

RECHERCHES D'HISTOMONAS MELEAGRIDIS PAR PCR DANS LES ELEVAGES DE DINDES : SUIVI DE 10 LOTS ATTEINTS D'HISTOMONOSE, ETUDE DE LA PREVALENCE DU PORTAGE D'HISTOMONAS MELEAGRIDIS DANS 150 ELEVAGES ET SUIVI D'UN ELEVAGE RECIDIVISTE D'HISTOMONOSE.

Souillard Rozenn¹, Moalic Pierre Yves², Eterradosi Nicolas¹, Le Pottier Gilles³, Repérant Jean Michel¹, Balaine Loïc¹, Michel Virginie¹.

¹ AFSSA Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments 22440 Ploufragan

² Laboratoire LABOFARM 22600 Loudéac

³ CIDEF Comité Interprofessionnel de la Dinde Française 35310 Mordelles

RESUME

Depuis l'interdiction en 2003 de tous les anti-histomoniques, l'histomonose est réapparue dans les élevages de dindes. Les objectifs du programme d'étude sont (1) d'identifier les meilleurs prélèvements permettant de détecter *Histomonas meleagridis* par PCR Temps réel dans 10 élevages atteints d'histomonose, et (2) d'étudier le taux de prévalence du portage d'*Histomonas meleagridis* dans 150 élevages de dindes. Les 10 élevages de dindes atteints d'histomonose ont été suivis en 2007. Les prélèvements les plus pertinents pour détecter *Histomonas meleagridis* par PCR se sont avérés être : les caecums, les fientes caecales, les pédichiffonnettes, la poussière et l'eau des abreuvoirs (contaminés à partir des fientes caecales). Puis, l'enquête de prévalence du portage d'*Histomonas meleagridis* a été menée en 2008 dans 120 lots de dindes de chair et 30 lots de dindes futures reproductrices. Les prélèvements identifiés lors de la phase 1 ont été collectés et analysés par PCR Temps réel. Un lot de dindes de chair (résultats positifs) et un lot de dindes futures reproductrices (résultats douteux) ont été détectés porteurs asymptomatiques d'*Histomonas meleagridis*. Par ailleurs, un lot de dindes de chair a déclaré une histomonose sans qu'un portage ne soit détecté un mois auparavant. Etant donnée la récurrence des cas, afin de rechercher une éventuelle source du parasite, un suivi renforcé a été réalisé sur le lot suivant, qui a également déclaré une histomonose. *Histomonas meleagridis* a été identifié dans la basse-cour avec un faible niveau de contamination. Ces résultats montrent qu'il est possible de détecter *Histomonas meleagridis* par PCR à partir de prélèvements environnementaux, des outils indispensables pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie. Ces méthodes nous ont permis de mettre en évidence que le portage d'*Histomonas meleagridis* est rare sur la période considérée et de rechercher des sources de contamination. On peut en effet envisager qu'une introduction ponctuelle du parasite dans les bâtiments, par une voie de contamination pour le moment inconnue, soit à l'origine de la maladie.

ABSTRACT

Since the prohibition of effective molecules against histomoniasis in 2003, the disease increase in turkeys flocks. Our study program aims : (1) to identify the best samples to detect *Histomonas meleagridis* by Real-Time PCR in 10 turkeys flocks with histomoniasis and (2) to study the prevalence of *Histomonas meleagridis* in 150 turkeys flocks. The 10 flocks with histomoniasis were followed in 2007. The best samples to detect *Histomonas meleagridis* were caeca, caecal droppings, boot-swabs, dust and drinking water (contaminated by caecal droppings). Then, the prevalence study was carried out in 2008 in 120 meat turkeys flocks and 30 breeder turkeys flocks. The samples identified in phase 1 were collected and analyzed by Real Time PCR. One meat turkeys flock (positive results) and one breeder turkeys flock (doubtful results) were detected as *Histomonas meleagridis* asymptomatic carrier. In addition, a turkeys flock declared histomoniasis without *Histomonas* detection one month before. Regarding these repeated cases, to seek a possible parasite source, a follow-up was carried out on the following flock, which also declared histomoniasis. *Histomonas meleagridis* was identified in the farmyard with a low contamination level. These results showed that it is possible to detect *Histomonas meleagridis* by PCR from environmental samples, what is essential to better understand disease epidemiology. These methods enabled us to highlight that the *Histomonas meleagridis* carrying is rare and to seek the sources of contamination. We can consider that the parasite introduction into the buildings, by an unknown contamination way, could be the disease origin.

INTRODUCTION

Depuis l'interdiction en 2003 de tous les anti-histomoniques préventifs et curatifs dans les filières avicoles, l'histomonose est devenue une maladie parasitaire ré-émergente dans les élevages de dindes (Callait-Cardinal et al., 2007). Les dindes atteintes de la maladie peuvent présenter une diarrhée jaune soufre. Puis, brutalement une augmentation de la mortalité est observée : de 1 à 2% par jour, elle peut atteindre 85% (Van Beek, 2003). Les lésions de l'histomonose sont observées dans les caecums (contenu caséux et ulcération de la paroi caecale) et le foie avec des foyers de nécrose en cocarde caractéristiques de l'histomonose (McDougald, 1997). Pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie, un programme d'étude a été mené en deux phases. La première étape conduite en 2007 a consisté en un suivi de 10 élevages de dindes atteints d'histomonose clinique afin d'identifier les prélèvements les plus pertinents pour détecter *Histomonas meleagridis* par PCR dans l'environnement et sur animaux. Il s'agit en effet d'outils indispensables pour mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie. Puis, grâce à l'identification des meilleurs prélèvements pour détecter *Histomonas meleagridis* par PCR, lors de la seconde phase du programme, une étude de la prévalence du portage asymptomatique d'*Histomonas meleagridis* dans 150 élevages de dindes a été menée entre septembre 2007 et août 2008. Au cours de cette étude, le suivi renforcé d'un élevage de dindes récidiviste d'histomonose a également été réalisé afin de rechercher d'éventuelles sources de contamination du parasite.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Recrutement des élevages de dindes

Les élevages de dindes participants au programme d'étude ont été recrutés grâce à la mobilisation des organisations professionnelles par le CIDEF. Les 10 élevages atteints d'une histomonose clinique présentaient des lésions caecales et hépatiques caractéristiques de la maladie associées à de la mortalité. Concernant l'enquête de prévalence du portage d'*Histomonas meleagridis*, le nombre d'élevages à enquêter (pour une prévalence attendue de 25% et une précision relative de 30%), a été fixé à 120 élevages de dindes de chair. Afin d'obtenir des données pour les élevages de dindes futures reproductrices, il a été possible de suivre 30 lots dans cette production. Dix organisations de dindes de chair et 5 couvoirs ont été volontaires pour participer à l'étude. Chaque mois pendant un an, 10 élevages de dindes de chair et 2 à 3 élevages de dindes futures reproductrices ont été tirés au sort à partir des plannings de mise en place des dindes de chaque

organisation. Parmi les 150 élevages de dindes, un seul lot a déclaré une histomonose clinique, qui correspondait au 5ème cas observé sur l'exploitation depuis 2004. Le lot suivant mis en place dans le même bâtiment a été suivi de manière renforcée.

1.2. Le protocole des visites d'élevages

Pour les 10 lots de dindes atteints d'histomonose, une visite a eu lieu dès l'apparition de la maladie. Des prélèvements ont été réalisés : autopsie de 5 dindes malades avec prélèvement des caecums, prélèvement de 30 fientes caecales, 2 prélèvements d'eau des abreuvoirs, 2 prélèvements de poussière, 2 chiffonnettes, 2 pédi-chiffonnettes et des ténébrions.

Dans les 150 élevages de dindes, une visite par élevage a été réalisée, à l'âge de 6 à 8 semaines pour les lots de dindes de chair et à l'âge de 10 à 12 semaines pour les lots de dindes futures reproductrices, ce qui correspond aux âges pour lesquels la plupart des cas d'histomonose sont rapportés (Callait-Cardinal et al., 2007). Des prélèvements ont été collectés dans le bâtiment : autopsies de 5 dindes de chair et prélèvement des caecums, 20 fientes caecales, 1 pot de poussière, 1 flacon d'eau des abreuvoirs et 2 pédi-chiffonnettes. Puis, il a été demandé aux éleveurs volontaires de réaliser une pédi-chiffonnette en fin de lot, afin de mettre en évidence un éventuel portage plus tardif.

Concernant le suivi renforcé de l'élevage récidiviste d'histomonose, des prélèvements ont été réalisés au cours du lot à 30 et 55 jours d'âge dans le bâtiment (1 chiffonnette, 1 pédi-chiffonnette, des ténébrions, 20 fientes caecales et autopsies de 5 dindes avec prélèvements des caecums à 55j) et à l'extérieur (1 pédi-chiffonnette dans la basse-cour, 1 chiffonnette sur la paroi extérieure du bâtiment, 1 pédi-chiffonnette sur la plate forme du fumier, 1 pot de terre devant le sas, 1 pot de vers de terre, 1 sac de copeaux stockés, 11 fientes de la basse-cour, 1 pot de fientes d'oiseaux sauvages, 1 pédi-chiffonnette devant le sas et 1 pédi-chiffonnette dans le bâtiment de porcs). A 1 jour et 42 jours d'âge, 1 chiffonnette et 1 pédi-chiffonnette ont également été réalisées dans le bâtiment.

1.3. Les analyses de laboratoire

Pour les prélèvements de caecums et de fientes collectés dans les 10 élevages de dindes atteints d'histomonose, deux méthodes de préparation en vue d'une analyse PCR ont été comparées. La première méthode a consisté à utiliser un papier FTA®. La chimie du papier FTA® permet d'inactiver les phages, les bactéries et les virus rendant ainsi inertes les échantillons collectés. La seconde méthode a consisté à congeler les échantillons pour une analyse directe par PCR. Pour les autres prélèvements environnementaux, selon la nature des échantillons, une seule méthode de préparation des échantillons a

été réalisée. Pour les échantillons collectés dans les 150 lots de dindes et dans l'élevage récidiviste d'histomonose, tous les prélèvements ont été directement mis à congeler sauf le flacon d'eau qui a été centrifugé (10 min à 10 000 g) et le culot de centrifugation congelé. Les échantillons ont été analysés par la technique PCR temps réel développée et validée par le laboratoire Labofarm. La sensibilité de ce test a été comparée à celle de la PCR classique déjà utilisée à Labofarm (modifiée d'après Huber et al, 2005). Le seuil de détection des 2 techniques est le même (dilution 10^{-3}), et aux faibles concentrations en parasites, la PCR temps réel donne un résultat plus répétable (communication personnelle Pierre Yves Moalic). La spécificité des amorces et de la sonde a été validée *in silico* par comparaison avec les séquences génomiques disponibles dans les banques de données de biologie moléculaire. La spécificité *in vitro* a été vérifiée à partir de 26 souches bactériennes et un protozoaire flagellé (*Tetratrichomonas gallinarum*). La spécificité estimée serait de 100%, sous réserve des dernières vérifications à partir d'autres protozoaires flagellés.

Par ailleurs, dans les 10 élevages de dindes atteints d'histomonose et lors du suivi renforcé de l'élevage récidiviste d'histomonose, des bilans parasitologiques avec recherche des nématodes *Heterakis*, vecteurs potentiels d'*Histomonas meleagridis*, ont été réalisés à partir des prélèvements collectés dans les élevages.

1.4. Le traitement statistique des données

Les données récoltées sur le terrain ont été saisies dans le logiciel Sphynx version 5 (sphynx developement). Puis, un travail de vérification et de traitement des données a été mené grâce au logiciel SAS 9.0.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Détection d'*Histomonas meleagridis* par PCR dans 10 élevages atteints d'histomonose

5 élevages de dindes de chair et 5 élevages de dindes futures reproductrices atteints d'histomonose ont été suivis. Pour 3 élevages de dindes de chair et 2 élevages de dindes futures reproductrices, le pourcentage de mortalité lié à la maladie a été supérieur à 25%. Il a atteint 80% dans un élevage de dindes Label du Sud Ouest. Comme le montre le tableau 1, toutes les PCR réalisées sur les caecums congelés ont donné un résultat positif pour les 10 élevages. Par contre à partir de la méthode sur papier FTA[®], des caecums ont été trouvés négatifs dans 4 élevages. Les résultats concernant les fientes caecales mettent en évidence une variabilité importante selon les élevages. En effet, avec la méthode sur échantillons congelés entre 1 et 30 fientes ont été détectées positives par élevage et avec la méthode FTA[®] entre 0 et 24 fientes ont été trouvées positives.

Sur la totalité des fientes analysées dans les 10 élevages, 28% ont été trouvées positives par la méthode sur papier FTA[®] et 45,5% sur échantillons congelés. Comme pour les résultats obtenus à partir des caecums, la méthode d'analyse PCR sur échantillons congelés semble être la plus sensible. Par ailleurs, il a été possible de détecter *Histomonas meleagridis* dans tous les prélèvements environnementaux, très probablement contaminés à partir des fientes caecales. Les prélèvements les plus pertinents pour détecter *Histomonas meleagridis* dans l'environnement semblent être les pédi-chiffonnettes (détection d'*Histomonas* dans 7 élevages), l'eau (détection d'*Histomonas* dans 6 élevages) et la poussière (détection d'*Histomonas* dans 9 élevages).

Jusqu'au développement de la méthode d'analyse par PCR, la détection d'*Histomonas meleagridis* par microscopie, histologie ou mise en culture, était difficile. Cependant, le protozoaire a pu être identifié dans les caecums, les tissus (hépatique et muqueuse cœcale) des volailles, mais également dans les oeufs du nématode *Heterakis* (Mc Dougald, 1997). Les techniques d'analyses PCR facilitent désormais la détection du protozoaire à partir de prélèvements sur animaux mais également dans l'environnement. Jusqu'à présent, lors de cas cliniques d'histomonose sur le terrain, *Histomonas meleagridis* a été détecté par PCR uniquement à partir d'organes, essentiellement le foie et les caecums (Hafez et al., 2005 ; Hauck et al., 2006), et de ténébriens (Huber et al., 2007). Au cours du suivi des 10 élevages de dindes atteints d'histomonose, on a pu confirmer que les caecums étaient des prélèvements de choix pour détecter *Histomonas meleagridis* par PCR et qu'il était également possible de l'identifier à partir de ténébriens. Les résultats de notre étude montrent pour la première fois qu'il est aussi possible de détecter *Histomonas meleagridis* par PCR dans des élevages à partir des fientes caecales et de prélèvements environnementaux (chiffonnettes, pédichiffonnettes, poussière et eau des abreuvoirs). En effet, pour le moment, la seule recherche du protozoaire sur le terrain dans des prélèvements d'environnement a été réalisée à partir de ténébriens et l'identification du parasite dans les fientes a été uniquement effectuée après infestation expérimentale de dindes (Huber et al., 2005). La possibilité de détecter *Histomonas meleagridis* à partir de prélèvements environnementaux facilement réalisables en élevage nous a permis d'étudier le portage asymptomatique des animaux et de rechercher les sources du parasite.

2.2. Etude du portage d'*Histomonas meleagridis* dans 150 élevages de dindes

Concernant les résultats de l'enquête de prévalence du portage d'*Histomonas meleagridis* (tableau 2), parmi les 120 lots de dindes de chair, 1 lot a été trouvé porteur d'*Histomonas meleagridis* en novembre 2007 sans déclarer d'histomonose clinique par la suite. Pour

les 30 lots de dindes futures reproductrices, 1 lot a également été trouvé porteur du protozoaire en octobre 2007 avec cependant des résultats PCR qualifiés de douteux (c'est à dire à l'extrême limite de sensibilité de la méthode utilisée), sans présenter de signe clinique de la maladie. Le taux de prévalence du portage d'*Histomonas meleagridis* dans les élevages de dindes de chair est de 0,8% avec un intervalle de confiance à 95% de [0%-2.4%]. Pour les élevages de dindes futures reproductrices, étant donnés les résultats douteux du lot détecté porteur, aucune extrapolation ne peut être faite et nous ne préférons pas exprimer de taux de prévalence. Par ailleurs, parmi les 68 pédi-chiffonnettes de fin de lot analysées par PCR, aucune n'a été trouvée positive. Les lots de dindes ne seraient que très rarement porteurs asymptomatique d'*Histomonas meleagridis*, ou alors porteurs à un niveau trop faible pour être détecté par le protocole appliqué ici. On peut alors envisager que le parasite soit introduit dans les bâtiments, par une voie de contamination pour le moment inconnue.

2.3. Suivi de l'élevage récidiviste d'histomonose

Pour le suivi renforcé de l'élevage récidiviste d'histomonose, des échantillons ont été détectés positifs par PCR : à 30 jours d'âge des animaux, un pool de 5 fientes caecales de dindes prélevées dans le bâtiment montre un résultat positif mais non reproductible. Ce qui laisserait supposer que des dindes excréteraient de l'*Histomonas* en faible quantité d'où la difficulté pour le détecter. Ce lot de dindes a déclaré une histomonose clinique environ une semaine plus tard, ce qui correspondrait à la période d'incubation de la maladie. A 42 jours, le résultat PCR d'une pédi-chiffonnette réalisée dans le bâtiment s'est également révélée positive mais non reproductible. Puis à 55 jours d'âge, à l'extérieur du bâtiment, la pédi-chiffonnette de la basse-cour a montré un résultat positif mais non reproductible, qui révèle un niveau de contamination faible. Enfin à 55 jours, le pool de caecums a également été positif et reproductible. Ce résultat confirme le cas d'histomonose avec une présence facilement détectable d'*Histomonas meleagridis* dans les caecums. Concernant les données épidémiologiques collectées, même si les voies de contamination des élevages de dindes par *Histomonas meleagridis* sont pour le moment inconnues, certaines pratiques pourraient être supposées à risque vis à vis de la récurrence des cas d'histomonose : site en bande multiple, plate-forme de stockage du fumier à 50 m du bâtiment, présence d'une basse-cour, portails du bâtiment ouverts lors du vide sanitaire.

Histomonas a été détecté avec un faible niveau de contamination dans la basse-cour, qui pourrait représenter une source de contamination. Cependant, étant donnée l'apparition d'un cas clinique d'histomonose dans le bâtiment de dindes au cours du suivi, la possibilité d'une contamination de la basse-

cour à partir des dindes atteintes par la maladie doit être envisagée. Toutefois, la basse-cour pourrait représenter un risque potentiel de persistance de parasites sur l'exploitation. Les sites d'élevages multi-espèces avec présence de poulets ou de gibiers, sont en effet des pratiques à risque vis à vis de l'histomonose (McDougald, 2005).

2.4. Bilans parasitologiques des élevages:

Lors du suivi des 10 élevages de dindes atteints d'histomonose, à partir des fientes caecales et des caecums, aucun nématode *Heterakis* n'a été mis en évidence, par contre pour un élevage, des *Ascaridia* ont été identifiés dans les caecums. Au cours du suivi renforcé de l'élevage récidiviste d'histomonose, des oocystes de coccidies ont été identifiés : essentiellement *E.meleagrimitis* à partir des fientes de dindes, *E. acervulina* et *E. tenella*, pour les fientes de la basse-cour et *E.Isospora* dans les fientes d'oiseaux sauvages. Par conséquent, ces bilans parasitologiques n'ont pas révélé la présence du nématode *Heterakis* mais un faible niveau d'infestation ne peut être exclu. Même si les *Heterakis*, sont des vecteurs potentiels d'*Histomonas meleagridis* (Ruff et al., 1970), bien que ce parasite n'ait pas été mis en évidence dans notre étude, une seconde hypothèse serait l'intervention d'autres vecteurs parasitaires d'*Histomonas*. Notamment, dans un élevage de dindes suivi par notre étude, des *Ascaridia* ont été identifiés. Aux Etats Unis, lors d'un épisode d'histomonose, les examens parasitaires n'ont pas permis d'identifier d'*Heterakis*, en revanche des *Ascaridia* ont également été détectés (Norton et al., 1999). N'ayant pas de forme de résistance connue, *Histomonas meleagridis* pourrait en effet être véhiculé par des parasites vecteurs et introduit dans les bâtiments via différentes voies, tels que le personnel, le matériel, la litière, les poussières, l'eau, les insectes, les rongeurs, ... Il n'existe pour le moment aucune donnée épidémiologique permettant d'expliquer les modalités d'introduction du parasite dans les élevages (Van Beek, 2003). Par ailleurs, une autre voie de contamination par « Cloacal drinking » a été récemment mise en évidence chez la dinde (Hu et al., 2004). Il s'agit d'une contamination directe entre dindes par absorption cloacale à partir d'une litière humide fraîchement contaminée, et en absence d'*Heterakis*.

CONCLUSION

En conclusion, les résultats de ces études montrent qu'il est désormais possible de détecter *Histomonas meleagridis* par PCR dans l'environnement des élevages. Etant donnée la rareté du portage asymptomatique chez les dindes, ces recherches pourront être menées pour tenter d'identifier les sources du parasite et les voies de contamination des élevages.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Callait-Cardinal M.P., Leroux S., Chauve C., Le Pottier G., Zenner L, 2007. Proceedings of « Septièmes journées de la recherche avicole », Tours, 28 et 29 mars 2007.
- Hafez, H.M., R. Hauck, D. Luschow, L. McDougald, 2005. Avian Dis, 49(3): 366-370.
- Hauck, R., D. Luschow, H.M. Hafez, 2006. Avian Dis, 50(1): 35-38.
- Hu, J., L. Fuller, L. R. McDougald, 2004. Avian Dis, 48(4): 746-50.
- Huber, K., C. Chauve, L. Zenner, 2005. Vet Parasitol, 131(3-4): 311-316.
- Huber, K., L. Gouilloud, L. Zenner, 2007. Avian Pathol, 36(4): 279-82.
- McDougald L.R, 1997. In : diseases of poultry. 10th edition. Calnek Ed. Iowa State university press, pp.890-895.
- McDougald, L. R. , 2005. Avian Dis, 49(4): 462-476.
- Norton, R. A., F. D. Clark, 1999. Avian Dis, 43(2): 342-348.
- Ruff M.D., McDougald L.R., Hansen M.F, 1970. J Protozool, Feb; 17(1): 10-11.
- Van Beek, 2003. In : Turkey production : Balance act between consumer protection, animal welfare aspects (Ed. Hafez, H.M.), Verlag Ulmer, p 29-37.

Tableau 1. Résultats des analyses PCR *Histomonas meleagridis* réalisées dans les 10 élevages de dindes atteints d'histomonose clinique.

Prélèvements	Méthode	Résultats PCR	Nombre d'élevages/10
5 caecums	FTA®	5+/5	6
		4+/5	3
		3+/5	1
	Congélation	5+/5	10
30 fientes caecales	FTA®	0+/30	2
		1 à 15 +/30	7
		16 à 29+/30	1
		30+/30	0
	Congélation	0+/30	0
		1 à 15 +/30	7
		16 à 29+/30	2
		30+/30	1
2 chiffonnettes	FTA®	2+/2	2
		1+/2	1
2 pédi-chiffonnettes	FTA®	2+/2	1
		1+/2	6
2 flacons d'eau	FTA®	2+/2	3
		1+/2	3
1 pot ténébrions	Congélation	1+/1	3
2 pots de poussière	Congélation	2+/2	7
		1+/2	2

Tableau 2. Résultats des analyses PCR des 2 lots porteurs positif et douteux d'*Histomonas meleagridis*.

	1 pool de 5 caecums	4 pools de 5 fientes	1 pot de poussière	1 flacon d'eau	2 pédi-chiffonnettes
Lot dindes chair	+	1 pool +	+	douteux	1 douteux
Lot dindes futures reproductrices	Pas d'autopsie	1 pool douteux	Douteux	douteux	2 douteux