

# Étude de la persistance d'*Histomonas meleagridis* dans les élevages de dindes atteints d'histomonose

Rozenn Souillard (1) (rozenn.souillard@anses.fr), Pierre Yves Moalic (2), Jean-Michel Repérant (1), Denis Leon (1), Loïc Balaine (1), Nicolas Etteradossi (1), Virginie Michel (1)

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané

(2) Laboratoire Labofarm, Loudéac

## Résumé

Depuis l'interdiction en 2003 de tous les anti-histomoniques, l'histomonose est réapparue dans les élevages de dindes. Cette étude a pour objectifs de rechercher les lieux et les formes de persistance d'*Histomonas meleagridis* dans les élevages de dindes atteints d'histomonose. Dix élevages de dindes atteints d'histomonose ont été suivis chaque semaine pendant au maximum huit semaines. Les tubes digestifs de cinq dindes malades et des prélèvements environnementaux ont été collectés, analysés par PCR temps réel et en parasitologie. Dans les 10 élevages atteints, les prélèvements les plus fréquemment contaminés par *Histomonas meleagridis* étaient les caeca (84,3 %), la poussière (57,9 %) et les fientes (58,3 %). L'ADN d'*Histomonas meleagridis* a pu être détecté dans les caeca jusqu'à 13 semaines après l'apparition de l'histomonose et dans la poussière jusqu'à sept semaines après le départ des dindes malades. *Histomonas meleagridis* semble également diffuser par les sas sanitaires et à l'extérieur par les ventilateurs. En parasitologie, de nombreux flagellés et des formes suggérant des formes kystiques ont été observés, mais il ne s'agirait pas d'*Histomonas meleagridis*. Ce suivi d'élevages a permis d'identifier les lieux de persistance d'*Histomonas meleagridis* dans l'environnement d'élevages de dindes atteints d'histomonose pour une meilleure maîtrise de la maladie.

## Mots clés

*Histomonas meleagridis*, histomonose, dindes, PCR temps réel, environnement

## Abstract

### *Study on the persistence of Histomonas meleagridis in turkey farms infected by histomoniasis*

Since the 2003 ban on all anti-histomonal drugs, there has been a resurgence of histomoniasis in turkey farms. This study aims to find where and how *Histomonas meleagridis* persists in turkey farms infected by histomoniasis. Ten infected turkey farms were monitored weekly for up to eight weeks. The digestive tract of five diseased turkeys and environmental samples were collected from each farm and analysed by real-time PCR and for parasitology. In the ten infected farms, the samples most often contaminated by *Histomonas* were from caeca (84.3 %), dust (57.9 %) and droppings (58.3 %). The DNA of *Histomonas* was detected in caeca up to 13 weeks after histomoniasis broke out and in dust up to seven weeks after the removal of diseased birds. *Histomonas* also appears to pass through preventive sanitary locks and outside through ventilation systems. The parasitology analysis revealed numerous flagella and shapes suggesting cystic forms but no *Histomonas*. This monitoring programme identified where *Histomonas* persisted in the environment of histomoniasis-infected turkey farms for better disease control.

## Keywords

*Histomonas meleagridis*, histomoniasis, turkeys, real-time PCR, environment

Une recrudescence des cas d'histomonose a été observée dans les élevages de dindes depuis l'interdiction des anti-histomoniques en 2003. Jusqu'en 2002, l'histomonose représentait moins de 1 % de l'ensemble des maladies signalées chez les dindes par les vétérinaires du RNOEA, le Réseau national d'observations épidémiologiques en aviculture animé par l'unité Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Anses). En 2003, cette maladie a atteint 6 % de l'ensemble des maladies signalées chez les dindes par les vétérinaires du réseau, puis sa fréquence a diminué ces dernières années. Même si l'histomonose reste relativement peu fréquente dans les élevages de dindes, elle représente une préoccupation sanitaire majeure étant donné les fortes mortalités observées. L'histomonose est provoquée par un protozoaire flagellé, *Histomonas meleagridis* (McDougald, 2005). Certaines données épidémiologiques sur l'histomonose restent à élucider. Notamment, des formes kystiques d'*Histomonas meleagridis* ont été récemment mises en évidence à partir de cultures du parasite, mais sur le terrain la persistance d'*Histomonas meleagridis* dans des élevages atteints par la maladie n'a pour le moment pas été étudiée (Zaragatzki et al., 2010). L'objectif de cette étude était de rechercher les lieux de persistance d'*Histomonas meleagridis* dans l'environnement d'élevages atteints d'histomonose et de ses formes de persistance à partir d'analyses PCR *Histomonas meleagridis* et d'analyses parasitologiques. Il s'agit de données épidémiologiques indispensables à la mise en œuvre de mesures de lutte efficaces contre la maladie.

## Matériel et méthode

### Visite des élevages atteints d'histomonose et prélèvements

Les vétérinaires et les organisations professionnelles avicoles ont été informés du protocole de l'étude afin que l'unité Épidémiologie et

bien-être en aviculture et cuniculture du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Anses) soit averti des cas cliniques d'histomonose dans les élevages de dindes. Les visites des dix élevages ont lieu à la déclaration du cas clinique d'histomonose, puis toutes les semaines pendant au maximum huit semaines. Lors de chaque visite, des prélèvements sont réalisés à l'intérieur du bâtiment (15 fientes caecales et 5 caeca de dindes malades, 2 pédichiffonnettes, 1 chiffonnette, de la poussière, des ténébrions, de l'eau des abreuvoirs et en bout de ligne), dans le sas sanitaire (2 pédichiffonnettes et 2 chiffonnettes) et à l'extérieur du bâtiment (2 chiffonnettes de parois et 3 pédichiffonnettes). Un questionnaire épidémiologique est également renseigné.

### Analyses PCR *Histomonas meleagridis*

Les prélèvements collectés sont analysés par la technique PCR temps réel développée et validée par le laboratoire Labofarm. Cette technique permet de détecter le protozoaire *Histomonas meleagridis*. Les résultats sont restitués selon la valeur des cycles seuils (Ct), inversement proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon: Ct > 40 : résultat négatif, 35 < Ct < 40 : résultat très faiblement positif (présence de traces d'ADN d'*Histomonas meleagridis*) et Ct < 35 : résultat positif.

### Analyses parasitologiques

Les échantillons PCR *Histomonas meleagridis* positifs sont examinés en parasitologie pour tenter de mettre en évidence par observation directe des formes de résistance du parasite. En plus d'examen microscopiques directs sur frottis frais, des colorations au bleu de méthylène et au lugol ont été réalisées. Les examens directs visaient à observer les éléments mobiles (flagellés) et les colorations étaient destinées à la mise en évidence de formes kystiques.

# Résultats

## Les cas d'histomonose

L'histomonose est apparue plus précocement dans les élevages de dindes de chair que de dindes futures reproductrices (Tableau 1). Les pourcentages de mortalité liés à la maladie ont varié de 1,5 % à 25 %. Dans les bâtiments, un seul sexe était atteint par la maladie. Cette situation pourrait s'expliquer par la séparation des sexes dans les bâtiments (un grillage ou une cloison) et par le mode de transmission directe du parasite entre dindes par absorption cloacale.

**Tableau 1.** Descriptif des 10 élevages de dindes atteints d'histomonose

N° élevage	Type d'élevage	Effectif mis en place	Sexe atteint	Âge en semaines	Mortalité en %
1	Chair	9000 mâles 7000 femelles	Mâles	3	9
2	Futur reproducteur	4880 femelles	Femelles	11	3,5
3	Futur reproducteur	1147 mâles 4240 femelles	Femelles	14	9,5
4	Futur reproducteur	2218 femelles	Femelles	14	25
5	Chair	4590 mâles 4190 femelles	Mâles	12	18
6	Chair	4896 mâles 4690 femelles	Mâles	6	1,5
7	Chair	6630 mâles	Mâles	8	20
8	Chair	4681 mâles 4161 femelles	Mâles	7	16
9	Futur reproducteur	405 mâles 4416 femelles	Femelles	12	8
10	Chair	6700 mâles	Mâles	6	21

## Détection d'*Histomonas meleagridis* par PCR à l'intérieur des bâtiments

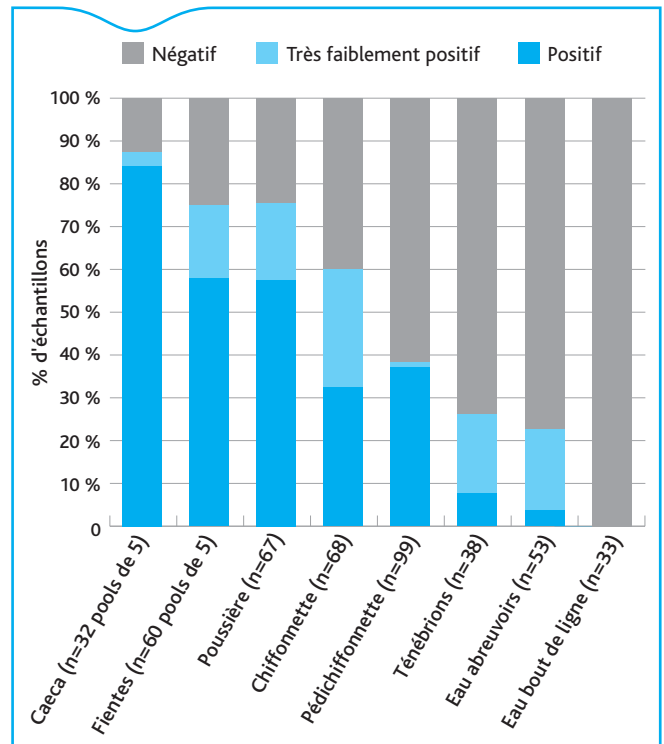
À l'intérieur des bâtiments, parmi l'ensemble des échantillons collectés, les prélèvements les plus fréquemment contaminés par *Histomonas meleagridis* sont les caeca (83.4 %), les fientes (58.3 %) et la poussière (57.9 %) (Figure 1). Dans les caeca, le parasite a été détecté par PCR jusqu'à 13 semaines après la déclaration du cas d'histomonose. Concernant les prélèvements environnementaux, la poussière est l'échantillon le plus contaminé. L'ADN d'*Histomonas meleagridis* a été détecté jusqu'à 7 semaines après le départ des dindes malades. *Histomonas meleagridis* a été détecté par PCR à partir des ténébrions dans trois élevages. Les ténébrions sembleraient donc peu porteurs du parasite. Le parasite a également été détecté dans deux échantillons d'eau des abreuvoirs prélevés dans deux élevages. L'eau des abreuvoirs serait probablement contaminée à partir des fientes caecales.

## Détection d'*Histomonas meleagridis* par PCR dans les sas sanitaires

Dans les sas sanitaires, parmi les six élevages de dindes de chair, *Histomonas meleagridis* a été détecté avec des résultats positifs dans deux élevages et très faiblement positifs dans trois élevages. Parmi les quatre élevages de dindes futures reproductrices, *Histomonas meleagridis* a été détecté avec des résultats positifs dans deux élevages et très faiblement positifs dans les deux autres élevages. Le parasite semble donc pouvoir diffuser par les sas sanitaires.

## Détection d'*Histomonas meleagridis* par PCR à l'extérieur des bâtiments

À l'extérieur des bâtiments, parmi les sept bâtiments dynamiques suivis dans l'étude, on retrouve *Histomonas meleagridis* dans six élevages avec des résultats positifs à partir des chiffonnettes réalisées au niveau des ventilateurs et dans trois élevages à partir de celles réalisées au niveau des trappes. Les bâtiments dynamiques possèdent des trappes d'admission de l'air dans les bâtiments et des ventilateurs permettant



**Figure 1.** Répartition des résultats PCR des prélèvements collectés à l'intérieur des bâtiments (en %) (n = nombre d'échantillons analysés)

d'extraire l'air de ces derniers. Par ailleurs, pour les pédichiffonnettes réalisées à l'extérieur des bâtiments, on retrouve *Histomonas meleagridis* avec des résultats positifs autour des deux bâtiments dynamiques qui présentaient également les plus forts niveaux de contamination au niveau des ventilateurs. Le parasite a probablement pu être rejeté par les ventilateurs (dans la poussière contenant des particules de fientes) et ainsi être détecté sur le sol autour des bâtiments.

## Les analyses parasitologiques

De nombreux flagellés et des formes pouvant faire penser à des formes kystiques ont été observés, mais il ne s'agirait pas d'*Histomonas meleagridis*. En effet, à partir des échantillons dans lesquels des formes suspectes ont été observées, les résultats PCR *Histomonas meleagridis* se sont avérés négatifs.

## Discussion

Jusqu'à présent, lors de cas cliniques d'histomonose sur le terrain, *Histomonas meleagridis* était détecté par PCR à partir d'organes, essentiellement dans le foie et les caeca (Hafez *et al.*, 2005), de ténébrions (Huber *et al.*, 2007) et récemment à partir de mouches et de flaques d'eau boueuse à l'extérieur d'un bâtiment (Hauck *et al.*, 2010). Les résultats de notre étude montrent qu'il est également possible de détecter *Histomonas meleagridis* par PCR dans de nombreux prélèvements environnementaux pendant plusieurs semaines à l'intérieur des bâtiments, mais également dans le sas sanitaire et à l'extérieur des bâtiments, ce qui permet de préconiser des mesures de lutte adaptées pour mieux maîtriser la maladie. Un dépoussiérage complet du bâtiment apparaît essentiel pour éviter une récurrence de la maladie. Les mesures de biosécurité doivent être également renforcées pour éviter toute propagation du parasite, notamment par les sas sanitaires. Par ailleurs, récemment, des formes kystiques d'*Histomonas meleagridis* ont été mises en évidence à partir de cultures du parasite (Zaragatzki *et al.*, 2010). Dans notre étude, les analyses parasitologiques n'ont pas permis de mettre en évidence de formes kystiques d'*Histomonas meleagridis*. Les examens directs ou avec coloration semblaient inadaptés au regard de la diversité et de la richesse des formes observées. L'utilisation de marqueurs spécifiques d'*Histomonas meleagridis* permettrait d'identifier et d'observer spécifiquement d'éventuelles formes de résistance d'*Histomonas meleagridis*.

## Conclusion

Cette étude a permis d'identifier les lieux de persistance d'*Histomonas meleagridis* dans l'environnement des élevages de dindes atteints d'histomonose et conduit à recommander un renforcement de certaines mesures sanitaires (dépoussiérage des bâtiments et mesures de biosécurité).

## Références bibliographiques

[1] Hafez, H.M., Hauck, R., Luschow, D., McDougald, L., (2005). Comparison of the specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of histomoniasis. Avian Dis 49, 366-370.

[2] Hauck, R., Balczulat, S., Hafez, H.M., (2010). Detection of DNA of *Histomonas meleagridis* and *Tetratrichomonas gallinarum* in German poultry flocks between 2004 and 2008. Avian Dis 54, 1021-1025.

[3] Huber, K., Gouilloud, L., Zenner, L., (2007). A preliminary study of natural and experimental infection of the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) with *Histomonas meleagridis* (Protozoa: Sarcocystidae). Avian Pathol 36, 279-282.

[4] McDougald, L.R., (2005). Blackhead disease (histomoniasis) in poultry: a critical review. Avian Dis 49, 462-476.

[5] Zaragatzki, E., Mehlhorn, H., Abdel-Ghaffar, F., Rasheid, K.A.S., Grabensteiner, E., Hess, M., (2010). Experiments to produce cysts in cultures of *Histomonas meleagridis* - The agent of histomonosis in poultry. Parasitology Research 106, 1005-1007.