

Investigations épidémiologiques et microbiologiques de récents foyers de **typhose** et de **pullorose** chez les volailles en France

Mohamed El Hassimiou Dia (1) (mohamed.dia@anses.fr), Sophie Le Bouquin-Leneveu (1), Marie-Léone Vignaud (2), Émilie Bonin (2), Hélène Sadonès (3), Virginie Michel (1), Sophie Granier (2), Frédérique Moury (2), Anne Brisabois (2)

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané

(2) Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons Alfort

(3) Direction générale de l'alimentation, Bureau de la santé animale, Paris

Résumé

Au cours du premier semestre de l'année 2011, trois foyers de pullorose ont été identifiés dans des élevages du nord ouest de la France, dans des filières avicoles de productions différentes. Des investigations épidémiologiques et microbiologiques ont été mises en œuvre afin de tenter d'identifier l'origine et la source de contamination de ces trois élevages. Même si l'examen des différentes données ne permet pas à l'heure actuelle d'identifier de façon formelle l'origine de la contamination de ces élevages, il apparaît au vu des résultats de l'enquête épidémiologique l'existence d'un lien entre deux de ces élevages, confirmé par l'identité du profil mis en évidence par l'analyse moléculaire des souches de *Salmonella* serovar Gallinarum. Au regard de l'importance des conséquences économiques et commerciales susceptibles d'être engendrées en cas de pullorose, il serait souhaitable de sensibiliser les acteurs des filières avicoles à l'éventualité de la réapparition de l'infection par *S. Gallinarum*.

Mots clés

Pullorose, typhose, résurgence, *Salmonella* Gallinarum, volailles

Abstract

Epidemiological and microbiological investigations into recent outbreaks of fowl typhoid and Pullorum disease in poultry in France

During the first half of 2011, three outbreaks of Pullorum disease were identified in farms in northwestern France, in various poultry production sectors. Epidemiological and microbiological investigations were carried out in an attempt to identify the origin and source of contamination of these three farms. While the examination of various data has not yet made it possible to formally identify the source of contamination in these farms, the results of the epidemiological investigation seem to indicate a link between two of these farms. Identification of the profiles through molecular analysis of the *Salmonella* serovar Gallinarum strains has confirmed this link. Given the major economic and trade consequences of an outbreak of Pullorum, it is important to raise awareness in the poultry industry of a possible resurgence of *S. Gallinarum* infection.

Keywords

Pullorum disease, fowl typhoid, resurgence, *Salmonella* Gallinarum, poultry

La typhose et la pullorose sont deux maladies distinctes et spécifiques aux espèces aviaires, dues respectivement aux biovars Gallinarum et Pullorum du sérovar Gallinarum de *Salmonella*. Elles ont été pratiquement éradiquées des élevages intensifs dans la plupart des pays occidentaux (Shivaprasad 2000) mais restent d'une importance économique majeure dans de nombreuses régions du monde (Barrow et Freitas Neto 2011). Les symptômes sont caractéristiques d'une atteinte septicémique chez les volailles jeunes. Les oiseaux plus âgés présentent une anémie, une apathie, une respiration laborieuse et de la diarrhée, mais dans certains cas la maladie peut être bénigne voire inapparente. Dans les élevages de reproducteurs, les seuls symptômes peuvent être une diminution des taux de ponte et d'éclosabilité. La transmission verticale de la maladie provoquant une infection de l'œuf et des poussins à l'éclosion représente la voie de contamination la plus fréquente (OIE 2008).

Depuis le début de l'année 2011, trois foyers ont été identifiés dans des élevages du nord ouest de la France (Figure 1). Le premier foyer, dans la Sarthe concernait un élevage de 158 000 pondeuses d'œufs de consommation élevées en cages dans trois bâtiments, vaccinées contre les infections à *S. Enteritidis* et *S. Typhimurium* (Nobilis Salenvac T). Les mortalités ont débuté dès la première semaine de février sur des animaux âgés alors de 42 semaines et le taux de mortalité a doublé en une semaine dans le bâtiment le plus touché (de 0,25 à 0,51 %).

Un second foyer dans la Vienne concernait un élevage de poulets de chair d'un bâtiment hébergeant 29 900 poussins. De fortes et brutales mortalités de l'ordre de 10 % ont été observées sur des animaux âgés de huit à neuf jours.

Un troisième foyer identifié dans les Deux-Sèvres concernait un élevage de 28 000 reproducteurs chair élevés au sol dans trois bâtiments. Les mortalités ont débuté sur des poules âgées de 46

semaines, une semaine après la recharge en coqs. Dans le bâtiment le plus touché, les taux de mortalité chez les poules et chez les coqs sont passés respectivement de 0,26 % à 4,1 % et de 1,03 % à 6,8 % en deux semaines.

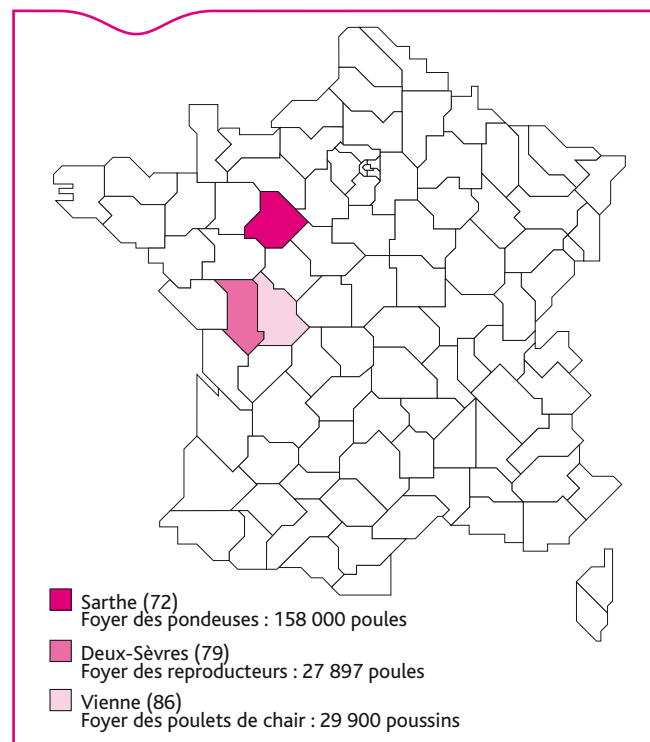


Figure 1. Répartition géographique des foyers de pullorose détectés en France en 2011

Matériels et méthodes

Cette investigation a été établie sur la base des documents mis à disposition par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et les Directions départementales en charge de la protection des populations (DDPP) des départements concernés. En réponse à la demande d'appui scientifique et technique de la DGAL auprès de l'Anses, des enquêtes épidémiologiques et microbiologiques approfondies ont été menées permettant de récolter des données complémentaires.

Des prélèvements (chiffonnettes, sang, organes) ont été réalisés dans ces trois élevages ainsi que dans les basses-cours voisines et envoyés au laboratoire pour analyses (sérologie, autopsie et bactériologie). Une recherche d'anticorps spécifiques de *Salmonella* Gallinarum par séro-agglutination rapide sur lame a été réalisée selon la norme NF U 47-034. La recherche de *Salmonella* a été réalisée selon la norme NF U 47-101. Les souches de *Salmonella* suspectées de serovar Gallinarum ont été transmises au Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses de Maisons-Alfort où des analyses de caractérisation moléculaire ont été réalisées afin d'affiner ou de conforter les conclusions de l'enquête épidémiologique. C'est ainsi que l'étude de caractérisation a porté sur les cinq souches de *Salmonella* provenant des trois élevages, sur une souche isolée de la basse-cour voisine du foyer des Deux-Sèvres et sur la souche vaccinale Nobilis SG9R (Intervet) en vue d'une comparaison (Tableau 1).

Sérotypage conventionnel et moléculaire

Une vérification du sérovar a été réalisée systématiquement sur toutes les souches étudiées dans ce contexte par la méthode conventionnelle par agglutination sur plaques à l'aide de sérums dirigés contre les antigènes somatiques et flagellaires de *Salmonella* selon le schéma de Kauffmann-White-Le Minor (Danan *et al.*, 2010; Grimont et Weill 2007). Le sérovar a également été identifié par la méthode « Premi-Test-*Salmonella* » permettant aussi de déterminer le biovar auquel appartient la souche.

Typage moléculaire par électrophorèse en champ pulsé et par PCR

Le typage moléculaire a été effectué par la méthode PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) qui consiste à réaliser une migration des fragments d'ADN de la souche obtenue après macro-restriction par l'enzyme de restriction classiquement utilisée XbaI. Les profils obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel BioNumerics 6.5 (Applied Maths, Belgique) et archivés dans une base de données permettant la comparaison aux autres profils existants (Kérouanton 2007). Une autre méthode de typage par PCR ciblant les régions CRISPR spécifiques au serovar Gallinarum a été appliquée.

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

Une étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée en comparaison avec la souche vaccinale caractérisée par des résistances à des antibiotiques particuliers permettant de la différencier des souches sauvages habituelles, complétée par une analyse fine de la résistance par mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide utilisant le système Sensititre® (TREK Diagnostic Systems, Royaume-Uni) vis-à-vis de l'acide nalidixique et de la colistine.

Résultats

Investigations épidémiologiques

Chez les poules, l'enquête épidémiologique a permis de mettre en évidence des insuffisances notamment en terme de biosécurité, sas communs avec circulation des intervenants chargés de la rénovation dans les bâtiments en production sans aucune précaution, présence de rongeurs et l'existence de facteurs de risque potentiels, tels que la présence d'un centre de conditionnement d'œufs sur le même site et d'une basse-cour à proximité. Les enquêtes de traçabilité ne montrent aucune mortalité ou signe clinique évocateur de la maladie dans les élevages destinataires des mêmes œufs à couver (OAC).

Tableau 1. Résultats des analyses sérologiques et bactériologiques pour la recherche de *Salmonella* Gallinarum

Nature des prélèvements	Culture de <i>Salmonella</i>	Sérologie
Foyer de la Sarthe		
Prélèvements d'organes		
Foie	+	
Rate	+	
Ovules	+	
Prélèvements environnementaux		
Basse-cour voisine	Aucune investigation	
Foyer de la Vienne		
Prélèvements d'organes		
Foie	+	
Cœur	+	
Prélèvements environnementaux		
Basse-cour voisine	N/A**	-
Foyer des Deux-Sèvres		
Prélèvements d'organes		
Foie	+	
Cœur	+	
Rate	+	
Grappe ovarienne	+	
Oviducte	+	
Prélèvements environnementaux		
Basse-cour voisine	N/A**	+
Basse-cour voisine		
Oviducte	+	
Rate	+	

* 1/5; ** N/A: non analysé; *** 1/10.

Encadré. Recommandations pour le diagnostic et l'investigation de la pullorose

Le dépistage sérologique de *S. Gallinarum* nécessite de collecter suffisamment d'échantillons individuels pour diagnostiquer l'infection au sein d'un troupeau et son interprétation requiert une grande prudence en raison des résultats faussement positifs.

Lors de suspicion sur des oiseaux âgés, prélever en priorité ovaires, foie et rate, sur de jeunes oiseaux; la maladie étant septicémique, plusieurs organes et tissus peuvent être prélevés. En raison de la faible sensibilité de la méthode d'enrichissement au sélénite-cystine à 37 °C, les prélèvements d'environnement sont peu fiables pour l'isolement de ces salmonelles.

En raison de leur rôle de réservoirs potentiels, les animaux des basses-cours voisines doivent faire l'objet d'investigations complètes (sang, organes).

Enfin, une enquête épidémiologique complète doit être menée rapidement afin de recueillir des éléments indispensables aux investigations.

Pour les poulets de chair on note la présence d'une basse-cour personnelle clôturée et l'enquête de traçabilité montre que les poussins sont issus en majorité d'une campagne d'introduction d'OAC d'origine espagnole. Les examens des fiches d'élevage et la collecte des informations sur la chaîne alimentaire (ICA) réalisés par les différentes DDPP dans les sept élevages destinataires des mêmes OAC n'ont pas permis de mettre en évidence d'anomalie particulière, à l'exception d'une mortalité de l'ordre de 7 % dans deux élevages jugée néanmoins conforme.

Chez les reproducteurs, l'enquête a mis en évidence un épisode antérieur de salmonellose à *S. Enteritidis* en 2003, la présence de

Tableau 2. Résultats de caractérisation des souches de serovar Gallinarum

N° Anses	Département	Sérotypage moléculaire/PTS	Marqueurs moléculaires du sérovar	PFGE / Xbal	Antibiogramme	CMI Nal** µg/ml	CMI Colistine µg/ml
11CEB790SAL	72	Gallinarum biovar Pullorum	Profil G3	SGALXB0002	WT*	64	> 4
11CEB982SAL	86	Gallinarum biovar Gallinarum	Profil G5	SGALXB0004	Nal	64	4
11CEB2315SAL	79	Gallinarum biovar Gallinarum	Profil G5	SGALXB0004	Nal	128	4
11CEB2316SAL		Gallinarum biovar Gallinarum	Profil G5	SGALXB0004	Nal	64	4
11CEB2423SAL		Gallinarum biovar Gallinarum	Profil G5	SGALXB0004	Nal	64	4
11CEB3898SAL (souche vaccinale)		Gallinarum biovar Gallinarum	Profil G5	SGALXB0004	WT*	32	< 2

* WT: phénotype sauvage sensible à tous les antibiotiques testés.

** Nal : acide nalidixique.

poux rouges sur les volailles et l'existence d'une basse-cour d'une quarantaine d'oiseaux à proximité immédiate de l'exploitation. Les analyses réalisées dans les élevages d'origine et de destination des coqs de recharge sont toutes négatives et aucune mortalité particulière n'a été signalée. Le suivi renforcé de deux élevages de poulets de chair de Vendée approvisionnés en poussins par le foyer, n'a révélé aucune mortalité anormale ou signe clinique évocateur de la maladie.

Résultats d'analyses

Les autopsies réalisées ont mis en évidence des lésions d'hépatite, d'hypertrophie de la rate et du foie ainsi que des ovules flasques aussi bien dans les Deux-Sèvres que dans la Vienne.

Une recherche d'anticorps spécifiques de *S. Gallinarum* en agglutination rapide sur lame (ARL) s'est révélée négative sur la basse-cour voisine du foyer de la Vienne, mais positive aussi bien sur les animaux du foyer des Deux-Sèvres que sur ceux de la basse-cour voisine.

S. Gallinarum a été isolée à partir de plusieurs organes prélevés sur les animaux issus des trois élevages et même sur ceux de la basse-cour voisine du foyer des Deux-Sèvres (Tableau 2).

Caractérisation des souches

Parmi les six souches de terrain de serovar *Gallinarum* analysées, les résultats de typage permettent de distinguer nettement deux populations différentes (Tableau 2 et Figure 2):

- la souche 11CEB790 provenant de l'élevage de la Sarthe, de biovar Pullorum et présentant un profil PFGE SGALXB0002;
- les souches 11CEB2315, 2316 et 2423 de l'élevage des Deux-Sèvres, la souche 11 CEB4390 de la basse-cour et la souche 11CEB982 de la Vienne de biovar Gallinarum et présentant un profil PFGE identique SGALXB0004.

Par ailleurs, les analyses de la souche vaccinale montrent qu'elle est du même biovar que les souches précédentes isolées de l'élevage de la Vienne, de l'élevage et de la basse-cour des Deux-Sèvres. Son profil PFGE est également identique au profil de ces cinq mêmes souches comme indiqué sur le dendrogramme (Figure 2). Ce profil SGALXB0004 non répertorié jusqu'à présent se distingue très nettement des autres profils enregistrés dans la base de données des profils moléculaires de PFGE. Les marqueurs moléculaires spécifiques au sérovar *Gallinarum* détectés par PCR ont permis d'identifier deux profils distincts, l'un pour la souche 11CEB790 de biovar Pullorum nommé « profil G3 » et l'autre nommé « profil G5 » retrouvé pour toutes les autres souches des élevages des départements des Deux-Sèvres et de la Vienne ainsi que pour la souche vaccinale. La faible occurrence du profil G5 identifié renforce l'hypothèse de similitude de toutes les souches présentant ce profil.

L'antibiogramme a montré que les souches de biovar *Gallinarum* de la Vienne et des Deux-Sèvres étaient toutes résistantes à l'acide nalidixique, alors que la souche de biovar Pullorum est de phénotype sauvage (WT) c'est-à-dire sensible à tous les antibiotiques testés classiquement sur les Entérobactéries. La souche vaccinale s'est également révélée sensible à tous ces antibiotiques. Compte tenu des hypothèses de proximité entre les souches de terrain de biovar *Gallinarum* et la souche vaccinale, des analyses de sensibilité à certains antibiotiques ont été approfondies par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les mesures de CMI pour l'acide nalidixique ont confirmé également la résistance des souches isolées des élevages de la Vienne et des Deux-Sèvres avec une CMI supérieure à 64 µg/ml, alors que la souche vaccinale présente une CMI de 16 µg/ml, valeur limite du seuil de résistance pour l'acide nalidixique. La souche de biovar Pullorum de la Sarthe est tout à fait sensible à cette molécule. Les CMI à la colistine confirment la résistance des souches issues des élevages à la colistine, alors que la souche vaccinale reste sensible (Tableau 2).

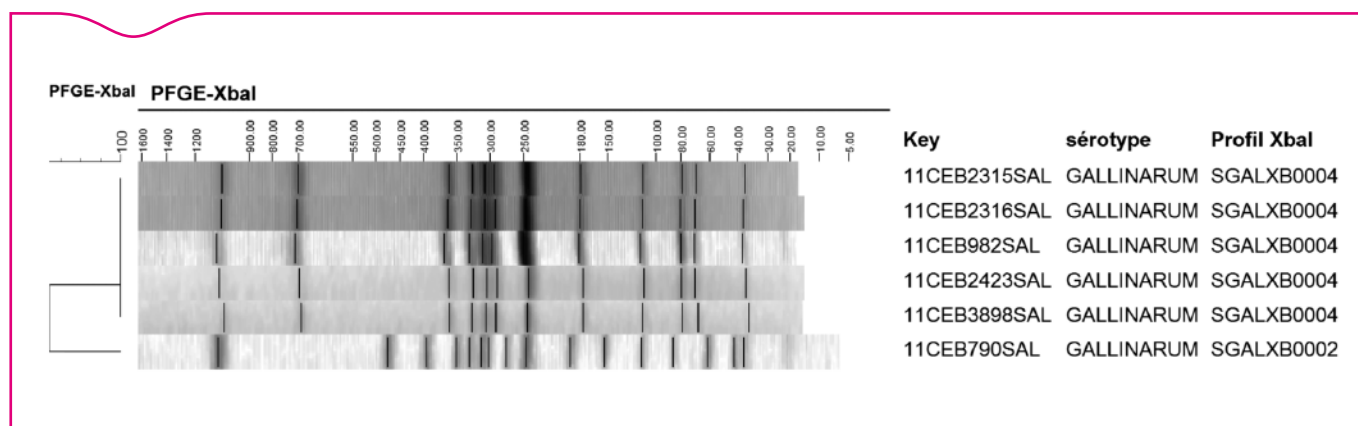


Figure 2. Dendrogramme des profils PFGE analysés par le logiciel BioNumerics

Discussion

Plusieurs hypothèses sur les sources potentielles d'introduction de l'agent pathogène dans l'élevage de la Sarthe peuvent être évoquées. Une introduction de *S. Gallinarum pullorum* est possible à partir des œufs ou de matériel contaminé introduits dans le centre de conditionnement, de la basse-cour voisine ou de rongeurs. L'élevage étant en cours de rénovation (installation de nouvelles cages), l'intervention d'équipes chargées de la maintenance aura pu contribuer à la dissémination de l'agent pathogène dans l'élevage suite à un non-respect des règles de biosécurité. Une résurgence de la maladie suite à une contamination plus ancienne de l'élevage avec une évolution à bas bruit n'est pas non plus à exclure. La vaccination a pu induire une protection croisée, réduisant ainsi la sensibilité des oiseaux et l'excrétion bactérienne et limitant l'impact clinique de l'infection et sa détection.

Dans le cas de la Vienne, une vaccination tardive, en Espagne, des reproductrices avec le vaccin Nobilis SG 9R pourrait être à l'origine d'une transmission verticale de la souche vaccinale par contamination des poussins issus des OAC d'origine espagnole, même si aucun signe évocateur de la maladie n'a été observé dans les autres élevages destinataires des mêmes OAC. Ceci peut être conforté par les caractérisations moléculaires qui montrent une identité de profils moléculaires de la souche vaccinale avec celle issue de la Vienne. Cependant, malgré cette proximité génétique avec la souche vaccinale SG9R, les résultats apportés par les déterminations des CMI montrent clairement une différence de sensibilité entre la souche vaccinale et celle issue de cet élevage. En effet, la souche vaccinale présente une valeur de CMI à l'acide nalidixique, limite au seuil de résistance alors que la souche de l'élevage est résistante ce qui n'est pas en faveur d'une transmission et diffusion de la souche vaccinale, à moins que celle-ci ait fait l'acquisition de résistance à cet antibiotique *in vivo*.

En raison de l'existence d'un lien épidémiologique entre l'élevage des Deux-Sèvres et celui de la Vienne du fait que ces élevages ont recours au même vétérinaire sanitaire et au même livreur, la chronologie des déclarations d'Infections (APDI) montre qu'il est possible d'émettre une hypothèse de contamination de l'élevage des Deux-Sèvres à partir du foyer de la Vienne (Tableau 1). Cette hypothèse est confortée par les analyses de typage moléculaire qui montrent la très grande similitude des souches issues de ces deux élevages aussi bien d'un point de vue génotypique que phénotypique (biovar, antibiorésistance). Cependant, la chronologie des visites permet d'écarter la possibilité d'une contamination entre les deux sites par l'intermédiaire du vétérinaire sanitaire, car sa première visite dans l'élevage des Deux-Sèvres n'intervient qu'à la date de suspicion de la maladie.

Les résultats positifs des analyses sérologiques et bactériologiques effectuées sur les oiseaux de la basse-cour associés à la similitude du profil moléculaire en PFGE des souches isolées suggèrent l'existence d'une contamination croisée entre le foyer des Deux-Sèvres et la basse-cour voisine sans pour autant pouvoir identifier la source initiale.

Conclusion

Pratiquement éradiquée en France depuis plus d'une vingtaine d'années dans la filière Gallus, la pullorose connaît depuis quelques années une recrudescence. Les foyers récemment identifiés dans des filières de production différentes font suite à l'identification de plusieurs cas en 2003 et 2004, notamment chez des pintades.

Même si à l'heure actuelle, l'examen des données ne permet pas d'identifier l'origine de la contamination de ces élevages, il apparaît que les foyers de la Vienne et des Deux-Sèvres sont potentiellement liés (communauté de souche, transporteur commun).

Au regard de l'importance des conséquences économiques et commerciales engendrées, il serait souhaitable :

- d'assurer une sensibilisation de tous les acteurs des filières avicoles à l'éventualité de la réapparition de cette infection;

- de sensibiliser les éleveurs et les groupements de production à l'importance de la basse-cour en tant que réservoir principal de la maladie;
- d'insister sur l'importance de la maîtrise sanitaire des élevages et du respect des mesures de biosécurité, en tenant compte de la multitude des sources d'infection (eau, aliments, visiteurs, rongeurs, etc.) et notamment des oiseaux et des œufs issus d'élevages non indemnes.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des personnes impliquées au sein des DDPP de la Sarthe et de Deux-Sèvres et de la DDCSPP de la Vienne, ainsi que les représentants des laboratoires Bio-Chêne Vert, LaboVet Analyses et VT BIO pour la réalisation des analyses bactériologiques et anatomo-pathologiques ainsi que la transmission des isolats des départements au réseau *Salmonella*.

Références bibliographiques

Barrow, P. A., Freitas Neto, O. C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid-new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 40, 1-13.

Danan C., Fremy S., Moury F., Bohnert M.L., Brisabois A. (2010). Détermination du sérovar de souches de *Salmonella* isolées dans le secteur vétérinaire la filière avicole par la méthode d'agglutination rapide sur lame. *Les cahiers de la Référence (Afssa)*, cahier n° 2.

Grimont PAD and Weill FX. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th edition. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France.

Kérouanton A., Marault M., Lailler R., Weill F.X., Feurer C., Espié E., Brisabois A. (2007) Pulsed-field gel electrophoresis subtyping database for foodborne *Salmonella enterica* serotype discrimination. *FoodBorne Pathogens Disease*, vol 4, 3:293-303.

OIE – Typhose et pullorose. Dans: Manuel terrestre de l'OIE 2008. Chapitre 2.3.11., p 587-598.

Shivaprasad, H. L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19 (2), 405-424.

