M., 2008. The effect of a yeast cell wall product, with a guaranteed range of beta-glucans, on performance in turkeys. 23rd World Poultry Congress, Brisbane, Australia.

Vancraeynest D., Necmettin C., Marien M., De Gussem M., 2007. Evaluation of a yeast extract product, containing a guaranteed range of β -glucans, on performance in broilers. 16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.

Yusrizal, Chen T.C., 2003. Effect of adding chicory fructans in feed on fecal and intestinal microflora and excreta volatile ammonia. International Journal of Poultry Science 2, 188-194.

Zdunczyk Z., Jankowski J., Juskiwicz J., 2005. Performance and intestinal parameters of turkeys fed diet with inulin and oligofructose. Journal of Animal and Feed Sciences 14, 511S-516S.

L'eau : une approche globale du captage à l'abreuvoir.

Loïc Fulbert
GDS 53
Dr Bénédicte Alexandre
COOPHAVET

Origine de l'eau

L'eau approvisionnant les exploitations est majoritairement d'origine privée (puits, forage) d'autant plus que les quantités consommées sont importantes et que le prix du m³ du réseau public est élevé. Le recours aux puits et forages profonds, concerne 75 % des élevages dans le Grand Ouest. Le recours au réseau reste dans certains cas un choix (quantité et qualité assurées) ou une contrainte (recours à l'eau souterraine impossible ou trop couteux).

L'eau de distribution publique est de bonne qualité bactériologique mais peut présenter des paramètres (pH élevé, dureté non corrigée) la rendant peu compatible avec les techniques d'élevage industriel.

Ces dernières années, le recours à des forages profonds s'est généralisé (60 % de l'eau privée). L'eau exploitée est captée en profondeur mais une mauvaise conception peut compromettre la bonne qualité bactériologique par des infiltrations d'eau de surface contaminée.

Protection du réseau public

Une séparation effective (disconnecteur ou séparation totale) est légalement exigée sur les sites disposant à la fois du réseau public et d'un captage privé. Ce dispositif a pour but une protection de la distribution publique à l'encontre de la qualité aléatoire des captages privés ainsi que des différents traitements utilisés dans l'eau à la ferme.

Suivre la qualité de l'eau et interpréter l'analyse

Les analyses de routine sont à réaliser au moins une fois par an dans le sas du bâtiment. Elles doivent comporter au moins 4 critères de bactériologie et 3 en chimie.

Le suivi de la qualité de ces ouvrages nécessite un contrôle régulier par des analyses représentatives et permettant un diagnostic pertinent sur l'origine et la cause de la pollution.

Pour la partie bactériologie de l'analyse, les entérocoques intestinaux (ou streptocoques du groupe D) et *Escherichia coli* (ou coliforme thermo tolérant) signent une origine fécale. Les coliformes totaux et les bactéries anaérobies sulfite- réductrices (ASR) révèlent, suivant le point de prélèvement de l'eau, une origine hydro-tellurique ou un biofilm actif.

Une bonne interprétation de l'analyse nécessite une fiche de renseignements sur l'analyse et une enquête de terrain exhaustive, du captage à l'abreuvoir.

Le contrôle des critères physico-chimiques (pH, dureté, fer, manganèse) est un préalable à tout traitement bactériologique. Les critères incompatibles avec l'usage de l'eau pourront être corrigés par des traitements adaptés.

L'interprétation de l'analyse de routine détermine les suites à donner.

Dans le cas de résultats durablement corrects, le maintien d'une veille en renouvelant l'analyse suffira. L'interprétation de mauvais résultats doit aboutir à un conseil précis afin de résoudre le problème. Cette interprétation diffère d'une situation à l'autre.

Prenons le cas ordinaire d'un forage traité par le chlore avec présence d'entérocoques au résultat d'analyse bactériologique de surveillance.

Le diagnostic devra valider l'efficacité de la chloration :

- ☒ contrôle du chlore libre en différents points de l'élevage, montage, fonctionnement et entretien de la station,
- ☒ analyse bactériologique 6 critères à la sortie des cuves de traitement au débit d'utilisation,
- ☒ Un choix de critères de chimie (fer, manganèse, matières organiques, ...) sera fait après enquête (type de dépôt, odeur, ...).

Dans notre exemple, une nouvelle analyse conclut à la présence de manganèse.

L'interprétation peut alors être la suivante : la quantité bactériologique n'est pas maîtrisée au captage, un traitement au chlore a été mis en place pour la corriger mais sans tenir compte des teneurs en matière oxydable.

L'efficacité de la chloration est diminuée par le manganèse et nécessitera à minima une augmentation du temps de contact entre le chlore et les bactéries ou l'élimination du manganèse par traitement avant chloration. Une approche de la maîtrise des infiltrations à la tête de forage sera le complément indispensable.

Conséquences d'une mauvaise qualité de l'eau

L'eau est susceptible d'interagir avec le matériel qui la distribue mais aussi avec les animaux qui la consomment.

Une eau de mauvaise qualité bactériologique peut engendrer des troubles digestifs avec une dégradation des litières en volailles.

Les entérites non spécifiques chez la dinde et le poulet en sont un bon exemple. Certains vecteurs (virus, bactéries, parasites) sont en effet transmis par l'eau, la contagiosité au point d'abreuvement et par les excréments sont des facteurs aggravants.

Les ions nitrates seuls, n'ont pas de conséquence directe sur les animaux aux valeurs rencontrées en élevage (< 120 mg/l). Par contre, ils ont une réelle valeur d'indicateur de pollution d'origine agricole. Bien d'autres polluants (pesticides) suivent le même cheminement vers les captages mais ne sont pas recherchés à l'analyse.

Le matériel de distribution de l'eau subit une corrosion (cuivre, laiton, galva) dès que l'eau présente une dureté faible (< 15) et un pH faible (< 6). A l'opposé, l'entartrage est la conséquence d'une dureté élevée (> 20 °F) accompagnée d'un pH > 7.

Ces dégradations favorisent l'accroche et le développement du biofilm. Le colmatage des circuits d'eau survient dans le cas d'une présence excessive en fer et manganèse (≥ 1 mg/l en fer, $\geq 0,3$ mg/l en manganèse).

Les traitements correctifs de l'eau

Les matériels de traitements les plus rencontrés visent à éliminer les minéraux en excès dans l'eau brute. Le fer et le manganèse sont éliminés par rétention sur filtre à sable. Pour être retenus, le fer et le manganèse doivent être oxydés au préalable par un ajout d'air ou d'un oxydant comme le chlore ou le permanganate. Cette réaction sera favorisée soit par des médias spécifiques (sable vert pour le manganèse, magno augmentant sur le pH pour le fer) ou par des ferro bactéries comme *Leptothrix* et *Gallionella* (procédé biologique).

Dans le cas des eaux dures > 30° TH (teneur en calcium et magnésium élevée), la mise en place d'un adoucisseur (résine cationique échangeuse d'ion) permet de rétablir une dureté résiduelle de 10 à 15° F pour l'eau distribuée.

Ces derniers traitements (fer, Mn, dureté) sont des préalables à une bonne maîtrise des traitements bactériologiques.

Les modifications du pH

Les eaux à pH élevé (réseau public > 7,5 ou issues de roche mère calcaire) nécessitent un ajustement du pH pour l'adapter aux besoins de l'élevage. Mais un abaissement du pH augmente la corrosivité de l'eau et doit se faire au sas du bâtiment en présence de matériaux de distribution inertes (PVC, PEHD).

L'ajout des différents types d'acide n'a pas le même objectif. L'utilisation d'acide minéral améliore l'efficacité d'une chloration (formation d'acide hypochloreux en plus grande proportion), ces acides sont souvent concentrés (manipulation délicate) et doivent respecter des normes de pureté. L'utilisation d'acide organique permet un effet bactéricide mais présente le risque de développement de levures qui peuvent colmater les tuyaux de distribution.

Le traitement bactériologique

Le dosage de chlore est la solution la plus fréquemment rencontrée en élevage, cette méthode reste : la plus économique, efficace si elle est maîtrisée, simple à contrôler et à entretenir mais n'a pas toujours bonne presse (goût, odeur, etc ...). Le peroxyde d'hydrogène peut aussi être dosé en continu mais son prix de revient est nettement plus élevé.

La difficulté à maîtriser le biofilm dans les bâtiments où l'eau se réchauffe à la distribution a engendré récemment l'arrivée de nouvelle technique de désinfection. Le dioxyde de chlore fabriqué sur site est une technique éprouvée et maîtrisée mais assez onéreuse en investissement, sa grande efficacité en désinfection et sur la destruction du biofilm pourrait en faire une méthode de référence pour les élevages ayant une consommation d'eau importante.

D'autres procédés qui utilisent l'électrolyse du sel en exposant une saumure à un champ électrique entre électrodes, permettent de produire des biocides (chlore ou peroxyde) sur site et de les doser dans l'eau à traiter. Les concentrations respectives des différents produits issus de la réaction, la sensibilité du réacteur à la qualité d'eau utilisée, le montant de l'investissement et le manque de recul en élevage en font une technique encore incertaine.

L'eau : véhicule des traitements

Le traitement via l'eau de boisson présente s'il est bien réalisé de nombreux avantages. Il permet une intervention rapide et une grande flexibilité (dose, durée...). La réussite du traitement dépend du choix et de l'efficacité de la molécule mais aussi de sa bonne administration. Pour ce faire, le

choix d'un matériel adapté et l'application des bonnes pratiques de mise en solution sont des pré-requis indispensables.

Le matériel de dosage :

1. Les pompes hydrauliques permettent l'incorporation des produits directement dans l'eau de boisson. L'entraînement d'un piston par le débit d'eau actionne un doseur réglable proportionnel. Le volume du doseur est réglable en course : exemple : 0 à 2.5%, 2 à 5 % etc. Le choix du doseur sera donc à faire en fonction de la consommation d'eau et des produits à doser. Un débit minimum de 10 à 20 litres par heure est nécessaire au démarrage de la pompe. Ce minimum augmente avec l'usure de la pompe (corps rayé, joint et piston encrassés). Une attention toute particulière sera donc à porter à l'entretien de ce type de matériel.
2. Les pompes électriques présentent l'avantage de fonctionner avec des compteurs à impulsions plus précis et dont le seuil mini. est nettement plus faible : 2 à 5 litres / heure. Elles permettent donc un dosage plus précis (0 à 5 %) et pour une plus grande plage de consommation d'eau. Elles représentent un investissement de 3 à 5 fois plus élevé.
3. L'utilisation d'un bac au sas pour distribuer ces traitements à partir de la pompe à eau est une autre solution. Le volume de ce bac est souvent trop faible pour couvrir les besoins en eau d'une journée.
4. Rappelons enfin que même un matériel parfaitement adapté doit être entretenu et contrôlé une fois par an. En effet son bon fonctionnement est le garant de l'efficacité du traitement.

L'administration du traitement

La quantité de produit à préparer doit se raisonner sur 24h et dépend :

- du poids et du nombre d'animaux à traiter
- de la posologie pondérale du produit (mg ou ml/kg de P.V.). Attention à ne pas confondre quantité de produit et quantité de matière active.
- de la quantité d'eau consommée / 24h
- du type de matériel (bac ou pompe) et du réglage

La notion de dose par litre d'eau est à proscrire dans le calcul de la posologie. En effet, les quantités d'eau bues sont variables en fonction de l'âge des volailles et il est fréquent d'aboutir à des sur ou sous dosages dangereux pour l'animal mais aussi pour la santé publique.

L'adjonction à l'eau de boisson de traitements requiert une qualité d'eau adéquate. La solubilisation et la disponibilité de ces produits est gênée dans le cas d'eau à pH élevé, à forte teneur en fer, manganèse et matière organique. De plus, l'arrêt des oxydants (chlore, peroxyde ...) est nécessaire lors de ces traitements. L'utilisation de solvants améliorant la solubilité est possible mais doit reposer sur les préconisations des laboratoires et sur la prescription vétérinaire. Rappelons que tous les produits ne se solubilisent pas avec le même adjuvant. Les industriels pharmaceutiques travaillent depuis plusieurs années à l'élaboration de recommandations spécifiques.

Le mélange de deux spécialités est possible et se raisonne en fonction de la compatibilité physico-chimique des principes actifs et de l'intérêt thérapeutique de l'association. En théorie, deux principes actifs ont d'autant plus de chances d'être compatibles entre eux que leurs caractéristiques acido-basiques sont proches. En pratique et même si cette tendance reste vraie, les résultats peuvent varier en fonction de la galénique, notamment de la nature de l'excipient, qui peut être facilitant.

En cours d'élevage, il est conseillé avant et après tout traitement de désinfecter l'eau avec un produit compatible avec la présence des animaux (iode par exemple). Le développement du biofilm est ainsi limité.

Stratégie anticoccidienne : intégrer la vaccination dans les programmes de rotation, un moyen de préserver les résultats technico-économiques

Dr Anne-Sophie RIVIERE-BERRAUTE
INTERVET-SCHERING PLOUGH SANTE ANIMALE

1 – Quadrants de performance

1.1 – Concepts

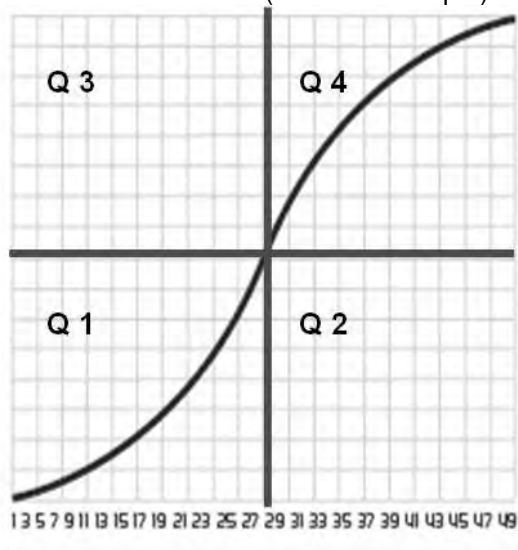
Les quadrants de performance permettent de matérialiser en fonction de l'âge et du pic d'excrétion d'oocystes dans les fientes, l'impact des multiplications coccidiennes sur les résultats en fonction de l'inflexion de la courbe de croissance.

Sur une courbe de croissance optimisée, sont tracés deux axes :

- un axe vertical, âge d'inflexion de la courbe de croissance (croissance compensatrice plus aléatoire)
- Un axe horizontal représentant le seuil d'excrétion oocystale au-dessus duquel il y a risque de coccidioses subcliniques ou cliniques

Ces deux axes définissent donc quatre quadrants :

- Q1, excrétion faible, en jeune âge (situation idéale)
- Q2, excrétion importante, en jeune âge (croissance compensatrice possible)
- Q3, excrétion faible, en fin de croissance (conséquences variables selon la présence ou non d'autres pathogènes)
- Q4, excrétion forte en fin de croissance (situation critique)

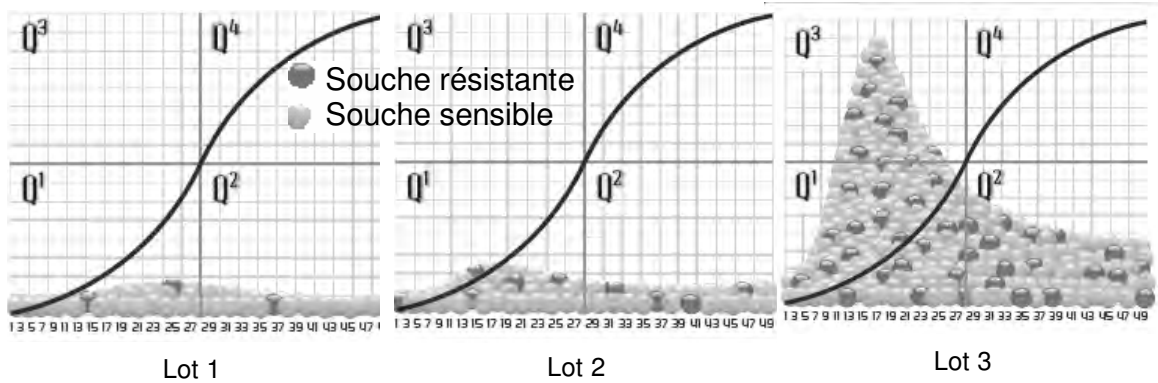


Bien que conceptuel, cet outil permet de visualiser l'évolution dans le temps du choix des programmes de prévention utilisés au sein d'une organisation.

1.2 – Exemples

1.2.1 Programme « chimiques full »

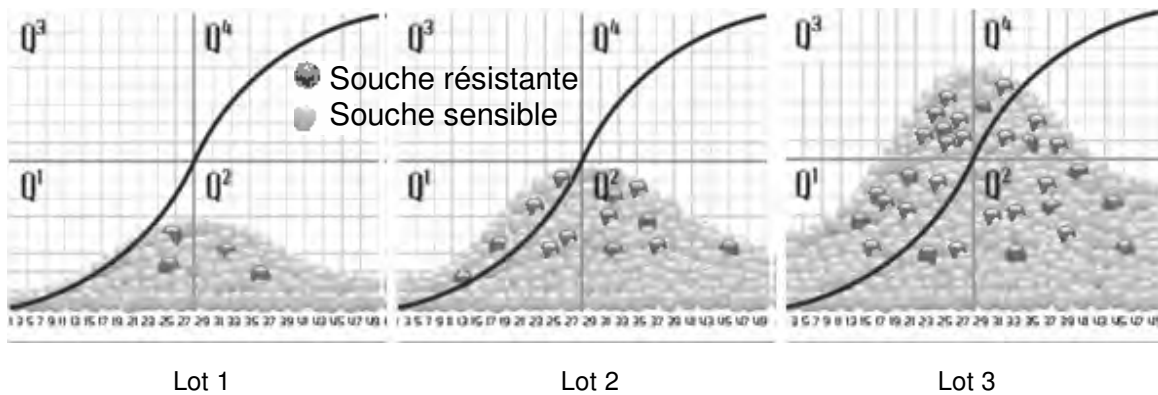
Les coccidiostatiques chimiques empêchent le développement parasite par blocage de certaines fonctions métaboliques. Ils interviennent en début du cycle coccidien et ne permettent pas la mise en place d'une immunité.



Très efficaces initialement, ils permettent un challenge très faible en Q1. Lorsque le nombre de souches résistantes augmente, on observe alors des challenges précoces et importants (souvent sous forme de coccidioses cliniques) en Q3.

1.2.2 Programme « ionophores full »

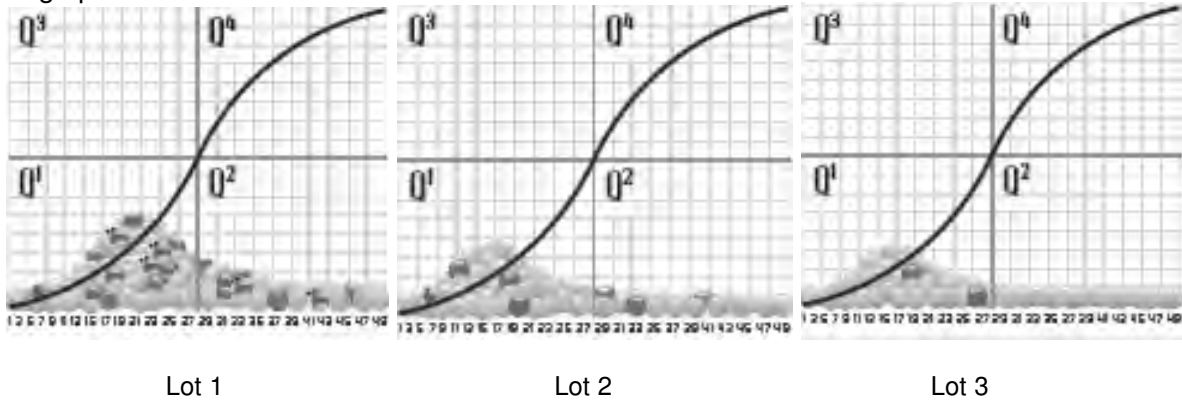
Les coccidiostatiques ionophores agissent en perturbant les échanges ioniques au niveau des éléments parasites. Ils interviennent à différents stades du cycle et laissent se développer un faible nombre de coccidies (phénomène de leakage) ; ils participent ainsi à la mise en place d'une immunité.



L'utilisation en continu de coccidiostatiques ionophores entraîne l'apparition de souches résistantes et le déplacement progressif du pic en Q3, ou Q4 avec dégradation globale des résultats (coccidioses subcliniques) et sur certains sites apparition de coccidioses cliniques

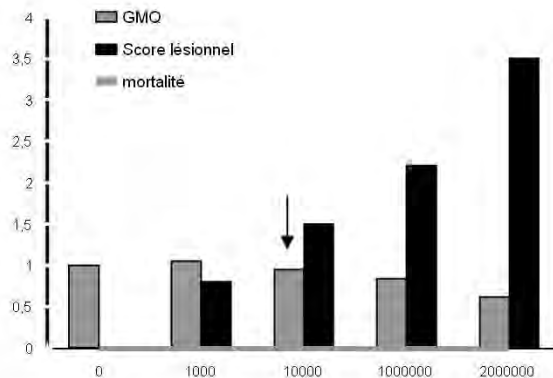
1.2.3 Vaccination PARACOX®

Le vaccin PARACOX® contient des souches précoces (période prépatente écourtée) et sensibles à l'ensemble des molécules à activité anticoccidienne référencées. Son administration induit un challenge précoce en Q1.



L'immunisation précoce et homogène des oiseaux permet une réduction des excréments coccidiens et cela pour l'ensemble de la population présente sur le site d'élevage (sans distinction entre souches sensibles ou résistantes). Après 3 lots vaccinés, la population coccidienne est donc moins importante et plus diversifiée.

Si les coccidioses à *Eimeria tenella* sont faciles à mettre en évidence, il n'en est pas de même pour les *Eimeria* responsables de coccidioses subcliniques, notamment *Eimeria acervulina*, pour laquelle même de faibles taux de contamination avec de faibles indices lésionnels entraînent des diminutions de performances



2 – Résistances terrain aux coccidiostatiques

Nous ne développerons pas la méthode ni l'intérêt de la réalisation de tests de sensibilité aux anticoccidiens (T.S.A. ou coccidiogrammes). Nous rappellerons néanmoins que ces tests sont des tests *in vivo*, qui permettent :

- l'identification des espèces coccidiennes prédominantes
- l'évaluation du profil d'activité de différents anticoccidiens
- la détermination du pouvoir pathogène des coccidies isolées.

La sensibilité aux coccidiostatiques testés est déterminée pour chaque *Eimeria spp.* par la réduction du score lésionnel des lots traités comparativement à un lot témoin infecté non traité.

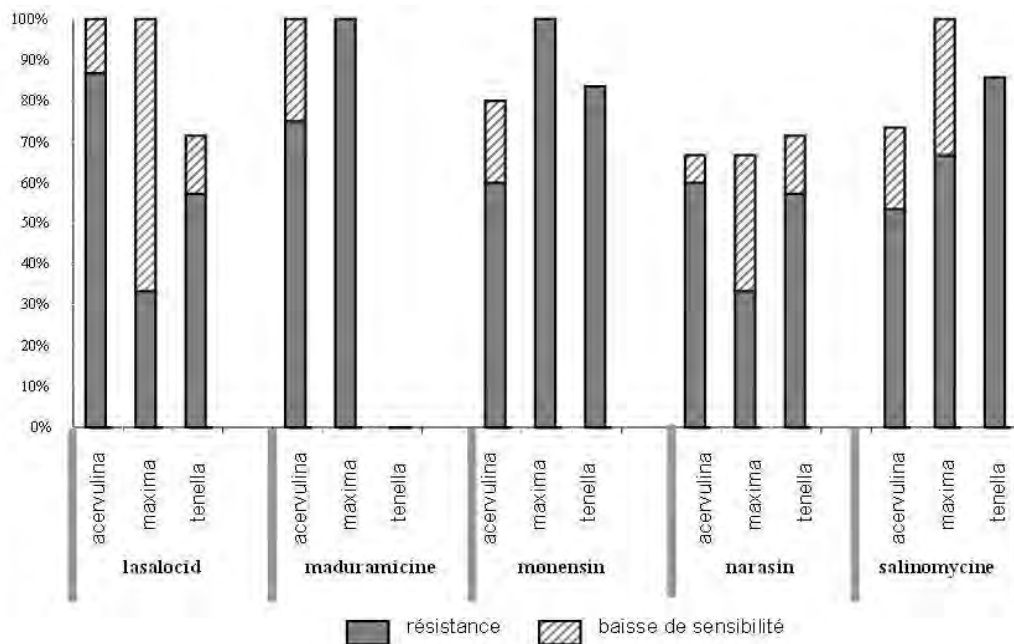
0 - 30% de réduction des lésions	Résistance (R)
31 - 50 % de réduction des lésions	Baisse de sensibilité ou résistance partielle (RS)
51 - 100 % de réduction des lésions	Sensibilité (S)

2.1 – Résultats d'une enquête présentant les résistances d'isolats de coccidies terrain aux coccidiostatiques

Les tests de sensibilité ont été réalisés sur 25 souches terrain isolées entre 1996 et 2001, l'échantillon comprenait :

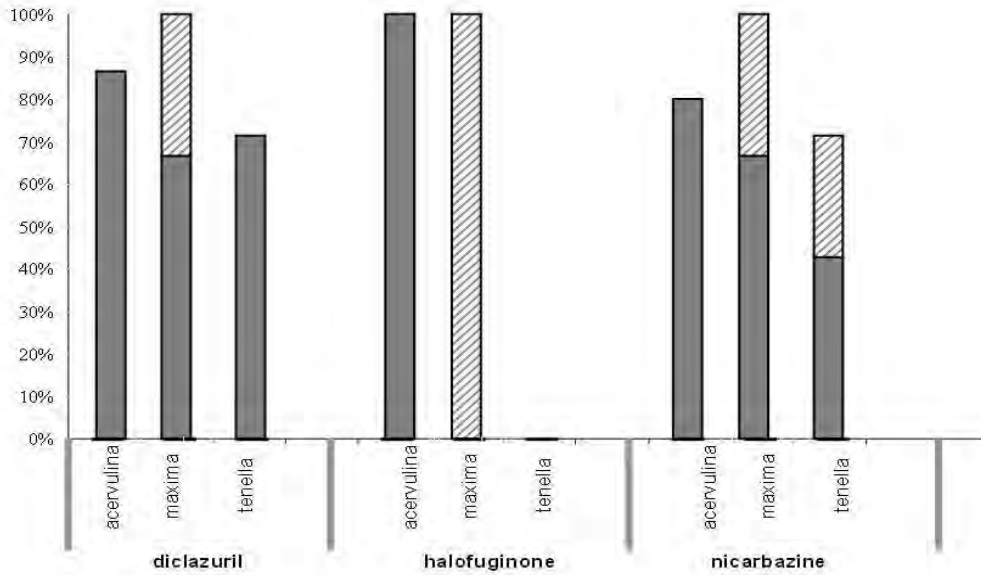
- 15 *Eimeria acervulina*
- 3 *Eimeria maxima*
- 7 *Eimeria tenella*

2.1.1 Résistances aux ionophores



La prévalence terrain des souches d'*Eimeria acervulina* (responsables de coccidioses subcliniques, souvent sous-diagnostiquées) est d'environ 90%. Dans cette espèce, la proportion de souches résistantes à un coccidiostatique de la famille des ionophores se situe entre 60 et 86 % en fonction de la molécule testée alors que les proportions constatées pour les coccidiostatiques chimiques se situent entre 85 et 100 %.

2.1.2 Résistances aux coccidiostatiques chimiques



2.2 – Intérêts de la vaccination anticoccidienne sur la sensibilité

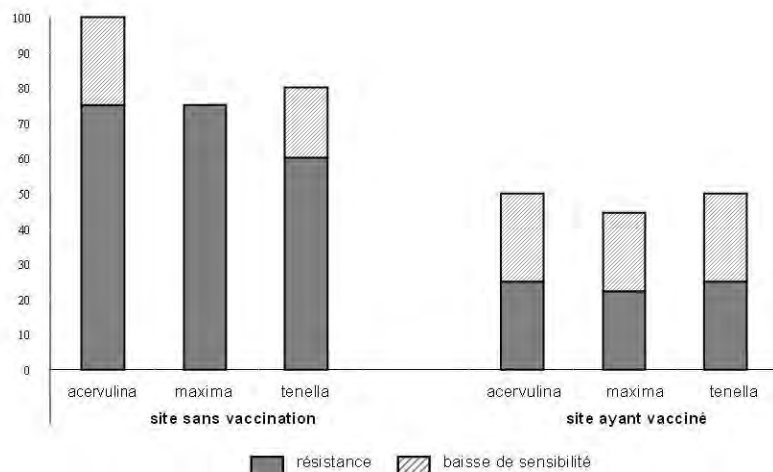
Une deuxième étude menée sur des prélèvements terrain effectués en Europe a permis de démontrer l'impact de l'utilisation (sur une période de 3 à 6 mois) du vaccin PARACOX® sur la sensibilité des souches terrain isolées.

Les tests de sensibilité ont été réalisés pour le monensin et le diclazuril sur 50 souches terrain isolées en Italie, Allemagne et France.

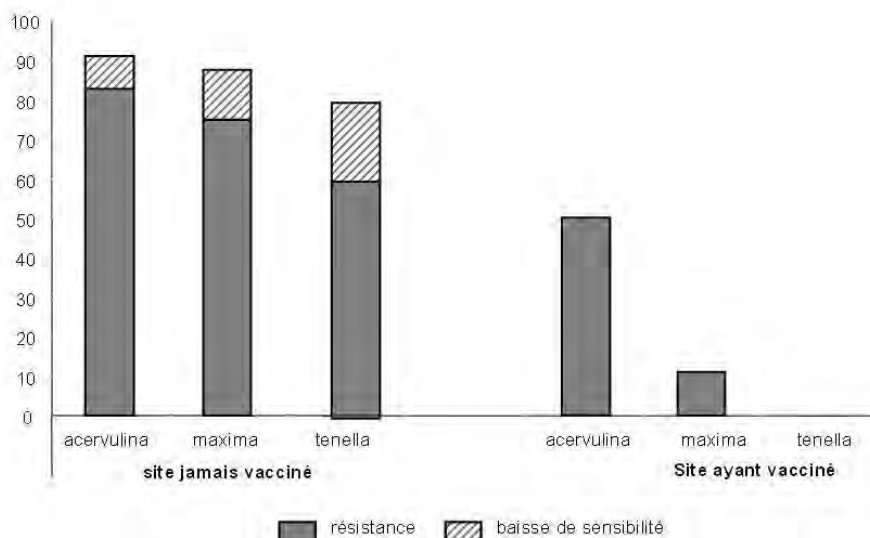
- 20 *Eimeria acervulina*
- 17 *Eimeria maxima*
- 13 *Eimeria tenella*

Les résultats, exprimés en fonction des sites, avec ou sans vaccination, sont les suivants :

2.2.1 Résistances au monensin



2.2.2 Résistances au diclazuril



Les souches isolées de sites utilisant la vaccination PARACOX® sont proportionnellement moins résistantes.

Une vaccination PARACOX® pendant au moins trois lots consécutifs permet d'augmenter la sensibilité aux coccidiostatiques chimiques ou ionophores des souches de coccidies des sites de production.

3 – La preuve par l'exemple

De nombreux pays utilisent la vaccination anticoccidienne pour préserver la sensibilité des additifs alimentaires anticoccidiens à leur disposition. Schering-Plough dispose de nombreuses données qui montrent l'intérêt de la vaccination PARACOX® pour maintenir la sensibilité des coccidiostatiques, deux exemples européens vous sont présentés ci-dessous.

3.1 – Expérience italienne

Sur une production d'environ 400 millions de poulets en claustration par an, plus de 40% sont vaccinés ; soit en programme continu (différenciation qualitative « dix et plus » cf. Amadori), soit en rotation pour la revitalisation incluant au moins 3 lots consécutifs vaccinés suivis de 3 lots sous prévention chimique dans le même bâtiment.

En pratique, les Italiens administrent les coccidiostatiques en automne et hiver, les vaccins anticoccidiens au printemps et en été. Lors des phases de "chevauchement", c'est-à-dire lorsque l'usine d'aliment livre des lots vaccinés et des lots traités, deux risques sont à prendre en compte ; la contamination croisée et l'erreur de livraison

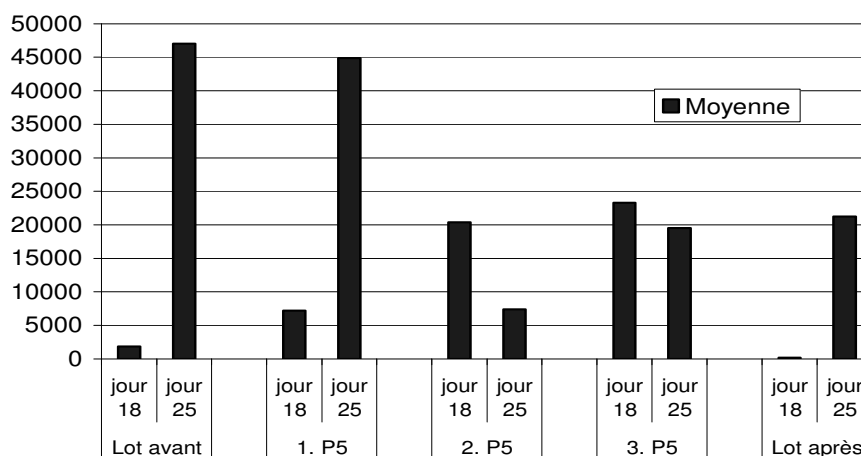
A l'échelle d'un groupement, ils ont observé une baisse des indices de consommation alimentaire.

3.2 – Expérience allemande

Un essai pilote mené en 2006 sur 4 sites d'élevage contaminés, avec coccidiose clinique a permis de mettre en évidence l'efficacité de la vaccination sur la maîtrise de cette maladie et l'absence d'expression clinique sur les lots suivants.

Un autre essai a été réalisé en 2007 (organisation produisant 1 million de poulets), vaccination de 3 lots sur 3 sites, soit 125 000 volailles. Mesures réalisées : excréments coccidiennes, performances et sensibilités des souches isolées.

3.2.1 – Excrétion d’oocystes



La vaccination permet de déplacer l'excrétion maximale des coccidies vers 18 jours soit en Q1. Pour le lot 5, sous coccidiostatiques ionophores, après 3 lots vaccinés, le pic est plus tardif mais fortement diminué (de l'ordre de 55%).

3.2.2 – Résultats technico-économiques

Résultats conformes dans tous les élevages, même pour les poulets légers (1,5 kg)

Amélioration des résultats pour les poulets lourds (2 kg)

Croissance compensatrice à la fin

Amélioration de lot en lot

Amélioration des résultats pour les lots suivants sous coccidiostatiques.

3.2.3 – Restauration des sensibilités

	Conc. ppm	E. Tenella avant vaccination	E. Tenella après vaccination
Salinomycine	60	RS	RS
Monensin	100	R	S
Narasin	70	R	RS
Lasalocid	90	S	S
Maduramicine	5	R	S
Diclazuril	1	S	S
Nicarbazine / Narasin	40 / 40	R	S
Nicarbazine / Narasin	50 / 50		S

Conclusion

Dans les élevages de poulets standards, certifiés ou lourds, la vaccination anticoccidienne est un outil sanitaire, qui permet de restaurer et de préserver l'efficacité de la prévention de cette maladie face à la diminution du nombre de molécules coccidiostatiques et à la perception des consommateurs.

Références

- Le test de sensibilité aux anticoccidiens – un outil dans la stratégie de lutte contre la coccidiose aviaire – JRA 1999
- Vaccination increases sensitivity of Coccidiosis to anticoccidials – WORLD POULTRY – 2005
- Intérêt des anticoccidiogrammes pour une prévention efficace de la coccidiose du poulet – JRA 2003
- Sensitivity of field isolates of Eimeria to Monensin following the use of a coccidiosis vaccine in broilers chickens – CHAPMAN H.D.
- Vaccination with PARACOX® Improves Sensitivity of field Eimeria isolates to anticoccidials – Technical services bulletin SP n° 423
- Sustainable coccidiosis control in poultry production : the role of live vaccine – CHAPMAN H.D – International journal for parasitology
- Long-term anticoccidial strategy : chemotherapy plus vaccination – CHAPMAN H.D
- Integrating vaccine and drug schemes – FITZ-COY S.H – World Poultry 2003
- Vaccine can decrease anticoccidial resistance – MATHIS. G.F. – World poultry 2003
- Resistance to anticoccidial drugs in Dutch avian Eimeria spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001 – PEEK H.W. – Avian pathology 2003, vol 32

QUALIFICATION DES FLORES DIGESTIVES DE LA DINDE

Dr Jean Léorat
SELVET-CONSEIL

Introduction

En 15 ans, la production de dinde a vécu le retrait de nombreuses molécules qui contribuaient à la maîtrise de la flore bactérienne ou des protozoaires (arrêt du Dimétridazole, du Roxarsone, du 3 Nitro W, et des antibiotiques régulateurs de flore) et a subi une profonde modification de ses sources en protéines par l'arrêt des farines animales.

Aujourd'hui, l'installation de la flore intestinale et cœcale est primordiale. La flore est la base du métabolisme digestif mais son dérèglement est aussi directement la conséquence d'une fermentation anormale.

1 - Les éléments de maîtrise de l'intégrité intestinale

1.1 - L'intégrité intestinale :

L'intégrité intestinale représente la fonctionnalité optimale du tractus intestinal, le métabolisme digestif, localisé dans l'ensemble de l'intestin et des caeca, dépendant des sécrétions du foie, du pancréas, du proventricule et du broyage du gésier.

1.2 - Les facteurs déterminants pour l'équilibre de la flore :

- La qualité des sécrétions pancréatiques et hépatiques ;
- La qualité et la quantité des excréments hépatiques, pancréatiques et du proventricule ;
- La nature des aliments, avec des nutriments de digestibilité adaptée et un pouvoir hygroscopique résiduel faible ;
- Une eau de qualité chimique et bactériologique maîtrisée.

Mais l'intégrité intestinale est une fonction à grande échelle, avec :

- Une surface d'absorption énorme : pour 200 cm² de surface mesurée, les villosités (x15) et les microvillosités (x20 à x40) augmentent grandement la surface de contact mais aussi les lieux d'attachement des bactéries.
- Une lumière intestinale très riche en bactéries :
 - environ 200 souches bactériennes anaérobies facultatives et strictes ;
 - environ 10¹⁰ à 10¹² bactéries / gramme de contenu intestinal (essentiellement dans l'iléon)

1.3 - Les éléments infectieux perturbateurs :

Notre étude s'oriente essentiellement sur des dindes jeunes (< 40 jours). Malgré cet âge précoce, les éléments perturbateurs sont nombreux et sont identifiés dans d'autres études :

- Etude ITAVI - chambre d'agriculture des Pays de Loire, sur la flore digestive de la dinde et l'effet de l'eau de boisson.
- Process d'analyse du Clostritest - société Elanco

Grâce à tous ces éléments, nous connaissons un peu plus des facteurs primaires perturbateurs du tractus digestif ayant un impact important sur la flore intestinale :

- Circovirus et PEMS (atteinte du système lymphoïde) ;
- Coccidiose ;
- Adénovirus (il existe un vaccin) ;
- Protozoaires : *Trichomonas*, *Cochlosoma*, *Histomonas*, *Cryptosporidia* ;
- *Campylobacter*, spirochètes ;
- Changements alimentaires majeurs, en formulation et en granulométrie (J21 et J35).

Tout ceci a pour effet un profond changement de la flore bactérienne intestinale et cœcale.

2 - Qualification de la flore intestinale et caecale

2.1 - Cadre de l'étude

Les contenus intestinaux et cœcaux ont fait l'objet d'un dénombrement concernant 3 catégories de bactéries réputées être les témoins d'un groupe bactérien. Nous avons recherché et dénombré :

- les coliformes ;
- les anaérobies sulfite-réducteurs ;
- les entérocoques-streptocoques.

Concernant ces 3 groupes, une flore normale devrait contenir : 10^2 à 10^4 bactéries dans le contenu intestinal et 10^3 à 10^5 dans le contenu cœcal.

Les premiers éléments de cette étude reposent sur 6 lots âgés de 5 et 28 jours qui présentaient des troubles digestifs (fientes intestinales gorgées d'eau, fientes cœcales liquides, mousseuses de couleur jaune-beige, comportement de frilosité et/ou paillement) sans que d'autres éléments infectieux (PEMS, coccidiose, spirochètes...) aient pu être mis en évidence par identification directe (grattage de muqueuse et examen microscopique) ou par examen histologique.

2.2 - Flore du contenu intestinal et du contenu caecal

Réf : 06-3715

Animaux : Dindes 17j

Contenu	Coliformes N/gr	Anaérobies sulfito-réducteurs N/gr	Entéro-streptocoques N/gr	Identification	Examen histologique
intestinal 1	3,6.10 ⁵	82	3,45.10 ⁷	Non réalisé	Absence de lésions
intestinal 4	1,55.10 ⁵	3300	6,9.10 ⁷	-	Absence de lésions
intestinal 5	3,2.10 ⁷	82	5,6.10 ⁵	-	Absence de lésions

Réf : 07-1224

Animaux : Dindes 17j

	Coliformes N/gr	Anaérobies sulfito-réducteurs N/gr	Entéro-streptocoques N/gr	Identification	Examen histologique
Intestin 1	-	-	-	-	Entérite grêle systématique, marquée à sévère, lymphocytaire et hyperplasique avec fusion villositaire, lésion fortement évocatrice d'entérite virale. Complication modérée de dysmicrobisme luminal (proliférations bactériennes non attachantes et non effaçantes). Chez l'animal n°4, une complication minime de coccidiose à <i>Eimeria</i> aggrave l'entérite
Intestin 2	-	-	-	-	
Intestin 3	-	-	-	-	
Intestin 4	-	-	-	-	

Réf : 07-1254

Animaux : Dindes 33j

Contenu	Coliformes N/gr	Anaérobies sulfito-réducteurs N/gr	Entéro-streptocoques N/gr	Identification	Examen histologique
Intestinal 2	2,2.10 ³	<10	10 ⁷	Non identifiée (2)	Sévère entérite lymphocytaire et hyperplasique avec atrophie villositaire régénérative, compliquée chez les trois animaux de dysmicrobisme luminal. Coccidiose légère chez l'animal n°2 (intestin grêle et cæcum). L'intensité du dysmicrobisme luminal et de la coccidiose reste minime en regard de la sévérité de l'entérite, qui pourrait être d'origine virale.
cæcal 2	8,4.10 ⁵	<10	10 ⁹	<i>Leuconostoc</i> (1) (2)	
intestinal 3	30	<10	10 ⁹	Non identifiée (2)	
cæcal 3	8.10 ⁵	<10	10 ⁹	Non identifiée (2)	
intestinal 4	2,4.10 ³	<10	10 ⁵	Non identifiée (2)	
cæcal 4	3.10 ⁶	<10	10 ⁹	<i>Streptococcus salivarius</i> (1) (2)	

(1) Souches différentes d'*Enterococcus hirae*, *durans* et *villorum* (PCR)

(2) Souches différentes d'*Enterococcus cecorum* (culture en atmosphère normale)

Réf : 07-1406

Animaux : Dindes 12j

Contenu	Coliformes N/gr	Anaérobies sulfito- réducteurs N/gr	Entéro- streptocoques N/gr	Identification	Examen histologique
intestinal 3	$3 \cdot 10^3$	<10	10^{12}	<i>Leuconostoc</i> (2)	Entérite superficielle légère à marquée, d'origine complémentaire. Lésions lymphoïdes non caractéristiques d'un PEMS ; l'aspect microscopique n'excluant pas cependant une forme atténuée de la maladie PGDS (Poult Growth Depression Syndrome)
Intestinal 4	< 10^3	10	10^8	Non identifiée (2)	
Intestinal 5	10^4	<10	10^{12}	<i>Leuconostoc</i> (2)	

(2) Souches différentes d'*Enterococcus cecorum* (culture en atmosphère normale)

Réf : 07-1754

Animaux : Dindes 28j

Contenu	Coliformes N/gr	Anaérobies sulfito- réducteurs N/gr	Entéro- streptocoques N/gr	Culture en bouillon hypersalé	Identification	Examen histologique
intestinal 1	< 10^4	< 10^4	10^8	Négatif	Non identifiée (2)	Non réalisé
cæcal 1	< 10^4	< 10^4	10^8	Négatif	<i>Leuconostoc</i> (1) (2)	
intestinal 2	< 10^4	< 10^4	10^5	Négatif	Non identifiée (2)	
cæcal 2	10^6	< 10^4	10^5	Négatif	Non identifiée (2)	
intestinal 3	< 10^4	< 10^4	10^8	Négatif	Non identifiée (2)	
cæcal 3	10^6	< 10^4	+ <i>Proteus</i>	Négatif	Non identifiée (2)	

2.3 - Limite de l'étude

Cette première approche de la flore du contenu intestinal et du contenu cæcal ne se veut pas exhaustive. L'objectif est de suivre dans le temps les évolutions majeures de la flore intestinale et d'en retirer les tendances. La dysbactériose représente une perturbation de la flore bactérienne qualifiée de normale mais il convient d'en suivre les dominantes. En 2005 et 2006, la flore dominante bactérienne, que ce soit au niveau du contenu intestinal ou du contenu cæcal, était représentée très largement par des anaérobies sulfito-réducteurs.

Conclusion

Depuis un an et demi, la flore intestinale et cæcale est devenue à dominante entérocoques / coliformes. Il convient toutefois d'observer attentivement :

- le comportement des animaux ;
- la qualité des fientes, en particulier leur teneur hydrique.

Régulièrement, nous prélevons des lots de dindes afin de voir si la flore évolue :

- avec l'âge ;
- avec le type de traitement d'eau ;
- avec l'anticoccidien ;

et en fonction de nos connaissances pour les recherches d'autres agents pathogènes type *Brachispira*, coccidies...

Globalement, dès le jeune âge, on observe :

- une flore intestinale et cæcale pauvre en ASR malgré un aspect entérique (parfois nécrotique) et des typhlites gazeuses ;
- une population énorme d'entérocoques et une grande diversité de lésions intestinales (liquide, mucoïde, rarement nécrotique) et des lésions cæcales (aspect mousseux dominant, pouvant être légèrement liquide) ;
- une explosion variable de coliformes 10^1 à 10^8 avec un contenu intestinal d'aspect mucoïde ;
- et des cæca dont le contenu est très liquide, plus ou moins beige.

CEVAC TRANSMUNE : UNE NOUVELLE APPROCHE DE LA VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO.

Dr Yannick GARDIN, Dr Claire JACQUINET
CEVA SANTE ANIMALE

INTRODUCTION :

La vaccination des poulets de chair contre la Maladie de Gumboro est, de par le monde, la vaccination la plus fréquemment appliquée. Dans la quasi-totalité des pays, la quasi-totalité des élevages mettent en place des programmes de prévention qui, dans les grandes lignes, diffèrent assez peu les uns des autres. Ils visent tous à résoudre une problématique commune qui s'articule autour de 2 nécessités principales :

- la maîtrise d'une immunité passive aussi consistante et homogène que possible pour assurer la protection précoce du poussin en démarrage,
- l'induction d'une immunité active pour prendre le relais de la précédente et protéger ainsi la croissance du poulet.

Après de nombreuses années de mise en place et malgré des efforts réels, tant de la part des éleveurs que des structures d'encadrement, force est de reconnaître que les résultats s'avèrent globalement imparfaits voire décevants. Les outils de diagnostic modernes qui nous permettent aujourd'hui d'évaluer la réalité de la prise vaccinale révèlent qu'en effet, 10% à 50% des élevages vaccinés ne sont pas protégés. Les raisons principales qui expliquent ces échecs sont l'interférence des anticorps d'origine maternelle (AOM) avec les vaccins vivants atténués, et la difficulté de réaliser correctement une vaccination par l'eau de boisson en élevage.

Pour résoudre ces problèmes, de nouveaux vaccins ont été développés et sont aujourd'hui disponibles. Ils reposent soit sur le principe de la recombinaison génétique (vaccins vecteurs) soit sur le principe des complexes immuns (vaccins antigène - anticorps). Capables d'assurer une prise vaccinale en présence d'AOM, ils autorisent donc une vaccination très précoce automatisée, au couvoir, soit par voie sous-cutanée, soit « *in-ovo* », et de ce fait permettent une couverture vaccinale quasi parfaite.

L'objectif de cet article est de présenter un vaccin de type antigène – anticorps : Cevac Transmune (Ceva Santé Animale) et les avantages qu'il apporte.

LES PROBLEMES DE LA VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO :

Le virus de la Maladie de Gumboro (Infectious Bursal Disease Virus = IBDV) est extrêmement résistant dans l'environnement et peut persister très longtemps dans les bâtiments d'élevage, et notamment dans la litière. De ce fait, dans la majorité des cas, les poussins sont potentiellement confrontés au virus dès qu'ils sont sortis des boîtes et déposés sur le sol de l'élevage. Une protection très précoce est donc nécessaire, ce qui est obtenu par la vaccination des poules reproductrices qui retransmettent aux poussins une partie des anticorps qu'elles fabriquent : ce sont les Anticorps d'Origine Maternelle (AOM). Cette protection passive ne dure pas, il est nécessaire de la prolonger par une protection active que l'on induit en vaccinant les poussins. Cette vaccination se réalise donc en milieu infecté, concomitamment au challenge par le virus sauvage, et non avant, comme c'est le cas habituellement pour d'autres maladies (Bronchite

infectieuse, Maladie de Newcastle, etc). Les échecs de vaccination sont donc souvent sanctionnés par l'infection des poulets par le virus sauvage et la maladie. Le problème est que les AOM, sont très efficaces et protègent le poulet aussi bien contre les infections virales précoces que contre les virus vaccinaux, tant que leur niveau est suffisamment élevé (notion de seuils de protection ou de prise vaccinale).

En pratique, la stratégie vaccinale pour contrôler la maladie de Gumboro repose donc à la fois sur :

- **la Vaccination des reproductrices** avec un programme vaccinal lourd incluant des vaccins vivants et inactivés appliqués successivement afin d'obtenir une hyper immunisation et de protéger leur progéniture contre un challenge précoce grâce au transfert de taux élevés d'AOM.
- **la Vaccination des poulets** avec des vaccins vivants pour prendre le relais de l'immunité passive et les protéger jusqu'à l'abattage.

Dans les conditions de terrain, l'application de cette stratégie vaccinale rencontre en réalité de nombreux problèmes que l'on peut regrouper en 3 catégories:

Des problèmes liés à l'immunité passive :

- Il existe des **variations des taux d'anticorps des reproductrices**, d'un parquet à l'autre, et d'un individu à un autre. Par conséquent, des **variations similaires sont observées entre les poussins d'un jour**.
- Sachant que les niveaux "trop" élevés d'AOM neutralisent les vaccins, et que le virus sauvage est déjà dans la litière, « prêt » à infecter les poussins, il est fondamental de **déterminer la Date Optimale de Vaccination (DOV)**, c'est à dire, le moment où les AOM atteignent un taux qui reste encore protecteur mais autorise la réplication du virus vaccinal administré massivement. Appliqué trop tôt, le vaccin sera neutralisé et l'immunité ne se développera pas. Appliqué trop tard, le risque d'infection par le virus sauvage sera fortement augmenté. Cette détermination de la DOV nécessite de prélever des échantillons de sang sur des poussins de 1 jour, et de mesurer leur taux d'AOM par sérologie ELISA.

Des problèmes liés au choix du (des) vaccin(s) :

- **Le choix des vaccins doit tenir compte de la nature et de la virulence du (des) virus sauvage(s) en présence.** On sait que seuls les vaccins de type « **Intermédiaire Plus** » sont capables de protéger efficacement contre le challenge des virus dits hyper-virulents (vvIBDV).
- **Les vaccins de type « Intermédiaire » diffusent difficilement** des poussins vaccinés aux poussins non vaccinés, de sorte qu'il est très difficile de déterminer une DOV unique adaptée à tous les individus capable d'assurer une couverture efficace de tout le lot.
- C'est pourquoi, pour offrir la plus large couverture possible, il est souvent **nécessaire de vacciner plusieurs fois un même lot avec un vaccin vivant.**

Des problèmes liés à l'application du vaccin :

- En raison de l'interférence entre les AOM et les vaccins vivants, la vaccination ne peut s'opérer qu'en élevage, lorsque les poulets sont âgés de 10 à 20 jours et ont alors éliminé la plus grande partie de leurs AOM. La voie d'administration la plus efficace est l'eau de boisson. La date optimale est difficile à déterminer sans le recours à la sérologie.
- De nombreux facteurs peuvent contribuer à inactiver partiellement voire totalement le virus vaccinal après reconstitution dans l'eau de boisson : parmi ceux-ci, la présence de chlore résiduel est le plus important.
- Enfin, l'une des raisons majeures susceptible d'entraver le succès de la vaccination reste la difficulté de s'assurer que chaque poulet consommera la quantité nécessaire de solution vaccinale.

Globalement, bien que d'énormes efforts aient été régulièrement faits depuis plus de deux décennies pour former les éleveurs aux procédures de vaccination, à l'utilisation de

neutralisants du chlore, à l'emploi de traceurs pour s'assurer de la bonne distribution et de la consommation du vaccin, et l'incitation à déterminer la DOV par des analyses sérologiques, les échecs de vaccination restent fréquents. Le pourcentage global d'échecs se situe généralement entre 10 et 30 % des lots, voire au-delà et les analyses de laboratoire permettent facilement de le mettre en évidence (voir figures 1 et 2).

De ce fait, au niveau global d'une organisation de production, compte tenu de ses conséquences sur les défenses immunitaires, sur la résistance aux autres infections, et sur les performances de croissance, la maladie de Gumboro reste économiquement préjudiciable, qu'elle se voie (maladie clinique avec mortalité), ou ne se voie pas (maladie sub-clinique).

La possibilité d'un meilleur contrôle de la prévention vaccinale représente donc un réel facteur de progrès.

UNE REPONSE AUX PROBLEMES DE VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO : CEVAC TRANSMUNE.

Qu'est ce que Cevac Transmune ?

Cevac Transmune IBD est un vaccin vivant contre la maladie de Gumboro d'un genre très particulier dénommé "complexe antigène - anticorps (ou immun complexe). Il est produit à partir d'une suspension de la souche atténuée du virus IBD Winterfield 2512, produite sur oeufs embryonnés SPF, mélangée en proportions très définies et contrôlées, à un sérum collecté sur des poulets SPF hyperimmunisés. Les anticorps spécifiques anti-IBDV sont appelés "Virus Protecting Immunoglobulins" (VPI) ou « immunoglobulines protégeant le virus ». Les VPI s'attachent au virus vaccinal et le recouvrent.

Le produit final est lyophilisé et doit être reconstitué dans un diluant spécifique avant utilisation. L'administration se fait par voie « *in-ovo* » (0,05 ml) au couvoir (l'administration au poussin de 1 jour par voie sous-cutanée est également possible et fréquente de par le monde, mais reste hors AMM - Autorisation de Mise sur le Marché - en Union Européenne).

Le concept d'un vaccin antigène – anticorps fut initialement le fruit de la recherche de Sanofi Animal Health Inc., division américaine de Sanofi Santé Nutrition Animale, devenu Ceva Santé Animale en 2000.

Depuis, le concept a été développé et considérablement enrichi par le département de Recherche et Développement virologique de Ceva Santé Animale en Hongrie (Ceva Phylaxia). Pour parfaire aux exigences de la Pharmacopée européenne, les procédures de contrôle de qualité, d'innocuité, de potentiel et d'efficacité ont été entièrement revues. La composition du vaccin est précisément connue et contrôlable sur le produit fini.

Comment fonctionne Cevac Transmune ?

Grâce aux VPI, le virus vaccinal n'est pas reconnu par le système immunitaire du poussin et par conséquent n'est pas détruit comme le serait n'importe quel vaccin vivant administré en présence de taux élevés d'AOM. Le vaccin se révèle ainsi insensible aux AOM et peut être administré dès le plus jeune âge, aux poussins d'un jour voire à l'œuf embryonné.

Après injection, Cevac Transmune IBD est capturé par les cellules folliculaires dendritiques de la rate : les VPI sont ensuite régulièrement catabolisées et le virus vaccinal est libéré de façon continue dans le flux sanguin.

Tant que le niveau global des AOM reste élevé, le virus vaccinal est neutralisé, mais lorsqu'il devient plus faible, le virus vaccinal leur échappe et atteint la Bourse de Fabricius où il se réplique et assure ainsi le développement de la protection. Sur le poussin SPF (souche ponte dépourvu d'AOM), ce phénomène se produit vers 8 à 10 jours d'âge. Sur le poussin commercial, porteur d'AOM, il s'opère autour de 3-4 semaines (18 à 28 jours), à un âge qui varie selon le niveau d'AOM à 1 jour.

Ainsi, quel que soit le niveau des AOM, la protection se développe sur tous les sujets de tous les lots, à un âge relativement prévisible pour un type de poulet donné, et très généralement avant que le virus sauvage ne puisse agir.

Le vaccin a été développé et amplement testé sur des poulets de chair de type « lourd » (standard ou lourd) et ses performances en termes d'innocuité et d'efficacité sur des poulets de ce type y sont très bien connues.

Du fait de la relation entre la vitesse de croissance et la vitesse de décroissance des AOM, et donc de l'adaptation nécessaire de la composition du vaccin à un type de production, l'utilisation sur les poulettes futures pondeuses ou reproductrices est contre indiquée. L'utilisation sur des productions développées à partir de souches légères (poulets labels, fermiers et certifiés) est en cours de validation et nécessite la mise en place d'un protocole de suivi particulier.

Quels résultats ont été obtenus avec Cevac Transmune sur le terrain ?

Cevac Transmune IBD a fait l'objet de nombreux essais terrain conduits à grande échelle, contrôlés de façon très rigoureuse, dans différentes conditions de production, en Europe, en Amérique latine, en Asie, au Moyen-Orient et en Afrique. Au global, Ceva Santé Animale a récolté des résultats très précis sur plus de 30 millions de poulets vaccinés (environ 2000 bâtiments de volailles), en comparaison avec un nombre similaire de lots recevant le programme de vaccination habituel de l'organisation considérée.

Dans tous les cas, la couverture vaccinale a été améliorée (voir figure 1 et tableau 1), et dans la majorité des cas, cela s'est traduit par une amélioration des performances économiques. Dans aucun cas, il n'a été enregistré de résultat négatif.

LES POINTS CLE DE CEVAC TRANSMUNE IBD :

Les 5 avantages majeurs de Cevac Transmune sont les suivants :

- **Une seule administration automatique (ou semi-automatique dans le cas d'une injection SC) par injection fiable au couvoir à un âge fixe.** La mise en œuvre de la vaccination au couvoir est mieux contrôlée que sur le terrain. Le pourcentage de poulets réellement en contact avec le vaccin est nettement supérieur à celui enregistré avec les vaccins vivants classiques administrés dans l'eau de boisson ou par nébulisation.
- **La couverture vaccinale est totale et sûre pour tous les poussins de tous les lots.** Cevac Transmune initie le développement d'une protection active quand les AOM ont atteint des niveaux moyens à faibles, de façon adaptée à chaque poussin, de sorte que l'on obtient un développement uniforme de l'immunité vaccinale chez tous les poulets de tous les lots à un âge très prédictible, et ce, quel que soit le taux d'AOM.
- **Une maîtrise réelle de la maladie de Gumboro, accompagnée d'une amélioration des performances technico-économiques.** Cevac Transmune IBD protège contre toutes les formes de maladie de Gumboro induites par les souches virales classiques, quelle que soit leur degré de virulence, aussi bien sub-cliniques que cliniques ou hyper virulentes.
- **La possibilité de suivre la prise vaccinale en utilisant une méthodologie et des outils de laboratoire sélectionnés et validés sur de grands effectifs.** Un Système de Monitoring Technique (SMT), basé sur la collecte et l'analyse de prélèvements (sérums / bourses de Fabricius) est disponible et permet une réelle traçabilité des lots vaccinés (voir figure 2)
- **Des propriétés d'innocuité, d'efficacité, de fiabilité et de rentabilité basés sur des résultats d'essais terrain menés sur de très grands effectifs de poulets de chair, répartis dans de très nombreux lots produits par des organisations très différentes dans des pays variés.** L'importance des essais de validation réalisés a confirmé, dans les conditions du terrain, la réalité des avantages attendus.

Tableau 1 : SUIVI COMPARATIF PAR HISTOLOGIE DE LA VACCINATION AVEC CEVAC TRANSMUNE.

Informations :

Lots « vaccinés » (19) : Cevac Transmune - « *in-ovo* ».
 Lots « témoins » (20) : vaccin Intermédiaire Plus - eau de boisson à 17 jours.
 Histologie : 5 bourses de Fabricius (BF) par lot à chaque âge concerné.
 Score : 0 : aucune BF positive - + : au moins une BF positive.

Essai terrain réalisé en Grande Bretagne fin 2006 – début 2007 dans le cadre du dossier réalisé pour l'obtention de l'enregistrement (AMM) en Union Européenne.

Résultats :

LOTS « VACCINES »						LOTS « TEMOINS »					
LOT	Résultats histo. à (jours) :					LOT	Résultats histo. à (jours) :				
	14	21	28	35	42		14	21	28	35	42
1	0	+	+	+	NT	20	0	0	+	NT	NT
2	0	+	+	+	NT	21	0	0	+	+	NT
3	0	0	+	+	+	22	0	0	+	+	NT
4	0	0	+	+	NT	23	0	0	0	0	NT
5	0	+	+	+	NT	24	0	0	+	+	NT
6	0	+	+	+	NT	25	0	0	+	+	NT
7	0	+	+	+	NT	26	0	0	+	NT	NT
8	0	+	+	+	NT	27	0	0	0	0	NT
9	0	+	+	+	NT	28	0	0	0	EC	NT
10	0	0	+	+	NT	29	0	0	+	+	NT
11	0	+	+	+	NT	30	0	0	+	+	NT
12	0	+	+	NT	NT	31	0	0	0	0	0
13	0	+	+	+	NT	32	0	0	+	+	NT
14	0	+	+	NT	NT	33	0	0	+	+	NT
15	0	+	+	+	NT	34	0	0	+	NT	NT
16	0	+	+	+	NT	35	0	0	+	+	NT
17	0	+	+	+	NT	36	0	0	+	+	NT
18	0	+	+	+	NT	37	0	0	+	+	NT
19	0	+	+	+	NT	38	0	0	+	+	NT
						39	0	0	+	+	NT

0 : histologie négative / + : histologie positive / NT : non testé / EC : Episode clinique

Interprétation / commentaires :

Lots « vaccinés » :

A 21 jours la plupart des lots « vaccinés » sont positifs (la réplication du virus vaccinal a eu lieu – les lots sont protégés) et à 28 jours, tous les lots « vaccinés » sont positifs.

Lots « témoins » :

A 21 jours, aucun lot « témoin » n'est positif, ce qui s'explique par le délai court entre la vaccination (17 jours) et le prélèvement.

A 28 jours, la majorité des lots sont positifs, mais 4 lots sont négatifs : la vaccination n'a pas « marché ». A 35 jours, 3 de ces 4 lots sont restés négatifs, tandis que le 4^{ème} lot a subi un passage de virus Gumboro virulent (vvlBDV) sauvage (épisode clinique avec mortalité).

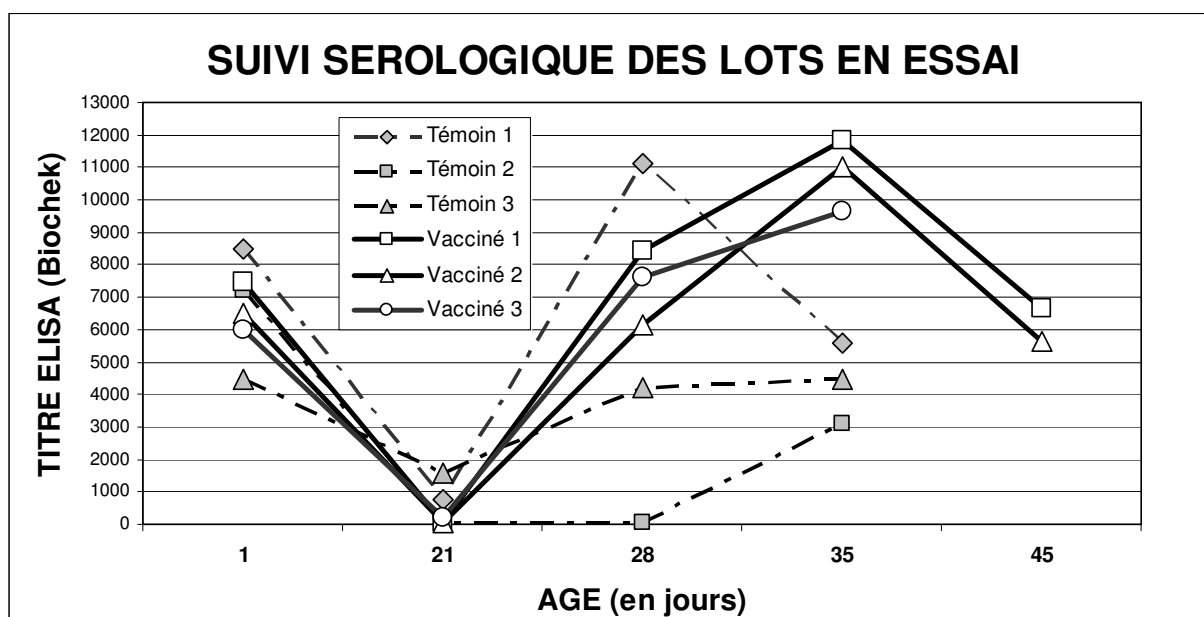
Figure 1 : SUIVI COMPARATIF PAR SEROLOGIE ELISA DE LA VACCINATION AVEC CEVAC TRANSMUNE.

Informations :

Lots « vaccinés » (3) : Cevac Transmune - « *in-ovo* ».
 Lots « témoins » (3) : vaccin Intermédiaire - eau de boisson à 14 jours.
 Sérologie ELISA : 20 prises de sang par lot et par âge testé. Toutes les analyses réalisées le même jour par le même laboratoire avec le même lot de kit (marque Biocheck).

Essai terrain réalisé en Espagne en 2007.

Résultats :



Interprétation / commentaires :

Lots « vaccinés » :

A 21 jours les 3 lots présentent des taux d'anticorps ELISA négatifs, ce qui est attendu avec Cevac Transmune.

A 28 jours, les 3 lots sont positifs. L'analyse virologique confirme la présence de la souche vaccinale au niveau des bourses de Fabricius : les 3 lots ont été effectivement « vaccinés ».

Lots « témoins » :

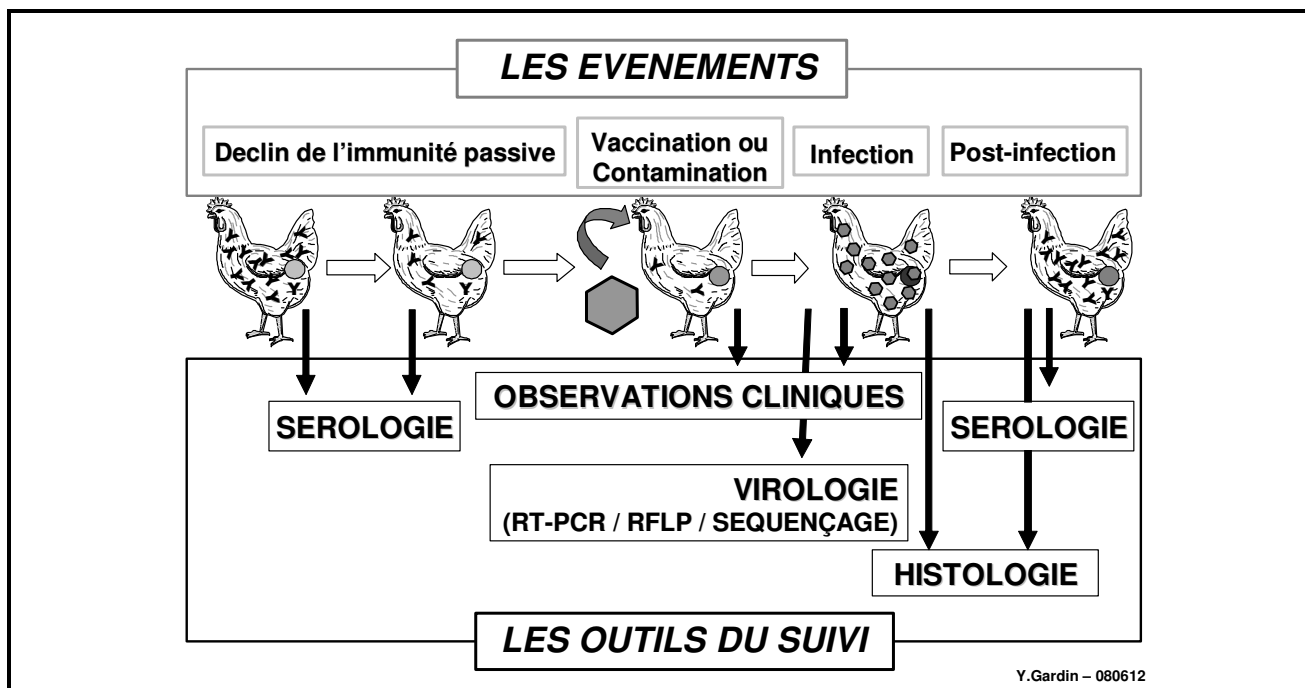
A 21 jours, les 3 lots présentent des taux d'anticorps ELISA négatifs, ce qui est attendu du fait du faible intervalle vaccination (14 jours) – prélèvement (21 jours).

A 28 jours, 2 lots sur 3 sont positifs à la vaccination. Le lot témoin numéro 2 reste négatif.

A 35 jours, ce lot devient positif et l'analyse virologique révèle l'infection du lot par un virus de type sauvage, non hyper virulent (aucun signe clinique n'a été détecté).

Au global, un lot sur 3 n'a pas été protégé.

Figure 2 : LE SUIVI DE L'INFECTION ET DE LA VACCINATION A L'AIDE DES OBSERVATIONS CLINIQUES ET OUTILS DE LABORATOIRE.



Chaque événement (E) peut être mis en évidence, parfois sur le terrain quand les signes cliniques sont présents, et dans tous les cas, au laboratoire grâce aux outils de suivi (O):

- E :** Les poussins naissent avec des Anticorps d'Origine Maternelle (AOM – immunité passive) qui s'épuisent avec le temps.
- O :** La sérologie permet de mesurer le niveau de départ en AOM et de suivre leur décroissance.

- E :** Lorsque le niveau des AOM est devenu faible, les poulets peuvent être :
 - 1) soit vaccinés par le virus vaccinal vivant atténué : on aura alors protection,
 - 2) soit contaminés (éprouvés - challengés) par le virus sauvage : l'infection qui s'en suit aura pour conséquence la maladie, plus ou moins visible (clinique), et plus ou moins préjudiciable, selon la nature du virus, sa virulence, et les qualités de l'élevage.

- O :** Les observations cliniques, qui accompagnent les derniers stades de l'infection du troupeau par un virus sauvage très virulent, sont précieuses.

La vaccination comme l'infection sauvage peuvent être mises en évidence au laboratoire, quelques jours seulement après l'évènement, par histologie et/ou virologie.

- C'est l'histologie qui met en évidence de manière très précoce, et sans risque d'erreur, la présence des lésions qui, au niveau de la bourse de Fabricius, accompagnent la répllication d'un virus de Gumboro, vaccinal ou sauvage. Elle manque en revanche de spécificité, car elle ne permet pas de dire, sans risque d'erreur, lequel des deux est responsable des lésions observées.

- La virologie permet de confirmer que les lésions sont bien attribuables à un virus de Gumboro (RT-PCR), et de préciser sa nature (vaccinale ou sauvage) et même de l'identifier avec précision (RFLP – séquençage). On peut ainsi affirmer que c'est bien le virus correspondant au vaccin utilisé qui s'est répliqué.

- E :** Après l'infection, en phase dite « post-infectieuse », les poulets produisent des anticorps.
- O :** La sérologie détecte l'infection, de façon tardive (8 à 15 jours après) mais spécifique (seule une infection par le virus de Gumboro est capable d'induire la production d'anticorps

Gumboro. Si les anticorps ne sont pas détectés au plus tard 15 jours après vaccination, on peut affirmer que celle-ci n'a pas « marché ». Le point faible est que la sérologie ne permet pas de distinguer les anticorps dits « post-vaccinaux » des anticorps dits « post-infectieux ».

Intérêts et limites des différents outils de diagnostic de la maladie de Gumboro

Dr Christophe DE LANGHE
INTERVET SCHERING PLOUGH SANTE ANIMALE

Le virus de la Maladie de Gumboro (IBDV) est responsable de pertes économiques pour l'industrie avicole, de troubles de la digestion et de l'immunité avec des répercussions secondaires souvent importantes. L'agent de la Maladie de Gumboro n'est cependant pas spécifique de ces symptômes. La relation entre la clinique et le passage du virus ou les traces de son passage peut être contrôlée par des outils de laboratoire. Différentes techniques de laboratoire existent avec des limites pour chacune d'elles. Ces contrôles nécessitent la réalisation de prélèvements dont la réussite conditionne pleinement les résultats d'analyse. Un nouvel outil de diagnostic appelé Nobivet Gumboro Test va contribuer à mieux reconnaître les formes subcliniques de la maladie.

1. Choix et limites du diagnostic de laboratoire

La confirmation de passage du virus de la Maladie de Gumboro (IBDV) par la technique ELISA (Enzym Linked Immunosorbent Assay) s'est développée depuis quelques années en examen complémentaire. Une forte augmentation des titres d'immunoglobulines (IgG) en technique ELISA classique est consécutive à la présentation des antigènes du IBDV au système immunitaire de l'oiseau. Elle caractérise l'évolution de la protection à médiation humorale. La technique ELISA ne distingue parfois pas clairement une séroconversion vaccinale « intermédiaires plus » d'une séroconversion liée à un virus sauvage. La technique sérologique pour le diagnostic n'est donc pas utilisable dans toutes les conditions (voir §3). Au laboratoire, l'ELISA demeure majoritairement réservée à la détermination du niveau de transmission des anticorps d'origine maternelle et la détermination des dates de vaccination en élevage.

Si la mesure des traces du passage d'un virus Gumboro dans le sang par sérologie n'est pas utilisable, l'observation des lésions des organes cibles du virus et des cellules de ces organes par histologie apporte des indications sur l'origine des symptômes. L'organe de choix est alors la Bourse de Fabricius. L'étude est réalisée par un spécialiste en histologie. La plupart des vaccins, hormis les vaccins recombinés, entraîne des lésions transitoires sur les Bourses de Fabricius. Distinguer l'effet des virus sauvages de celui d'un vaccin rend l'interprétation délicate.

Enfin, il est possible de mettre en évidence le virus lui-même et non plus les traces du passage viral. Les principales techniques utilisées sont la vironeutralisation, qui identifie des antigènes viraux, et les méthodes de diagnostic basées sur l'analyse du génome (PCR, séquençage). Ces techniques participent à la veille des souches de virus circulant et vérifient l'adéquation entre les vaccins utilisés et les agents pathogènes, c'est-à-dire l'adéquation du protectotype vaccinal.







TYPE D'ANALYSE	CHOIX DES ANIMAUX	RECHERCHE EFFECTUÉE	RAPIDITE	FRÉQUENCE	INTÉRÊT
Sérologie	Poussin J1	Dates de vaccination	+++ +	Tous les lots en vaccin chaud	
	Adultes à l'abattage	Passage viral ou contrôle de vaccination	+++	Enquête ou manque de performances	
Histologie	Adultes	Agressivité des virus	++	Suspicion virus hypervirulents	
Nobivet Gumboro Test	Adultes	Passage viral ou contrôle de vaccination	++++ ++	Suspicion Gumboro subclinique ou clinique	
Vironeutralisation	Adultes	Classification et contrôle d'efficacité des vaccins	+	Cas d'échec avéré de la prévention	
Analyse Génétique	Adultes	Epidémiologie	+	Etude de circulation des virus	

Figure A : Intérêt pratique des différentes méthodes d'analyses pour la Maladie de Gumboro

2. Conséquences pratiques du choix de la méthode de diagnostic

a. Réalisation et conservation du prélèvement

La mesure d'une séroconversion se fait en tenant compte du délai nécessaire à l'oiseau pour fabriquer les anticorps circulants. Le prélèvement sanguin doit donc être réalisé au moins quinze jours après l'épisode clinique. Le prélèvement peut se faire sur tube sec à partir de la veine allaire. Une série minimum de 20 prélèvements est alors nécessaire pour être représentatif du troupeau si le prélèvement est unique. La multiplication des séries de prélèvements en pratiquant par exemple plusieurs séries de 5 prélèvements sanguins toutes les semaines dès le début d'un épisode clinique apporte cependant plus d'information sur la chronologie des événements. La puissance statistique est alors bonne du fait de la prévalence généralement haute du virus sauvage dans un troupeau. La manipulation est plus lourde. Les prélèvements sanguins sont conservés immédiatement au frais au maximum trois jours si un tube sec a été utilisé. Ils sont centrifugés puis congelés pour être analysés une fois l'ensemble des prélèvements effectués. Cette méthode a l'avantage de mieux mesurer l'effet sérologique du vaccin par rapport à celui du virus sauvage. (Cf cas pratique §3.)

Le prélèvement pour histologie doit être réalisé au moment de l'épisode clinique. Les Bourses de Fabricius sont alors prélevées et conservées dans le formol avant l'envoi au laboratoire spécialisé. Le résultat est obtenu généralement en une semaine.

Le prélèvement pour recherche du virus doit être fait également au moment de l'épisode clinique. L'analyse se fait à partir de Bourses de Fabricius congelées qui sont expédiées à un laboratoire spécialisé. Ces recherches de virus étaient peu réalisées jusqu'à ce jour du fait des longues durées entre le prélèvement et l'obtention du résultat des analyses. La recherche de virus au sein

de la Bourse de Fabricius présente un intérêt de diagnostic. L'utilisation de kit de dépistage rapide récemment commercialisé par le laboratoire Intervet Schering Plough Santé Animale permet de faire cette recherche au sein du cabinet vétérinaire. Il s'agit d'un test chromatographique qui détecte la présence d'antigène du virus. Le Nobivet Gumboro Test a la capacité d'indiquer la présence de virus Gumboro dans la Bourse de Fabricius avec un délai de quelques minutes seulement à partir d'organes frais ou congelés. Le Nobivet Gumboro Test met en évidence du virus à la dose de 10^3 EID₅₀/ml ce qui est une dose très faible. Il est pratiqué après écouvillonnage de Bourses de Fabricius par pools de 5. Une recherche virologique complémentaire peut ensuite être menée pour identifier le type de virus Gumboro par méthodes PCR ou en Vironeutralisation à partir des oiseaux ayant donné un test positif. (Figure A).

b. Interprétation du résultat de laboratoire

Pour interpréter un résultat de sérologie Gumboro, le praticien doit connaître le programme de vaccination avec précision (type de vaccin pratiqué et date de vaccination), la date du prélèvement par rapport au début des symptômes et bien sûr le kit d'analyse choisi. Lorsque l'oiseau est immunocompétent, un virus sauvage donne une forte séroconversion. Les vaccins « intermédiaires plus » donnent cependant des séroconversions d'un niveau élevé et dans ce cas l'interprétation est délicate. C'est l'absence de séroconversion totale qui est le résultat le plus facile à interpréter et qui permet d'écarter le rôle d'un virus sauvage Gumboro dans l'épisode clinique. Ce résultat indique également que la vaccination Gumboro a échoué. Les vaccins intermédiaires donnent des séroconversions moins importantes ce qui permet de mettre plus facilement en évidence le rôle d'un virus sauvage par sérologie Elisa.

L'interprétation d'un résultat en histologie est souvent délicate lorsque le prélèvement a été effectué dans les jours qui suivent une vaccination Gumboro. La présence de lésions naturelles, fugaces et sans incidence sur la santé des oiseaux liée à l'utilisation des vaccins Gumboro est peu différente des stades précoces des lésions pathologiques engendrées par un virus sauvage. Pour réaliser une bonne interprétation, le praticien doit absolument connaître le programme de vaccination avec précision (type de vaccin pratiqué et date de vaccination), la date du prélèvement par rapport au début des symptômes. Le résultat de l'histologie apporte une information souvent difficile à exploiter et il faut réserver cette analyse pour confirmer un diagnostic.

La présence de virus Gumboro dans la Bourse de Fabricius n'est normale que s'il s'agit de vaccin. L'existence de symptômes de Maladie de Gumboro et la présence de virus dans les Bourses de Fabricius permettent de conclure à un échec vaccinal. Dans cette situation, le Nobivet Gumboro Test permet de confirmer rapidement un diagnostic de Maladie de Gumboro (figure B).

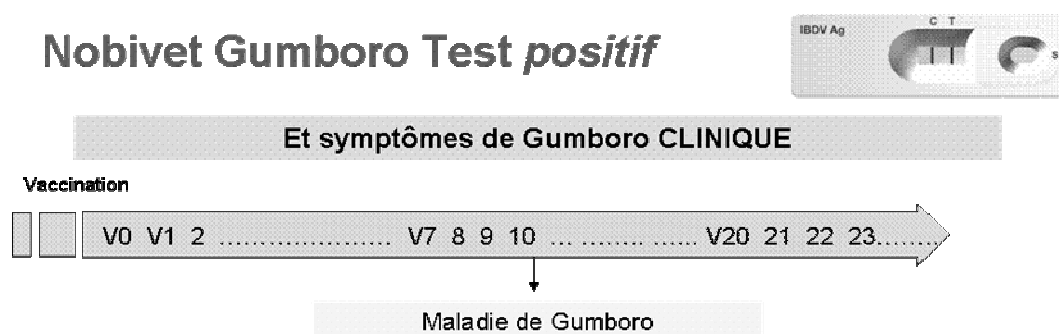


Figure B : Interprétations d'un résultat au Nobivet Gumboro Test en fonction du nombre de jours post-vaccination.

Le diagnostic de Gumboro subclinique est en général plus délicat à établir mais le Nobivet Gumboro Test est d'un grand service. Un test positif associé à des symptômes de Gumboro subclinique doit permettre de confirmer une Maladie de Gumboro. Cette conclusion est sans équivoque en dehors de la période de 8 à 21 jours suivant la vaccination. Le virus vaccinal peut interférer avec le résultat du test, spécialement lors de l'utilisation de vaccin Gumboro de virulence moins atténuée comme les vaccins « intermédiaires plus » par exemple. Dans la période 8/21 jours après la vaccination, l'interprétation devra tenir compte de l'intensité des symptômes, du niveau de biosécurité de l'élevage, de la qualité de la prévention vaccinale réalisée et du type de vaccin utilisé avant d'aboutir au diagnostic. Un traitement complémentaire du prélèvement positif par PCR ou par vironeutralisation lèvera définitivement le doute. (figure C). En dehors de cette situation, l'identification virale n'a d'intérêt en pratique que si elle indique si les vaccins correspondent ou pas au bon protectotype. La mise en évidence de dérives génétiques des virus sauvages n'apportera une information pratique que si elle démontre que le virus n'est plus couvert par les protectotypes vaccinaux. Le résultat de la PCR ou de la vironeutralisation doit donc pouvoir indiquer clairement cette information.

L'utilisation du test à l'abattage représente la situation type où le test apporte une information immédiatement interprétable pour mettre en évidence la circulation de virus sauvage dans les élevages. La combinaison du Nobivet Gumboro Test et de la sérologie Elisa donne aussi de bonnes perspectives pour le suivi de prise vaccinale de lots de poulets d'élevage sous « pression Gumboro ». En pratique, sur huit lots de poulets vaccinés Gumboro suivi par le laboratoire Intervet, le Nobivet Gumboro Test a détecté le virus vaccinal systématiquement avant l'Elisa. Un test positif après séroconversion oriente.

Le diagnostic vers une épreuve virale sauvage. (Cf le cas au §3)

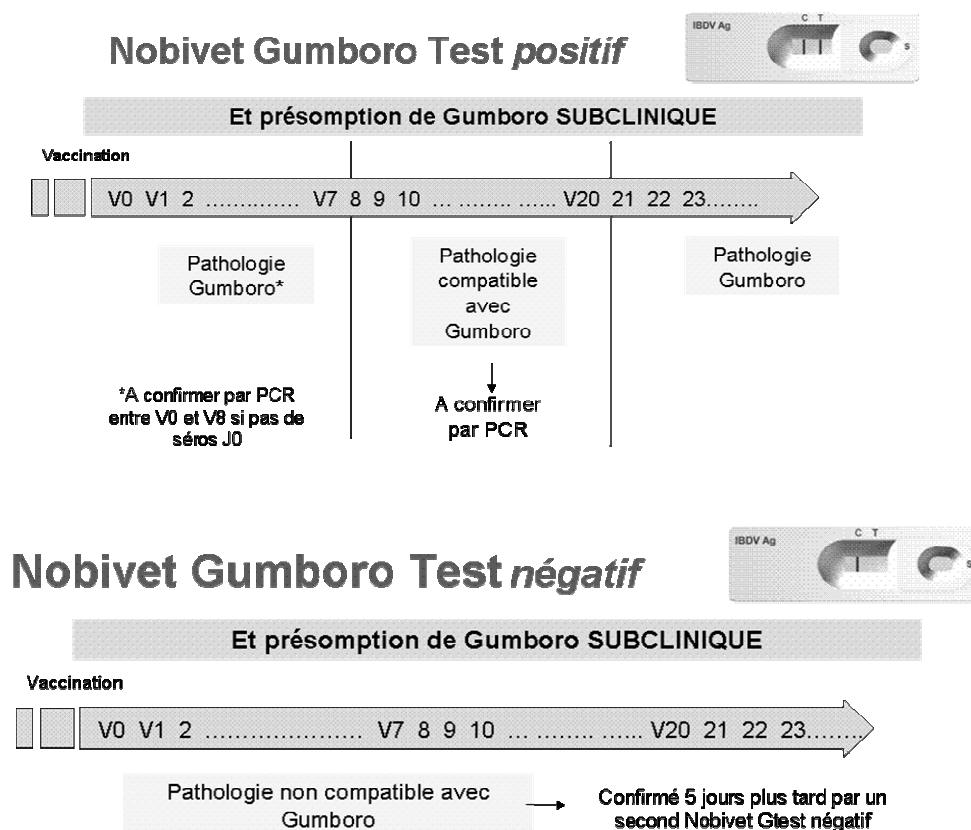


Figure C : Interprétations d'un résultat au Nobivet Gumboro Test en fonction du nombre de jours post-vaccination.

3. Exemple d'un cas pratique de diagnostic Gumboro subclinique

Un lot de poulets est suivi tous les trois jours après la vaccination Gumboro par un test sérologique Elisa. Ce lot de poulets montre un léger décrochage de la courbe de poids, des fientes liquides et une baisse de la consommation vers J37, soit 18 jours après la vaccination. Les sérums prélevés sont alors analysés et montrent que la séroconversion a déjà commencé au moment des premiers symptômes indiquant que le vaccin intermédiaire utilisé s'est bien installé. Les Bourses de Fabricius des animaux ayant participé au monitoring sont testées avec le Nobivet Gumboro Test et tous les tests sont restés négatifs jusqu'à 42 jours d'âge indiquant que le test n'a pu dépister la multiplication du virus vaccinal. A J42, 3 Bourses de Fabricius sur 5 répondent alors positivement au test indiquant que le lot subissait un challenge sauvage expliquant les symptômes observés (figure D). Il a été conclu que le lot de poulets présentait une pathologie Gumboro subclinique en lien avec un virus en cours d'identification. Le lot suivant de poulets a été vacciné avec un vaccin Intermédiaire Plus.

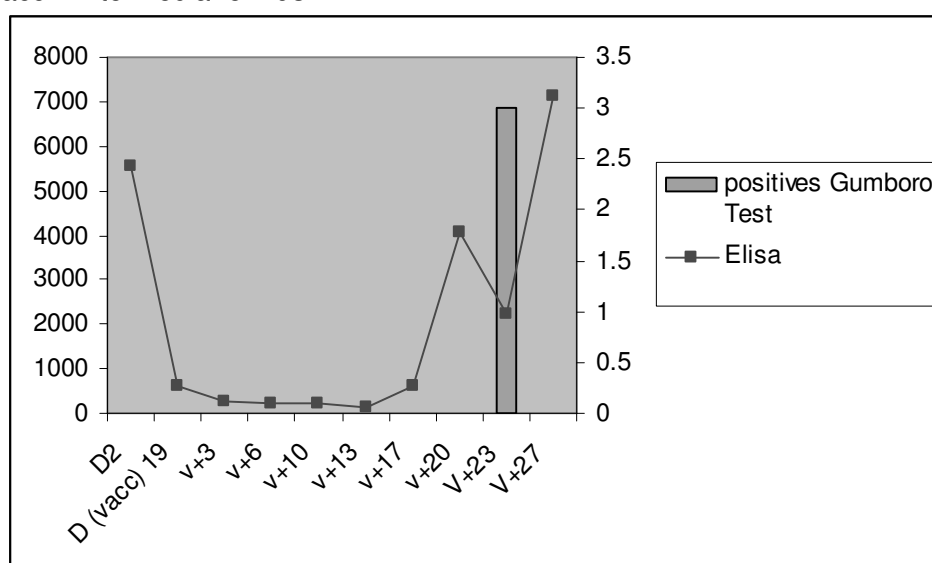


Figure D : Diagnostic de Maladie de Gumboro subclinique par le Nobivet Gumboro Test et l'Elisa Biochek.

Conclusion

Les moyens d'investigation pour la maladie de Gumboro se multiplient permettant ainsi de mieux comprendre la pathologie et sa prévention. L'utilisation de la sérologie reste le moyen de diagnostic le plus courant à ce jour mais elle est majoritairement réservée pour déterminer le moment idéal pour la vaccination. Le dépistage d'un virus par la méthode du Nobivet Gumboro Test est une méthode rapide. Son utilisation doit pouvoir améliorer considérablement la connaissance des pathologies Gumboro subcliniques et étudier la niveau de pression virale des élevages.

Vaccination Marek et Gumboro au couvoir : les apports de VAXXITEK® HVT+IBD.

Dr Paul MORILLON
MERIAL

VAXXITEK® HVT+IBD est le premier vaccin bivalent au monde permettant de protéger simultanément contre les maladies de Marek et de Gumboro. Il s'administre au couvoir *in ovo* au moment du transfert des œufs en éclosoir, ou par voie sous-cutanée juste après l'éclosion.

1. Vaccin bivalent Gumboro-Marek

Le virus vaccinal HVT (Herpèsvirus de la dinde) contenu dans VAXXITEK® HVT+IBD se multiplie dans les lymphocytes de l'hôte comme n'importe quel virus de la maladie de Marek et exprime la VP-2 (Protéine Virale n°2) du virus de la maladie de Gumboro.

Le HVT engendre une immunité contre la maladie de Marek, tandis que la VP-2 est le principal composant immunogène protecteur, commun à toutes les souches connues de virus de la maladie de Gumboro.

Tout animal recevant ce vaccin se trouve donc protégé à la fois contre les maladies de Marek et de Gumboro.

2. Vaccination au couvoir :

Du fait que l'immunité se développe grâce à la protéine VP-2 au lieu du virus complet, il n'y a pas de risque de neutralisation du vaccin par les anticorps maternels dirigés contre la maladie de Gumboro. La vaccination peut donc être réalisée dès le couvoir, *In Ovo* ou chez les poussins d'un jour par voie sous-cutanée, ce qui permet une protection précoce, même en présence de titres élevés d'anticorps maternels.

Modes d'administration de VAXXITEK® HVT+IBD



Vaccination In Ovo



Vaccination à J1 par voie S.C.

Cette vaccination précoce en milieu protégé présente de nombreux avantages :

- L'absence de vaccination Gumboro par l'eau de boisson durant la période d'élevage en bâtiment, est à l'origine d'un gain de temps appréciable.
- La vaccination de grands nombres de sujets dans une même unité d'accoupage apporte une plus grande homogénéité de protection vaccinale.
- L'absence d'interférence entre vaccination et anticorps maternels participe également à l'homogénéisation de lots de poussins issus de parquets parentaux de statuts immunitaires parfois disparates.

3. Protection large spectre :

Le composant VP-2 du vaccin protège contre toutes les souches classiques, variantes et hypervirulentes du virus de la maladie de Gumboro, tandis que le HVT confère une protection croisée contre la maladie de Marek pour les poulets de chair classiques. Le vaccin protège contre les signes cliniques, mais aussi contre l'effet immunosuppresseur et donc contre les pertes économiques liées à ces maladies.

Des épreuves virulentes en laboratoire sur poulets conventionnels contre différents types de souches Gumboro ont donné les résultats suivants :

- Souches classiques : protection dès 7 jours post-vaccination.
- Souches variantes : protection dès 7 jours post-vaccination.
- Souches hypervirulentes : protection dès 14 jours post-vaccination.

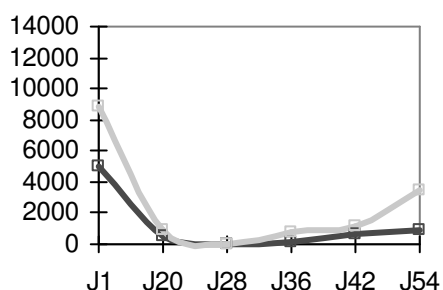
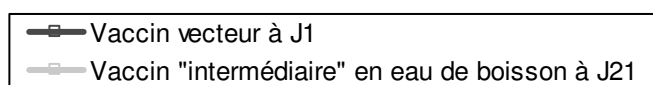
4. Traçabilité :

Suite à la vaccination, le mode de multiplication du virus HVT engendre une stimulation antigénique persistante contre la maladie de Gumboro et la maladie de Marek.

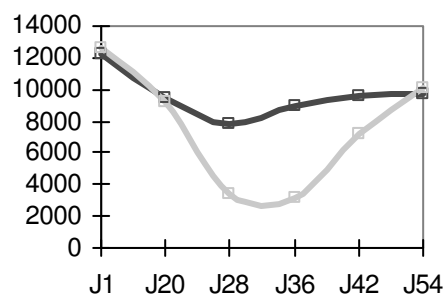
L'originalité de ce vaccin permet d'en tracer l'administration par la sérologie et par la PCR.

- **La sérologie :**

Les kits ELISA utilisés en routine pour le suivi des anticorps Gumboro ne détectent pas les anticorps anti-VP-2, les seuls à être générés par l'administration du vaccin. On a donc recours à un autre type de kit dont les caractéristiques permettent essentiellement la mise en évidence de ce type d'anticorps.



ELISA IBD classique



ELISA IBD "plus"

On constate sur ces courbes que les poulets qui ont reçu le vaccin à J1 présentent des taux d'anticorps anti-VP-2 (ELISA IBD « plus ») significativement plus élevés que les animaux vaccinés en eau de boisson à J21. Cette différence est particulièrement notoire entre J28 et J36. Il suffit donc de prélever le sérum de 20 sujets en cours de 5^{ème} semaine d'élevage pour démontrer la réalité de cette vaccination.

- **La PCR :**

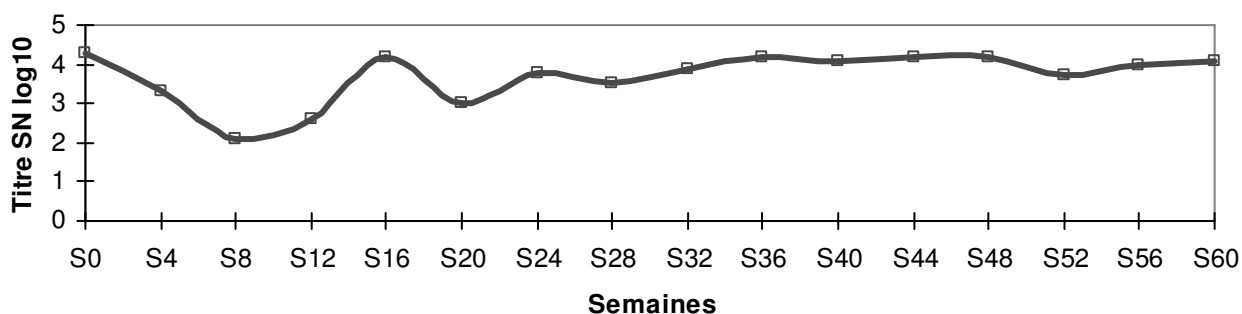
Une PCR spécifique du vaccin est également disponible pour tracer la vaccination. Elle se pratique sur la pulpe des follicules plumeux de sujets prélevés entre 3 et 4 semaines d'âge.

5. Protection longue durée

Un suivi sérologique longitudinal mené sur poule pondeuse a permis la détection d'anticorps anti-VP-2 jusqu'à 60 semaines d'âge.

Cette persistance de la production d'anticorps anti-VP-2 jusqu'à la fin de la période de production de ces poules pondeuses, illustre parfaitement le mode d'action du vaccin : les phases cycliques de multiplication du virus vaccinal HVT chez l'animal agissent simultanément comme des rappels de vaccination Marek et Gumboro ; en effet la protéine VP-2 « fabriquée » par l'animal vacciné interagit avec l'appareil immunitaire et génère ainsi la production d'anticorps spécifiques.

**Suivi VP-2 en séroneutralisation
Poules pondeuses vaccinées à J1**



6. Innocuité :

Plus un vaccin Gumboro est «hot », plus il lèse la bourse de Fabricius de l'animal cible. A l'inverse un vaccin de type « intermédiaire », donc plus atténué, provoquera moins de lésions de cet organe. L'avantage de ce nouveau vaccin consiste à n'administrer à l'animal que la partie immunogène du virus vaccinal. On s'affranchit donc des effets secondaires potentiellement néfastes qu'un vaccin classique est susceptible d'entraîner.

Ratio visuel et pondéral : « Rates / Bourses de Fabricius »



Vaccin intermédiaire en eau de boisson

Vaccin vecteur à J1

Sur des échantillons de rates et de bourses de Fabricius (ici à 44 jours d'âge) on constate aisément l'absence d'atrophie des bourses de Fabricius prélevées sur les poulets ayant reçu le vaccin vecteur.

Ces observations totalement inédites témoignent de l'apport des vaccins issus des nouvelles technologies en matière d'innocuité.

Conclusion

Les vaccins issus des nouvelles technologies comme le vaccin présenté ici représentent sans conteste une avancée fondamentale pour les productions animales en général et l'aviculture en particulier.

Ces vaccins permettent de ne présenter à l'appareil immunitaire de l'animal que le ou les éléments susceptibles d'interagir avec lui. On s'approche ainsi du vaccin « idéal », c'est-à-dire un organisme vivant capable de générer une protection de haut niveau, en l'absence totale d'effets secondaires parfois pénalisants.

La technologie de la vaccination *in ovo*

Traduction et présentation par
Dr Claire BIENER
D'après des publications de
Christopher J. Williams, MS, Ph.D.
EMBREX

La vaccination *in ovo* dans le monde

L'un des plus récents bouleversements dans les pratiques de prévention des couvoirs est l'utilisation de la vaccination *in ovo*. Les recherches sur la vaccination *in ovo* ont débuté aux Etats-Unis, dans les années 1980, avec un vaccin HVT contre la maladie de Marek. La commercialisation de cette technique dans les couvoirs a débuté en 1992, aux Etats-Unis, avec le système Inovoject® d'Embrex.

Aujourd'hui, la vaccination *in ovo* de poulets avec le système Inovoject® est utilisée et reconnue comme la voie d'administration de vaccin préférée dans plus de 30 pays, sur tous les continents : en Asie du sud-est, au Japon, en Australie, en Europe et en Amérique. Dans le monde, des vaccins sont administrés *in ovo* avec succès contre la maladie de Marek, de Gumboro, la variole aviaire et les Reovirus. Ce sont au total environ 16 milliards de poulets vaccinés chaque année par la voie *in ovo* avec le système Inovoject®. En France l'éventail des vaccins injectables *in ovo* s'élargit : aux vaccins contre la maladie de Marek s'ajoutent depuis peu deux nouveaux vaccins contre la maladie de Gumboro.

L'injection *in ovo*, la différence

Alors que l'industrie de la santé animale a développé un large éventail de moyens de prévention des maladies des volailles, leur administration n'est pas toujours homogène, sûre et efficace. De plus, les vaccinations peuvent nécessiter des rappels, ce qui induit des coûts supplémentaires.

Les avantages de la vaccination *in ovo* et du système Inovoject® ont été prouvés :

- **Une vaccination individuelle et collective à la fois** – Les injections sont réalisées par plateaux, avec un injecteur pour chaque œuf.
- **Une stimulation précoce du système immunitaire** – La vaccination *in ovo* permet un développement du système immunitaire plus précoce, et donc une protection des volailles dès la mise en place dans les élevages.
- **Une vaccination uniforme** – Le système Inovoject® permet de délivrer une dose précise et uniforme de vaccin à chaque œuf.
- **Une meilleure organisation de l'éclosion** – En éliminant la vaccination à l'éclosion, le délai entre sortie des poussins des éclosiers et leur expédition est réduit.
- **Moins de stress des poussins** – La vaccination dans l'œuf avant l'éclosion permet de réduire le stress des poussins associé à leur manipulation à l'éclosion.
- **Une meilleure hygiène de l'injection** – Les aiguilles sont désinfectées individuellement après chaque injection, ce qui diminue les risques de contamination.
- **Des coûts de main d'œuvre réduits** – Les injections sont effectuées avec un rendement de 30.000 à 60.000 œufs par heure, ce qui réduit le temps de travail et le nombre d'opérateurs nécessaires par rapport à la vaccination manuelle.
- **Adaptabilité** - Le système Inovoject® peut s'adapter à différents types de plateaux et s'intègre sur les lignes de transfert présentes dans le couvoir.

La technique et le procédé utilisés pour la vaccination *in ovo* sont cruciaux, et il existe des principes fondamentaux d'application de l'*in ovo* permettant de comprendre la physiologie de la réponse immunitaire, ainsi que la tolérance de l'embryon à cette technologie relativement invasive. Il est important de connaître les facteurs qui conditionnent le succès de la vaccination *in ovo* : âge de l'embryon à l'injection, site d'injection, hygiène du couvoir, contraintes sanitaires et physiques...

Le choix de la date d'injection *in ovo*

Le choix de la date d'injection *in ovo* dépend du stade de développement de l'embryon. Le choix correct de la date d'injection permettra d'optimiser non seulement l'éclosion mais aussi la qualité du poussin et son statut immunitaire. L'injection doit être tolérée par l'embryon, et se situer dans le bon compartiment embryonnaire, qui permettra au vaccin d'être efficace. Une injection trop précoce peut réduire l'éclosabilité et l'incidence des vaccinations manquées. Une injection trop tardive est problématique lors du transfert et augmente les pertes d'éclosion dues à la casse.

Développement embryonnaire et éclosabilité

En général, la meilleure période pour injecter *in ovo* est entre J 17 +12h et J 19 + 2h (avec J 0 le début de la mise en incubation). En dehors de cette fenêtre l'éclosabilité peut être affectée.

Réaliser un transfert à J 17 au lieu de J 18 peut réduire l'éclosabilité de 1 à 2% et cela avec ou sans injection pendant le transfert. Ces différences sont dues aux différences de conditions environnementales entre les incubateurs et les éclosoirs. Les caractéristiques de circulation d'air (liées à la position des œufs, la teneur en O₂, l'humidité et la température) sont plus favorables à l'embryon à J18 dans l'incubateur que dans l'éclosoir. Si l'injection est réalisée trop tôt (avant J 17,5), cela peut abîmer l'embryon ou les structures à l'intérieur de l'œuf (trop invasif), ou constituer une porte d'ouverture aux contaminations bactériennes.

Lorsque l'injection *in ovo* est tardive, les risques de mortalité embryonnaire sont liés à la casse d'œufs pendant le transfert. En effet, à J19 les embryons commencent à bêcher, la coquille est donc percée en plusieurs points, empêchant le fonctionnement correct du transfert par vide d'air. Les œufs peuvent alors être lâchés par les ventouses de transfert. Il est donc recommandé de ne transférer que lorsqu'il y a moins de 1-2% d'œufs bêchés. Le respect de la biosécurité est également en jeu avec des injections trop tardives: le bêchage dans l'incubateur augmente la pression microbienne et les possibilités de contamination croisée.

Développement embryonnaire et efficacité de la vaccination

Le système Inovoject® fait un trou au niveau de la partie large de l'œuf et l'injection est réalisée à une profondeur de 2,5 cm environ. Le lieu exact où est délivré le vaccin est déterminé par le stade de développement embryonnaire (âge physiologique).

En fin d'incubation il existe dans l'œuf cinq compartiments séparés : la chambre à air, l'allantoïde, la vésicule vitelline, l'amnios ou l'embryon. Seules les injections du vaccin Marek dans l'amnios et l'embryon permettront une protection efficace (Wakenell et al.), Avian Diseases, 2002, 46(2) :274-280). Des études sur le site d'injection ont montré que près de 100% des œufs vaccinés avec le système Inovoject® reçoivent le vaccin soit dans l'amnios soit dans l'embryon, sites préférentiels (Understanding *in ovo* vaccination, International hatchery practice, vol.20, n°4).

Le choix de la date de vaccination détermine le site d'injection. La plupart des œufs vaccinés avant 18 jours et 10-12 heures recevront l'injection dans le liquide amniotique, tandis que ceux vaccinés plus tard en reçoivent une plus grande proportion dans l'embryon. Plusieurs critères sont utilisés pour déterminer si le développement de l'embryon est optimal pour la vaccination *in ovo* : position de l'embryon (tête sous l'aile droite), degré d'absorption de la vésicule vitelline dans l'abdomen,

humidité autour de l'embryon, bêchage interne et externe. De telles informations doivent permettre d'optimiser les programmes de vaccinations *in ovo*.

Tous les facteurs qui influencent le stade de développement embryonnaire affecteront donc la fréquence des sites d'injection *in ovo* : souche, durée de stockage avant incubation, conditions d'incubations, âge des parentales. En pratique, cela signifie qu'il est nécessaire de comprendre la variété des facteurs qui affectent le développement de l'embryon au moment de l'injection pour injecter tous les embryons au bon moment, de façon homogène.

La technique d'injection : l'aiguille dans l'aiguille

Il est important de comprendre le procédé physique de pénétration du trocart dans la coquille puis de l'aiguille à travers la membrane chorio-allantoïque dans l'embryon ou l'amnios pour comprendre l'impact sur la qualité du poussin. Les caractéristiques du trocart et de l'aiguille : biseau, longueur et diamètre, différent. Le trocart doit percer la coquille de façon précise sans casser la coquille. La coquille elle-même représente un risque de contamination microbienne pendant l'injection. Le trocart ne pénètre pas dans la cavité embryonnaire, sous la membrane de la chambre à air, pour éviter la transmission de micro-organismes de la coquille à l'embryon. De plus, le trocart est désinfecté entre chaque injection.

L'injection par l'aiguille ne doit pas avoir d'effet négatif pour l'embryon. Le diamètre de l'aiguille est faible, 20 gauges, et le biseau adapté pour percer les membranes et injecter l'embryon. La taille et la forme de l'aiguille sont un compromis entre la nécessité d'une désinfection efficace entre chaque injection, et l'innocuité pour l'embryon. Le concept d' « aiguille dans l'aiguille » du système Inovoject® comprend une aiguille externe spécialement conçue pour percer la coquille et une aiguille à l'intérieur pour l'injection. L'utilisation de ces deux aiguilles permet donc de minimiser l'impact négatif sur la coquille et l'embryon, d'optimiser l'efficacité de la désinfection, et de cibler les zones critiques du trocart et de l'aiguille à désinfecter.

L'hygiène du couvoir : les contraintes sanitaires

Il est connu qu'une faible hygiène au couvoir compromet la qualité du poussin, quel que soit le mode de vaccination utilisée. Par l'injection *in ovo* les deux barrières protectrices, coquille et membrane de la chambre à air, sont rompues. Les risques de contamination microbienne sont donc réels. L'injection des œufs peut exacerber les conséquences d'une hygiène insuffisante du couvoir, et une analyse de risque est donc conduite avant l'introduire la technologie *in ovo* dans un couvoir, pour souligner les problèmes dans l'environnement du couvoir qui peuvent affecter la vaccination *in ovo*, et proposer des mesures correctives.

Les spores d'*Aspergillus* sont particulièrement recherchées car elles se développent facilement sur les œufs clairs ou les embryons morts précocement. Lorsque les spores d'*Aspergillus* sont présentes en grande quantité dans le couvoir, elles peuvent pénétrer par le trou fait dans la coquille pendant l'injection et se multiplier dans l'œuf, particulièrement dans les œufs clairs. Il est donc préférable avant l'injection de bien trier les œufs clairs, fêlés et contaminés dans lesquels des *Aspergillus*, *Pseudomonas* ou autres germes se sont multipliés afin de ne pas surcontaminer la machine et l'environnement.

Dans l'injection elle-même, le risque de contamination existe à 2 niveaux, le vaccin et le matériel d'injection. La préparation du vaccin doit être réalisée dans des conditions d'hygiène très strictes. En effet, par rapport à un poussin de 1 jour, l'embryon est plus fragile et moins immunocompétent. Toutes les opérations liées à l'Inovoject® réclament un degré d'hygiène supérieur à l'injection de poussins de 1 jour. Ainsi, la préparation du vaccin doit être effectuée dans une pièce spéciale, propre, isolée le plus possible de l'atmosphère contaminée des couvoirs (duvet et poussières de coquille en suspension). L'hygiène de l'opérateur est également primordiale.

La désinfection de l'équipement de vaccination *in ovo*

La vaccination *in ovo* doit être appuyée par des programmes stricts de nettoyage-désinfection au couvoir, mais l'hygiène de la machine est aussi cruciale. Le nettoyage et la désinfection de l'équipement après chaque utilisation sont impératifs, et le stockage doit minimiser les risques de contact avec du matériel organique et des micro-organismes. La machine est nettoyée et désinfectée avant et après chaque utilisation par des cycles de nettoyage et les aiguilles et trocars sont désinfectés entre chaque plateau d'œufs, à l'aide de désinfectants à base d'une solution chlorée tamponnée (tablettes spécialement conçues pour le système Inovoject®). Les tubes des systèmes de vaccination et de désinfection sont remplis d'alcool pour le stockage.

Conclusion

L'utilisation de la technologie *in ovo* ne se résume pas à délivrer des solutions à des embryons. Le procédé doit être stérile et contrôlé ; l'injection doit être effectuée au bon moment et au bon endroit dans l'œuf. L'objectif d'Embrex Inovoject systems® est de rester leader dans la recherche, le développement et l'application de la technologie *in ovo*, afin de permettre à ses clients d'optimiser son utilisation.



De l'élevage



à la transformation



des volailles et des œufs



Avec au sommaire

- De nombreux reportages élevages, des dossiers, prévention et hygiène
- L'actualité des filières dans toutes les régions, des gros plans techniques sur les différentes productions.
- L'expérience des autres pays avicoles...



Votre supplément (à sa parution)

- Le Guide de l'éleveur de pondeuses