

## COMPARAISON DE DIFFERENTS PROTOCOLES DE VACCINATION AVEC UN VACCIN DERZSY A VIRUS VIVANT ATTENUÉ CHEZ LE CANARD MULARD VIS-A-VIS DE SOUCHES TERRAIN DE VIRUS DE LA MALADIE DE DERZSY

Léni Corrand <sup>1</sup>, Tanguy Le Quang <sup>1</sup>, Jean-Luc Pingret <sup>2</sup>,  
Paul Morillon <sup>3</sup> et Jean-Luc Guérin <sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 1225 IHAP INRA-ENVT, 23 Chemin des Capelles, 31076 TOULOUSE, FRANCE

<sup>2</sup>Laboratoire Scanelis, 9 allée Charles Cros – 31771 COLOMIERS, FRANCE

<sup>3</sup>Merial, BP 7, ST HERBLON, 44153 ANCENIS Cedex, FRANCE

[jl.guerin@envt.fr](mailto:jl.guerin@envt.fr)

### RESUME

Cette étude avait pour objectif de comparer différents protocoles de vaccination Derzsy à virus vivant atténué chez le canard mulard, vis-à-vis de souches terrain de GPV (*Goose Parvovirus*). Après avoir récolté des isolats viraux issus d'épisodes cliniques sévères de syndromes nanisme-bec court en élevages, des cultures virales cellulaires et embryonnaires ont été réalisées afin de procéder aux infections et vaccinations expérimentales. Une première série d'infections de mulards âgés de 1 ou 10 jours d'âge a permis de démontrer un très faible impact clinique et zootechnique de l'infection en conditions expérimentales strictes, malgré une réplication virale et une excrétion fécale du virus. Il en fut donc déduit que les conditions zootechniques en élevage (challenges immunitaires et métaboliques) sont nécessaires à l'expression clinique de la maladie de Derzsy. Un second essai a comparé la protection virologique (charge virale splénique détectée par PCR quantitative) conférée par différents protocoles utilisant un vaccin commercial atténué de GPV). Ainsi un protocole de vaccination unique à 1 jour d'âge a été comparé à une vaccination simple à 10 jours et à une vaccination double à 1 et 18 jours chez des canetons commerciaux expérimentalement infectés à 5 jours d'âge. Malgré l'absence de différence clinique et zootechnique constatée, les comparaisons des charges virales spléniques ont permis de démontrer que la double vaccination réduit considérablement la réplication virale, alors que la simple vaccination ne permet de retarder que de quelques jours la multiplication de ce dernier. Ces résultats suggèrent qu'en conditions d'élevage l'impact clinique de l'infection par le GPV pourrait être contrôlé par ce double protocole vaccinal.

### ABSTRACT

**Comparison of different vaccination protocols with a live attenuated Derzsy's vaccine in mule ducks against Derzsy's disease field isolates.**

The aim of this study was to compare different live attenuated Derzsy's disease vaccination programs in commercial mule ducks against GPV (*Goose Parvovirus*) field isolates. After collecting viral isolates from severe outbreaks of short beak and dwarfism syndrome on farms, cellular and embryo-propagated viral cultures were carried out in order to proceed to experimental infection and vaccination attempts. A first infectious experiment in commercial mule ducklings, aged 1 or 10 days, showed only a negligible clinical and zootechnical impact under strict experimental conditions, despite a viral replication and a faecal excretion. It was concluded that brooding conditions (metabolic and immunologic challenges) are necessary for the clinical expression of Derzsy's disease. A second trial compared the virological protection (splenic viral copies quantified by real-time PCR) provided by different vaccine protocols with a commercial live attenuated GPV strain. Thus a single 1-day-old vaccination was compared to a single 10-day-old vaccination and a double 1 and 18-day-old vaccination, in commercial ducklings experimentally infected at 5 days of age. Despite showing no difference in clinical and zootechnical results, comparison of viral loads from spleen samples showed that the double vaccination allows a significant reduction of viral replication, while single vaccinations only delay the field virus systemic replication. These results suggest that, under commercial field conditions, the clinical manifestation of Derzsy's disease might be controlled by a double vaccination protocol.

## INTRODUCTION

L'infection par le Parvovirus de l'oie (GPV), ou maladie de Derzsy, compte depuis plusieurs décennies parmi les dominantes pathologiques du canard mulard en élevage. Sous sa forme aigüe elle se manifeste chez cette espèce sous la forme très caractéristique du syndrome nanisme-bec-court (SNBC) durant lequel les animaux présentent bec court, procidence de la langue, retard de croissance ou troubles de l'emplumement (Lemière, 2001). Alors que la vaccination, largement répandue au couvoir et/ou en élevage, permet de contrôler la survenue d'épisodes cliniques de SNBC, peu de données objectives sont disponibles à ce jour pour comparer l'efficacité clinique et virologique des différents protocoles appliqués en pratique et la question de leur intérêt relatif reste donc posée à ce jour. Pour répondre à cette question, deux essais de laboratoire ont été menés successivement. Le premier a eu pour objectif d'éprouver en conditions expérimentales contrôlées des canetons mulards commerciaux, avec un isolat de GPV isolé lors d'épisodes cliniques de SNBC en élevage, afin d'évaluer la pathogénicité stricte du GPV. Le second essai a permis de comparer l'efficacité clinique, zootechnique, pathologique et virologique de trois protocoles vaccinaux (souche atténuée Hoekstra) chez des canards mulards infectés expérimentalement par un isolat terrain de virus GPV.

## EVALUATION DE LA PATHOGENICITE DE SOUCHES TERRAIN DE VIRUS GPV : ESSAI D'EPREUVE VIRULENTE

### 1. Matériels et méthodes

Deux échantillons biologiques (rate) isolats récoltés lors d'épisodes cliniques de SNBC en élevages commerciaux de mulards ont été utilisés afin de sélectionner parmi eux les souches virales GPV d'épreuve virulente pour les futurs essais d'infections expérimentales. Des propagations virales sur œufs embryonnés EOPS de Barbarie (13 jours d'incubation) et sur cultures cellulaires (fibroblastes embryonnaires canards de Barbarie) ont été réalisées selon les méthodes classiquement décrites (Gough *et al.*, 2008), avant titrage par PCR quantitative du virus GPV dans les suspensions infectieuses récoltées (Pingret *et al.*, 2005). Une suspension infectieuse titrant à  $1.43 \times 10^{10}$  copies virales/ml a été utilisée pour la première série d'infections expérimentales. Cinquante-cinq canetons mulards mâles commerciaux de un jour, non vaccinés contre la maladie de Derzsy mais issus de canes reproductrices vaccinées (données non publiées), ont été individuellement identifiés puis séparés aléatoirement en 5 groupes de 11 canetons. Chaque groupe était élevé en conditions contrôlées. Les canetons constituant les quatre premiers groupes ont été inoculés par 0.5 ml de la même suspension infectieuse, respectivement à 1 jour par voie sous-

cutanée (Groupe 1), à 1 jour par voie orale (Groupe 2), à 10 jours par voie sous-cutanée (Groupe 3) ou à 10 jours par voie orale (Groupe 4). Le dernier groupe (Groupe 5) a servi de groupe contrôle non infecté. Tous les animaux ont été examinés quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai à 8 semaines d'âge afin de détecter d'éventuels signes cliniques évocateurs de la maladie de Derzsy. Les poids de tous les animaux ont été mesurés de façon hebdomadaire. La longueur et la largeur du bec de chaque animal ont également été mesurés et le rapport longueur/largeur a été calculé pour s'affranchir des variations interindividuelles, afin d'objectiver un éventuel effet de l'infection sur le développement du bec. Des écouillons cloacaux destinés à la recherche d'ADN spécifique de virus GPV par PCR quantitative ont été prélevés sur 5 sujets dans chacun des 5 groupes à 3, 8 et 30 jours post-infection. A 8 semaines d'âge tous les animaux ont été sacrifiés et autopsiés.

### 2. Résultats et discussion

Parmi les 44 sujets infectés lors de cet essai challenge, un seul animal, infecté par voie orale à 1 jour d'âge (Groupe 2) a présenté des signes cliniques caractéristiques de la maladie de Derzsy avec un bec court et un retard de croissance significatif. Les autres sujets sont restés homogènes en poids tout au long de l'essai. Ils n'ont montré aucun signe clinique suggestif de la maladie de Derzsy et aucune différence significative du rapport longueur de bec/largeur de bec n'a été mise en évidence. Des troubles de l'emplumement, provoqués par du piquage, ont été observés chez les animaux des quatre lots infectés et chez les témoins entre 3 et 6 semaines d'âge. Ces troubles se sont spontanément résolus en fin d'essai. A l'issue de l'essai aucun animal ne présentait de lésion macroscopique lors de l'examen post-mortem. La recherche de virus GPV par PCR en temps réel à 7 jours post infection sur pools de 5 écouillons cloacaux a démontré une excrétion virale chez tous les groupes infectés, mais à une charge inférieure au seuil de quantification inhérent au test diagnostique. A 30 jours post-infection, le virus GPV n'a été détecté que chez les sujets infectés par voie orale à 1 jour, et chez les infectés par voie sous-cutanée à 10 jours d'âge, encore une fois à une charge inférieure au seuil de quantification. Les animaux du groupe témoin sont restés négatifs pour le même test. La recherche de virus à partir d'écouvillon cloacal prélevé chez le seul individu montrant des signes cliniques (Groupe 2) à 30 jours post-infection a abouti à un résultat positif avec une charge en GPV inférieure au seuil de quantification. Cette première étude a donc permis de démontrer un très faible impact clinique et zootechnique de l'infection par le GPV en conditions expérimentales strictes chez le caneton mulard en très jeune âge, malgré une répllication virale et une excrétion fécale prouvées.

## COMPARAISON DE L'EFFICACITE DE 3 PROTOCOLES DE VACCINATION DERZSY A VIRUS VIVANT ATTENUÉ

### 1. Matériels et méthodes

Face au manque de manifestations cliniques et pathologiques des animaux infectés lors du précédent essai, une seconde suspension infectieuse titrant à  $2.14 \times 10^6$  copies virales/ml a cette fois-ci été utilisée pour la comparaison de protocoles vaccinaux. Cent-cinquante canetons mulards mâles conventionnels semblables à ceux utilisés lors du précédent essai (même parquet de reproducteurs, 9 semaines de ponte plus tard) ont été séparés aléatoirement à un jour d'âge en 5 groupes de 30 oiseaux et élevés en conditions contrôlées. Trois différents protocoles vaccinaux (J1, J10 ou J1 + J18) ont été essayés lors de cet essai (Tableau 1) et comparés sur la base de critères cliniques, pathologiques, zootechniques et virologiques. L'infection expérimentale était réalisée par gavage oral à 5 jours d'âge. La vaccination a employé une souche commerciale GPV vivante atténuée (souche Hoekstra, Palmivax®, Merial, France) utilisée selon les recommandations du fabricant (0.5ml par animal, injection sous-cutanée). Tous les animaux ont été examinés quotidiennement jusqu'à la fin de l'essai à 64 jours d'âge afin de détecter d'éventuels signes cliniques évocateurs de la maladie de Derzsy. Les poids de tous les animaux ont été mesurés de façon hebdomadaire. Aussi, deux animaux par groupe étaient aléatoirement sélectionnés chaque semaine, sacrifiés puis autopsiés en vue d'examen pathologique et de prélèvements virologiques (rates). Des analyses PCR quantitatives et typage GPV (souche sauvage ou vaccinale) ont été réalisées à partir d'échantillons spléniques récoltés chaque semaine (tableau 1) selon la méthode décrite par Pingret *et al.* (2005).

### 2. Résultats et discussion

Aucun des canetons inoculés lors de cet essai n'a présenté de signes cliniques évocateurs du SNBC et aucun retard de croissance significatif des infectés par rapport aux vaccinés et aux témoins n'a été mis en évidence. Les autopsies réalisées sur les animaux prélevés tout au long de l'essai n'ont révélé aucune lésion macroscopique interne. Les charges de virus GPV infectieux (sauvage) ou vaccinal (Hoekstra) mises en évidence dans les rates (testées individuellement ou en pools) des sujets sont résumées en annexe (Tableau 2). La cinétique de réplication virale démontrée dans la rate des sujets vaccinés à 1 jour puis infectés n'a permis de retarder que de quelques jours la détection de charges virales spléniques par rapport à des sujets non vaccinés et infectés. La vaccination unique à J10 a retardé de près d'un mois la détection de charges spléniques significatives. La double vaccination (J1 + J18) a permis de retarder au-delà de 64 jours d'âge l'apparition de virus sauvage dans la rate d'animaux

infectés expérimentalement. Les charges spléniques détectées sur les sujets ayant subi ce double protocole vaccinal, et sacrifiés à 64 jours, sont restées inférieures au seuil de quantification inhérent au test diagnostique.

### CONCLUSION ET DISCUSSION

Cette étude menée entre Septembre 2010 et Juin 2011 a été conduite en réponse à une demande de la filière française de palmipèdes gras, confrontée depuis plusieurs années à des épisodes récurrents de SNBC aux conséquences économiques lourdes en élevages commerciaux de mulards. L'absence de données scientifiques disponibles et les controverses quant à l'efficacité des différents protocoles vaccinaux utilisés en élevage ont justifié la mise en œuvre d'une étude expérimentale visant à évaluer de manière objective l'efficacité de la vaccination et des différents protocoles utilisés en élevage. L'étude avait ainsi pour objectif d'évaluer et de comparer l'efficacité zootechnique, clinique, pathologique et virologique de différents protocoles de vaccination Derzsy à virus vivant atténué vis-à-vis de souches sauvages de virus GPV.

Un travail préliminaire de laboratoire a consisté en la sélection, propagation et titrage des virus candidats pour les essais d'épreuve virulente. La difficulté et les aléas techniques et biologiques liés à la culture virale, ajoutés aux limites logistiques et financières de cette étude nous ont restreint à l'utilisation de 2 souches d'épreuve. Ces mêmes raisons nous ont poussé à quantifier dans ce travail nos souches d'épreuves en copies virales / ml (PCR quantitative), et non pas en dose infectieuse pour le canard ou pour la culture cellulaire ou l'œuf embryonné de canard selon la rigueur voulue.

La première partie de cette étude a démontré la difficulté de reproduire expérimentalement le SNBC chez des canetons mulards commerciaux non vaccinés, ceci même au moyen de souches virales isolées lors d'épisodes clinique en élevages. Malgré une réplication virale et une excrétion fécale prouvées, il semble donc que les conditions zootechniques en élevage (challenges immunitaires et métaboliques) soient nécessaires à l'expression clinique de la maladie de Derzsy chez le canard mulard commercial.

Suite aux résultats pathologiques et virologiques limités de la première partie expérimentale, un choix a volontairement été pris d'utiliser le second candidat viral pour le second essai sur canards, malgré une dose environ  $10^4$  copies virales / ml inférieure à la dose de la première suspension infectieuse.

Durant la seconde partie de l'étude, la protection vaccinale conférée par les différents protocoles testés a été exclusivement évaluée par des résultats

virologiques, c'est à dire par la mise en évidence par PCR quantitative des souches virales sauvages et vaccinales dans la rate des animaux éprouvés (virémie). Ainsi une unique vaccination à 1 jour d'âge ne semble pas retarder l'apparition systémique virale (et donc la protection virologique supplémentaire) par rapport à des sujets non vaccinés. La vaccination à 10 jours d'âge permet de retarder de près d'un mois la virémie et la double vaccination à 1 et 18 jours d'âge semble retarder considérablement (au delà de 64 jours) la réplication virale systémique chez des sujets testés.

En supposant que l'expression clinique du SNBC en élevage de mulards est une résultante de la charge virale infectieuse initiale, de la cinétique de réplication virale systémique, de l'âge des sujets et des conditions zootechniques concomitantes, il peut être considéré qu'un protocole vaccinal retardant au maximum la virémie est judicieux. La quasi-similaire cinétique de multiplication splénique virale entre des sujets non vaccinés et des sujets vaccinés seulement à 1 jour d'âge peut être due à la neutralisation virale (virus infectieux ou vaccinal) induite par les anticorps d'origine maternelle (AOM). En effet, la présence de ces derniers confère aux jeunes canetons un certain niveau temporaire d'immunité contre une infection sauvage (Palya *et al.*, 2009). Aussi, malgré l'absence

de suivi sérologique des sujets durant cette étude, il est possible qu'une partie du virus vaccinal soit aussi neutralisée lors d'une vaccination à 1 jour. A l'inverse, la vaccination unique à 10 jours ou idéalement la double vaccination à 1 et 18 jours d'âge semblent conférer les meilleures protections car retardant l'apparition de charges virales spléniques significative. L'interférence des AOM avec ces protocoles vaccinaux n'a pas été démontrée et aussi, il serait intéressant de mettre à l'épreuve un protocole comportant une injection vaccinale unique à 18 jours sur des canetons issus de mères vaccinées.

Les auteurs reconnaissent que des protocoles vaccinaux par injection individuelle sont délicats à mettre en œuvre en élevage pour des raisons logistiques et financières. Ainsi il paraîtrait peu judicieux de conseiller d'abandonner la vaccination GPV au couvoir. Les conclusions de cette étude tendent à promouvoir un rappel individuel en élevage.

Enfin, des investigations complémentaires incluant des essais vaccinaux en élevages commerciaux menés jusqu'à 12 semaines d'âge (transfert en salle de gavage) permettraient de préciser l'efficacité de ces protocoles et d'exclure une réplication virale massive et tardive de virus GPV.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gough, R. E., 2008. Parvovirus of waterfowl. Dans : Dufour-Zavala L. *et al.* A Laboratory manual for isolation, identification, and characterization of avian pathogens. 5th Edition, 2008. AAAP. Athens, USA : 191-194.
- Lemière, S., 2001. 6<sup>ème</sup> Journée Technique de la Sepalm, Yvrac (France), 08/06/01 : 29-34.
- Palya, V., Zolnai, A., Benyeda, Z., Kovacs, E., Kardi, V., Mato, T., 2009. Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus. *Avian Pathology*. 38(2) : 175-180.
- Pingret, J.L., Zadjian, C., Lemière, S., Boucraut-Baralon, C., 2005. 6<sup>èmes</sup> Journées de la recherche avicole, Saint-Malo (France), 30-31/03/05.

**Tableau 1.** Comparaison de l'efficacité de 3 protocoles de vaccination Derzsy à virus vivant atténué : protocole expérimental

Groupe (30 sujets par groupe)	Age d'infection GPV (jours)*	Age de vaccination (jours)**	Age (jour) de pesée et/ou euthanasie & prélèvement (2 sujets par groupe par jour)***	Fin de l'étude (jours)
1	-	-	10, 15, 20, 26, 33, 40, 47, 57	64 (12 sujets restants par groupe)
2	5	-		
3	5	1		
4	5	10		
5	5	1 + 18		

\* 0.5 ml/sujet ( $2.14 \times 10^6$  copies virales GPV/ml), voie orale

\*\* vaccin 0.5 ml/sujet, voie sous-cutanée

\*\*\* Tous les sujets sont pesés, 2 sujets sont euthanasiés puis autopsiés pour prélèvement et PCR GPV sur échantillons spléniques

**Tableau 2.** Comparaison de l'efficacité de 3 protocoles de vaccination Derzsy à virus vivant atténué : charges et souches virales GPV sur échantillons spléniques.

Groupe	Age (jours)								
	10	15	20	26	33	40	47	57	64
1 (témoins)	Négatif*					Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2 (non vaccinés)	Négatif	Négatif	Sauvage <Q	Sauvage <Q	Sauvage <Q	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable
3 (vaccinés J1)	Hoekstra quantifiable	Hoekstra <Q	Négatif	1x Négatif 1x Sauvage <Q	Sauvage <Q	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable
4 (vaccinés J10)	Négatif	Hoekstra quantifiable	1x Hoekstra <Q 1x Sauvage <Q	Négatif	Négatif	Négatif	1x Hoekstra <Q 1x Sauvage <Q	Sauvage quantifiable	Sauvage quantifiable
5 (vaccinés J1+J18)	Négatif	Négatif	Hoekstra <Q	1x Hoekstra <Q 1x Sauvage <Q	Hoekstra <Q	Hoekstra <Q	Hoekstra <Q	Hoekstra <Q	1x Hoekstra <Q 1x Sauvage <Q

La souche GPV « Sauvage » correspond à l'isolat d'épreuve et la souche GPV « Hoekstra » correspond à la souche vaccinale utilisée. Le symbole « <Q » indique une quantité de génome virale inférieure au seuil de quantification inhérent à la sensibilité du test PCR en temps réel.

\* 2 échantillons / âge / groupe : test en pool ou individuel en cas de positivité du pool