

**DIAGNOSTIC DES MYCOPLASMOSES AVIAIRES CHEZ LA POULE PONDEUSE
PAR LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION RAPIDE SUR LAME :
ATTENTION AUX FAUX NEGATIFS !**

**Gautier-Bouchardon Anne V., Balan Odile, Ferré Séverine, Cineux Maelan, Kempf
Isabelle**

*ANSES - Laboratoire de Ploufragan-Plouzané et Université Bretagne-Loire, Unité
Mycoplasmologie-Bactériologie, 22440 PLOUFRAGAN, France
anne.bouchardon@anses.fr*

RÉSUMÉ

Les mycoplasmoses aviaires dues à *Mycoplasma gallisepticum* (MG) ou *Mycoplasma synoviae* (MS) sont à l'origine de pertes économiques importantes dans les élevages de poules. L'agglutination rapide sur lame (ARL) est couramment utilisée pour détecter ces infections dans les élevages. Une étude réalisée dans un élevage de poules pondeuses infecté par MS a cependant mis en évidence une différence significative entre le nombre de poules positives vis-à-vis de MS par culture ou PCR (80 à 100 %) et par la technique ARL (0 à 7 %). Des prises de sang ont été réalisées dans d'autres élevages de poules afin de comparer différentes techniques sérologiques : l'ELISA, la technique ARL classique utilisée par les laboratoires d'analyse (dilution au 1/5 et décomplémentation des seuls sérums qui s'avèrent positifs lorsque non dilués), et une technique ARL modifiée (dilution au 1/5 et décomplémentation systématique de tous les sérums). La comparaison des résultats obtenus avec ces trois techniques a mis en évidence des différences très significatives entre la technique ARL classique et la technique ARL modifiée ou l'ELISA : alors que 67 à 100 % des poules étaient positives avec ces deux dernières techniques, de très fortes variations ont été observées avec la technique ARL classique, avec 3 à 97% de poules positives. Ces différences ont également été observées dans plusieurs lots de poules pondeuses infectées par MG, avec 20 à 37 % de poules positives avec la technique ARL classique, et 77 à 100 % de poules positives avec la technique ARL modifiée ou l'ELISA. Les différences observées entre les techniques ARL classique et modifiée suggèrent un effet « prozone », caractérisé par un excès d'anticorps, qui empêche l'observation d'une réaction d'agglutination normale : la réaction d'agglutination peut se produire après dilution du sérum. Ces différents travaux montrent l'importance des techniques de diagnostic utilisées pour dépister les infections par MG et MS chez les poules pondeuses, l'utilisation de la technique ARL classique pouvant conduire à une sous-estimation du pourcentage de poules infectées, voire à la non détection d'un lot infecté.

ABSTRACT

Diagnostic of avian mycoplasmoses in laying hens by the rapid serum agglutination technique: beware of false negatives!

Avian mycoplasmoses due to *Mycoplasma gallisepticum* (MG) or *Mycoplasma synoviae* (MS) cause significant economic losses in chicken farms. Rapid slide agglutination (RSA) is a commonly used technique to detect these infections in farms. A study carried out in a laying hen farm infected with MS showed however a significant difference between the number of hens positive to MS by culture or PCR (80 to 100%, from tracheal swabs) and RSA (0 to 7%). Blood samples were taken from several other laying hen farms in order to compare different serological techniques for detection of antibodies against MS: ELISA, the standard RSA technique used by laboratories for analysis (1/5 dilution and decomplexation only of the undiluted positive sera), and a modified RSA technique (systematic 1/5 dilution and decomplexation of all the sera). Comparison of the results obtained with these three techniques revealed very significant differences between the conventional RSA technique and the modified RSA technique or the ELISA: while 67 to 100% of the chickens were positive with the latter two techniques, strong variations were observed with the conventional RSA technique, with 3 to 97% of positive chickens. These differences were also observed in several batches of laying hens infected with MG, 20-37% positive chickens with conventional RSA, and 77-100% positive chickens with modified RSA or ELISA. The differences observed between conventional and modified RSA techniques suggest a "prozone" effect, characterized by an excess of antibodies, which prevents the observation of a normal agglutination reaction: the agglutination reaction can occur after dilution of serum. These different studies show the importance of the diagnostic techniques used to detect MG and MS infections in laying hens, as the use of the conventional RSA technique may lead to an underestimation of the percentage of infected chickens, or even to the non-detection of an infected batch.

INTRODUCTION

Les mycoplasmoses aviaires sont à l'origine de lourdes pertes économiques dues essentiellement à des retards de croissance, à l'augmentation des indices de consommation, à des saisies à l'abattoir et à des baisses de production d'œufs (Gautier-Bouchardon et Kempf, 2008).

Mycoplasma gallisepticum est responsable de la maladie respiratoire chronique chez la poule et de la sinusite infectieuse chez la dinde. La présence d'autres agents pathogènes (virus ou bactéries) peut aggraver la maladie et entraîner des mortalités (Raviv et Ley, 2013). C'est une maladie réglementée.

M. synoviae est à l'origine d'infections subcliniques de l'appareil respiratoire (diminution des performances zootechniques), de la synovite infectieuse (arthrites, boiteries) et du syndrome des œufs à extrémité de verre (Fergusson-Noel et Noormohammadi, 2013 ; Gautier-Bouchardon, 2012). Son pouvoir pathogène peut être exacerbé lors d'association à des virus ou des bactéries.

Le contrôle des mycoplasmoses aviaires repose essentiellement sur l'éradication dans les troupeaux et sur une prophylaxie sanitaire exigeante. Les programmes de contrôle des mycoplasmoses à *M. gallisepticum* en Europe sont basés sur le maintien des troupeaux de sélection et de reproduction indemnes (directive 2009/158/EC et décision 2011/214/EU). Les contrôles sérologiques (ARL ou ELISA) et bactériologiques (culture ou PCR) sont réalisés lors de la mise en place des troupeaux puis régulièrement afin de s'assurer de l'absence de contamination (Kempf, 2006). Pour les troupeaux de production, les moyens de contrôle utilisés visent essentiellement à limiter les conséquences économiques de la mycoplasmosose (traitements, vaccination, amélioration de l'hygiène).

Le dépistage sérologique des mycoplasmoses aviaires consiste à mettre en évidence des anticorps d'origine infectieuse, maternelle ou vaccinale dans le sérum ou le vitellus. Les principales techniques utilisées sont l'agglutination rapide sur lame (ARL) et les tests immuno-enzymatiques (ELISA) (Gautier-Bouchardon et Kempf, 2008). L'ARL est une technique sérologique simple et peu coûteuse, très employée en France. Elle permet de détecter les IgM (premières immunoglobulines produites suite à l'infection). Des réactions non spécifiques peuvent parfois se produire. Les tests ELISA permettent de détecter les IgY, sont spécifiques, mais leur coût est plus élevé que l'ARL. Ils sont souvent utilisés pour confirmer des résultats sérologiques positifs obtenus par la technique ARL.

L'objectif principal de ce travail était de comparer les différentes techniques (bactériologiques et sérologiques) de dépistage des mycoplasmoses aviaires chez l'espèce poule. La mise en évidence d'une faible détection de poules positives vis-à-vis de *M. synoviae* par la technique ARL classique nous a

conduits à mener des études comparatives plus poussées dans différents élevages afin de mieux caractériser ce phénomène.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Prélèvements dans les élevages

Différents prélèvements ont été réalisés dans des élevages de poules pondeuses présentant ou non des signes d'infection par *M. synoviae* (syndrome des œufs à extrémité de verre et/ou infection subclinique des voies respiratoires) ou par *M. gallisepticum* (problèmes respiratoires) : écouvillonnages trachéaux pour effectuer des isolements bactériologiques ou des PCR, prises de sang au niveau de la veine alaire pour la recherche d'anticorps anti-*M. synoviae* et/ou anti *M. gallisepticum* dans les sérums. Les prélèvements ont été réalisés sur au minimum 20 poules prises au hasard dans les différents élevages visités.

1.2. Traitement des prélèvements au laboratoire

Les écouvillonnages trachéaux ont été placés dans 2 mL de milieu FM4 (Frey *et al.*, 1968) supplémenté avec des antibiotiques (pour limiter la croissance de contaminants) et vortexés. Ces suspensions initiales ont ensuite été utilisées pour effectuer en parallèle des mises en culture (4 dilutions de raison 10 en milieu de culture FM4) et des tests PCR spécifiques de *M. synoviae* ou *M. gallisepticum* (Lauerman *et al.*, 1993 ; Kempf *et al.*, 1993) après une étape de lyse (Kellog et Kwok, 1990). La croissance des mycoplasmes en milieu de culture a été détectée par virage du milieu de culture (dû à leur activité métabolique). La présence de *M. synoviae* et/ou *M. gallisepticum* dans les cultures virées a été confirmée ou infirmée par mise en culture sur milieu FM4 gélosé et par PCR.

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

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

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

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Une première étude de comparaison de différentes méthodes de diagnostic a été réalisée dans quatre bâtiments d'un élevage de poules pondeuses d'œufs de consommation atteint du syndrome des œufs à extrémité de verre. *M. synoviae* a pu être isolé d'écouvillonnages trachéaux (70 à 90 % des prélèvements positifs par PCR et culture) (Tableau 1). Les résultats des analyses sérologiques effectuées par la technique d'agglutination rapide sur lame (ARL classique) ont mis en évidence une réponse sérologique faible (de 0 à 26,7 % des poules positives) malgré la forte proportion de poules infectées au niveau de la trachée et l'apparition du syndrome des œufs à extrémité de verre plusieurs semaines avant les prélèvements.

Tableau 1 : comparaison de l'ARL classique avec la PCR et la culture pour détecter une infection à *M. synoviae* au sein de quatre bâtiments d'un élevage atteint du syndrome des œufs à extrémité de verre.

	ARL classique	PCR	Culture
P1 ^a	8/30 ^b (26,7) ^c	22/30 (73,3)	26/30 (86,7)
P2	4/30 (13,3)	25/30 (83,3)	27/30 (90)
P3	3/30 (10)	22/30 (73,3)	21/30 (70)
P4	0/30 (0)	27/30 (90)	26/30 (86,7)

^a : bâtiments P1 à P4 ; ^b : nombre de poules positives sur nombre total de poules ; ^c : pourcentage de poules positives.

Afin de confirmer ces premières observations, des prélèvements (écouvillonnages trachéaux et prises de sang) ont été effectués dans deux nouveaux élevages de poules pondeuses : un élevage positif pour *M. synoviae* et non touché par le syndrome des œufs à extrémité de verre, et un élevage positif pour *M. synoviae* et touché par le syndrome dans un de ses deux poulaillers. *M. synoviae* a été isolé d'écouvillonnages trachéaux dans les deux élevages (dans les trois poulaillers), avec plus de 88 % des prélèvements positifs (Tableau 2). La comparaison des résultats obtenus sur les différents prélèvements a mis en évidence des différences très significatives entre le nombre de poules positives par culture/PCR à partir des écouvillonnages trachéaux et le nombre de poules positives par la technique ARL classique, confirmant les résultats obtenus au cours de la première étude. La comparaison des résultats obtenus avec deux techniques sérologiques employées pour détecter les anticorps anti-*M. synoviae* a également mis en évidence une différence très significative entre l'ARL classique et l'ELISA. Peu de poules ont en

effet été détectées positives avec la technique ARL classique (de 3,3 à 13,3 % en fonction des bâtiments), alors que la quasi-totalité des poules étaient positives avec la technique ELISA (de 96,7 à 100 %). En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le lot atteint par le syndrome des œufs à extrémité de verre et les deux autres lots ne présentant pas d'anomalies de la coquille. Ceci suggère que les différences observées entre les deux tests sérologiques ne sont pas liés à la présence de ce syndrome au sein des élevages (qui pourrait être dû à une infection par des souches variantes de *M. synoviae*).

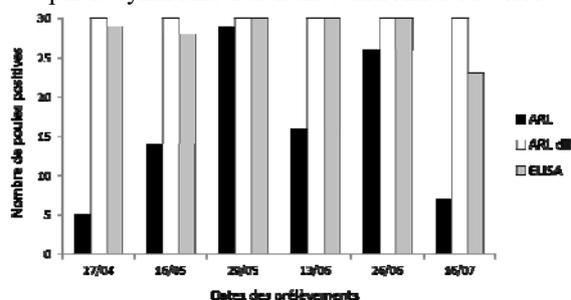
Tableau 2 : comparaison de l'ARL classique et de l'ELISA avec la PCR et la culture pour détecter une infection à *M. synoviae* dans deux élevages.

	Elevage A	Elevage B	
	(EAA-) ^a	(EAA-)	(EAA+)
PCR	49/60 ^b (81,7) ^c	28/30 (93,3)	29/30 (96,7)
Culture	45/60 (75)	18/30 (60)	19/30 (63,3)
PCR + Culture	53/60 (88,3)	30/30 (100)	30/30 (100)
ARL	8/60 (13,3)	2/30 (6,7)	1/30 (3,3)
ELISA	60/60 (100)	29/29 (100)	29/30 (96,7)

^a : EAA+, avec syndrome des œufs à extrémité de verre, EAA-, sans syndrome ; ^b : nombre de poules positives sur nombre total de poules ; ^c : pourcentage de poules positives.

Afin de vérifier si ces différences observées entre les techniques sérologiques n'apparaissent que ponctuellement ou pouvaient être observées sur plusieurs semaines, un suivi sérologique de différents lots de poules pondeuses (deux lots de 39 semaines et deux lots de 50 semaines) au sein d'un troupeau atteint du syndrome des œufs à extrémité de verre a été réalisé sur plusieurs semaines. Des prises de sang ont été réalisées environ toutes les deux semaines pendant 2,5 mois.

Figure 1 : comparaison de trois techniques de détection des anticorps anti-*M. synoviae* au cours d'un suivi sérologique d'un lot de poules pondeuses atteint par le syndrome des œufs à extrémité de verre

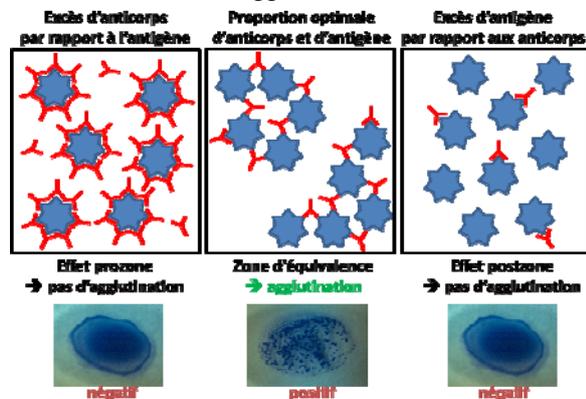


La comparaison des résultats obtenus avec trois techniques (ELISA, ARL classique, et ARL dilution) a mis en évidence des différences très significatives entre la technique ARL classique et la technique ARL

dilution ou l'ELISA dans tous les lots de poules prélevés : alors que la majorité des poules étaient positives avec ces deux dernières techniques (de 76,7 à 100 % en fonction des points de cinétique, du lot de poules et de la technique), de très fortes variations ont été observées avec la technique ARL classique, avec 3 à 96,7% de poules positives en fonction des points de cinétique (Figure 1, un seul lot de poules représenté). Des résultats similaires ont été obtenus avec les deux antigènes disponibles en France pour la technique ARL (Soleil SARL et Biovac) suggérant que ce phénomène n'est pas lié à la qualité de l'antigène utilisé.

Les différences observées entre les deux techniques ARL (classique et dilution) suggèrent un effet prozone, caractérisé par un excès d'anticorps dans le sérum, qui empêcherait l'observation d'une réaction d'agglutination normale (Figure 2). La formation de complexes antigènes-anticorps se produit en effet de façon optimale lorsque les sites antigéniques et les molécules d'anticorps sont approximativement en quantité égale (zone d'équivalence). La dilution systématique des sérums permettrait ainsi de réduire la concentration en anticorps par rapport à l'antigène et d'observer à nouveau une agglutination (retour à une proportion optimale d'anticorps et d'antigène).

Figure 2 : effet d'un excès d'anticorps ou d'antigène lors d'une réaction d'agglutination.



Ces différences importantes entre les deux techniques ARL ont été observées au cours de l'année 2016 dans d'autres élevages de poules pondeuses infectés par *M. synoviae*, avec ou sans syndrome des œufs à extrémité de verre (résultats non présentés). Elles ont également pu être mises en évidence dans des élevages infectés par *M. gallisepticum* (Tableau 3) : la

technique ARL dilution a permis de détecter significativement plus de poules positives vis-à-vis de *M. gallisepticum* que la technique ARL classique dans la plupart des lots prélevés. Ces résultats suggèrent que ce phénomène ne se limite pas aux infections par *M. synoviae* sur le terrain.

Tableau 3 : comparaison de différentes techniques sérologiques pour détecter une infection à *M. gallisepticum* dans différents lots de poules pondeuses.

	ARL classique	ARL dilution	ELISA
Elevage 1	6/20 ^a (30) ^b	20/20 (100)	20/20 (100)
Elevage 2			
Bât. A	11/30 (36,7)	29/30 (96,7)	ND
Bât. B	10/30 (33,3)	23/30 (76,7)	ND
Bât. C	2/20 (10)	2/20 (10)	ND
Bât. D	4/20 (20)	16/20 (80)	ND

^a : nombre de poules positives sur nombre total de poules ; ^b : pourcentage de poules positives.

CONCLUSION

Ces différents travaux montrent l'importance de la nature des prélèvements et des techniques de diagnostic utilisées pour dépister les infections par *M. synoviae* et *M. gallisepticum* chez les poules pondeuses. L'utilisation de la technique ARL classique peut en effet conduire à une forte sous-estimation du pourcentage de poules infectées (proportion importante de faux négatifs), voire à la non détection d'un lot infecté si d'autres techniques ne sont pas utilisées en complément (ELISA ou PCR). Ils posent également la question d'une modification des conditions d'utilisation de la technique ARL par les laboratoires de diagnostic (dilution systématique des sérums avant la mise en œuvre de la technique) pour permettre un meilleur dépistage des troupeaux infectés par *M. synoviae*. Cependant, cette technique modifiée n'est pas décrite dans les méthodes officielles de contrôle des mycoplasmoses aviaires (OIE et méthode NF U47-012).

D'autres études, notamment sur des lots de poulets de chair et de dindes, seraient nécessaires pour déterminer si ce phénomène peut être également observé dans ces deux filières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fergusson-Noel N., Noormohammadi A., 2013. In Diseases of poultry (Swayne D.E. et al., Ed.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 877-893.
 Frey M.L., Hanson R.P., Anderson D.P., 1968. Am. J. Vet. Res., 29, 2163-2171.
 Gautier-Bouchardon A.V., 2012. Le Nouveau Praticien Vétérinaire, 5 (20), 40-43.
 Gautier-Bouchardon A.V., Kempf I., 2008. Bull. Acad. Vét. France, 161 (2), 185-190.

- Kellog D. E., Kwok S., 1990. *In* PCR protocols: a guide to methods and amplification (Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J., Eds), pp. 339–43. Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Kempf I., 2006. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, (3), 49-53.
- Kempf I., Blanchard A., Gesbert F., Guittet M., Bennejean G., 1993. *Avian Pathol.*, 22(4), 739-750.
- Lauerma L.H, Hoerr F.J., Sharpton A.R., Shah S.M., van Santen V.L., 1993. *Avian Dis.*, 37(3), 829-834.
- OIE, 2008. *In* Manuel des tests diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres (OIE Ed.), chap. 2.3.5., 16 pages.
- Raviv Z., Ley D.H., 2013. *In* Diseases of poultry (Swayne D.E. *et al.*, Ed.), Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 900-906.