

MYCOPLASMOSE AVIAIRE (*Mycoplasma gallisepticum* et *M. synoviae*)

RÉSUMÉ

Définition de la maladie : la mycoplasmosse aviaire est causée par plusieurs mycoplasmes pathogènes parmi lesquels, le plus important, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) et *M. synoviae* (MS), sont les plus importants ; ce sont les seuls à être inscrits sur la liste des maladies devant être notifiées à l'OIE.

Description de la maladie : MG est responsable d'une maladie respiratoire chronique chez les volailles domestiques, en particulier en présence de stress liés à la conduite d'élevage et/ou d'autres agents pathogènes respiratoires. La maladie se caractérise par du coryza, une conjonctivite, des éternuements et une sinusite, surtout chez le dindon, le gibier ou les oiseaux d'ornement. Des pertes de production, des saisies ou des déclassements à l'abattoir et des baisses de ponte peuvent en résulter. MS est responsable d'une maladie respiratoire, d'une synovite ou entraîner une infection silencieuse. L'infectiosité et la virulence des souches de MG et de MS sont variables, certaines infections étant parfois inapparentes.

Identification de l'agent pathogène : MG et MS peuvent être identifiés par des méthodes immunologiques, après isolement sur milieux spécifiques pour mycoplasmes, ou par mise en évidence de leur ADN dans les échantillons ou les cultures.

Les échantillons pour culture peuvent être des écouvillons d'organes ou de tissus, des exsudats, des homogénats dilués de tissus, des liquides aspirés des sinus infra-orbitaires ou d'articulations, ou des fragments de vitellus ou d'embryons. Les signes cliniques et les lésions orienteront le choix des échantillons. Des milieux liquides et gélosés sont utilisés pour l'isolement, mais il est en règle générale nécessaire d'obtenir des colonies sur gélose pour l'identification. Des tests biochimiques de base peuvent être utiles pour une classification préliminaire des isolats, mais l'identification finale repose sur des épreuves immunologiques, les plus satisfaisantes étant les épreuves d'immunofluorescence ou d'immuno-peroxydase.

Les méthodes de détection de l'ADN, basées sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont utilisées dans des laboratoires spécialisés. Une fois validées, elles peuvent être utilisées sur des écouvillons ou des cultures.

Épreuves sérologiques : plusieurs épreuves sérologiques sont utilisées pour détecter les anticorps anti-MG et anti-MS, mais en raison de leurs spécificité et sensibilité variables, ils sont recommandés plus pour un dépistage de lot que pour un test individuel.

Les épreuves les plus utilisées sont l'agglutination rapide sur lame (ARL), les épreuves immuno-enzymatiques (ELISA) et l'épreuve d'inhibition de l'hémagglutination (IHA). Pour l'épreuve d'ARL, les sérums sont mélangés avec un antigène du commerce coloré et des sérums qui réagissent dans les 2 minutes sont chauffés 30 min à 56 °C et re-testés. Les sérums qui réagissent encore, en particulier après dilution, sont considérés positifs et testés soit avec une épreuve ELISA soit par IHA pour confirmation. Plusieurs kits de diagnostic commerciaux ELISA sont disponibles pour MG et MS.

Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique : bien que le maintien d'élevages indemnes de MG ou de MS soit la méthode préférable de contrôle, il existe des vaccins vivants et des vaccins inactivés pour la poule. La vaccination ne doit être

envisagée que sur les sites âges-multiples quand l'infection est inévitable. Elle est en général utilisée pour éviter les pertes de production d'œufs dans les lots de poules pondeuses, mais les vaccins sont parfois aussi utilisés pour réduire la transmission par l'œuf dans les troupeaux de reproducteurs ou comme une aide à l'éradication de MG dans les sites multi-âges. Il est important de vacciner avant infection naturelle.

Les vaccins vivants disponibles sont produits à partir de la souche MG F ou plus récemment des souches ts-11 ou 6/85, qui ne sont pas pathogènes et bénéficient de meilleures caractéristiques de sécurité. Il est préférable d'administrer la souche F par voie intranasale ou par instillation oculaire, mais une administration par aérosol ou par l'eau de boisson peut être réalisée. L'instillation oculaire pour la souche ts-11 et un aérosol à fines particules pour la souche 6/85 sont recommandés. Les poulettes sont généralement vaccinées entre 12 et 16 semaines d'âge. Une dose suffit et les oiseaux vaccinés restent porteurs toute leur vie. Une utilisation à long terme de la souche F dans un site multi-âge aboutit au déplacement des souches sauvages. La souche ts-11 a été utilisée avec succès pour éradiquer la souche F dans des fermes de ponte d'âges multiples. Un vaccin vivant anti-MS a été produit à partir de la souche MS-H et est administré par instillation oculaire.

Les bactérines consistent en des suspensions concentrées de cellules de MG dans une émulsion huileuse. Elles sont administrées par voie parentérale aux poulettes de 12 à 16 semaines d'âge, habituellement par voie sous-cutanée dans le cou. Un rappel est souhaitable. Les bactérines permettent de prévenir les pertes de production d'œufs et la maladie respiratoire, mais elles n'empêchent pas l'infection par des souches sauvages de MG. Une bactérine semblable pour MS a obtenu une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis d'Amérique mais elle n'est pas très utilisée.

A. INTRODUCTION

Mycoplasma gallisepticum (MG) et *M. synoviae* (MS) appartiennent à la classe des Mollicutes, ordre des Mycoplasmatales, famille des Mycoplasmataceae. Il faut noter cependant que *M. meleagridis* et *M. iowae* peuvent aussi provoquer des maladies chez les volailles mais MG et MS sont considérés comme les mycoplasmes les plus pathogènes ; leur répartition est mondiale.

L'infection par MG est particulièrement importante chez la poule et chez la dinde comme cause de maladie respiratoire, chute de poids et baisse de production d'œufs (3, 24). Il peut également être responsable d'infections de l'appareil respiratoire supérieur chez les oiseaux d'ornement ou le gibier. Depuis peu, MG est impliqué en Amérique du Nord dans des cas de conjonctivites chez des fringillidés (27). Chez les volailles, l'infection se transmet verticalement par les œufs infectés et horizontalement par contact étroit : les acides nucléiques de MG ont été détectés dans des échantillons de l'environnement (30) Les autres voies de transmission sont moins bien connues.

Les signes cliniques des volailles infectées par MG varient d'asymptomatiques à des signes respiratoires évidents incluant du coryza, de la toux, et des éternuements. Un exsudat nasal, des râles trachéaux et une respiration par le bec ouvert sont possibles. Une sinusite unilatérale ou bilatérale peut être observée en particulier chez les dindes ou les oiseaux d'ornement ou le gibier, et les sinus infra-orbitaires peuvent être tellement enflés que les paupières sont closes. Une conjonctivite avec un exsudat mousseux est communément relevée chez les dindes et chez les oiseaux d'ornement ou le gibier, parfois chez la poule. Chez la dinde, les plumes de l'aile sont souvent souillées du fait des mouvements des oiseaux qui cherchent à éliminer l'exsudat oculaire. Les fringillidés infectés peuvent parfois présenter des écoulements oculaire et nasal et des paupières enflées, associés à la conjonctivite.

Mycoplasma gallisepticum peut être associé à une maladie respiratoire aiguë chez la poule et chez la dinde, en particulier chez le jeune, l'espèce dinde se révélant plus sensible. La sévérité de la maladie est grandement influencée par l'intensité des infections secondaires virales comme le virus de la maladie de Newcastle ou celui de la bronchite infectieuse et/ou des bactéries comme *Escherichia coli*. Chez la dinde il existe une synergie avec l'infection par le pneumovirus aviaire. Une forme plus chronique de la maladie peut exister et causer une baisse de la production d'œufs chez les reproducteurs ou les poules pondeuses.

Les lésions du tractus respiratoire consistent initialement en un excès d'exsudat muqueux suivi d'un exsudat catarrhal et caséeux qui forment des dépôts amorphes dans les sacs aériens. Chez la dinde, le gibier et les oiseaux d'ornement, les sinus infra-orbitaires enflés contiennent un exsudat muqueux à caséeux.

Les maladies dues à MG ou MS chez le poulet peuvent être confondues avec des maladies respiratoires causées par d'autres agents pathogènes tels que des souches peu virulentes de maladie de Newcastle (Chapitre 2.3.14.) ou la bronchite infectieuse aviaire (Chapitre 2.3.2.). Ces virus peuvent se surajouter aux infections mycoplasmiques à MG ou MS. Les hypothèses d'infections à *Haemophilus paragallinarum* (actuellement *Avibacterium paragallinarum*) et *Pasteurella multocida* doivent également être éliminées. L'infection à MG chez la dinde peut être confondue avec l'infection par le pneumovirus aviaire et la présence de sinusites peut évoquer une infection par *Pasteurella multocida*, *Chlamydia* (Chapitre 2.3.1.) ou MS. Il convient de différencier la synovite infectieuse due à MS de l'infection par *Staphylococcus aureus* et de la tenosynovite infectieuse causée par un réovirus.

Les poulets atteints de synovite infectieuse présentent une pâleur de la crête, de la boiterie et un retard de croissance. Un gonflement peut apparaître autour des articulations. Des écoulements verdâtres contenant de grandes quantités d'urates peuvent être observés. Les articulations sont remplies d'un exsudat visqueux de couleur crème à grise qui remonte le long des gaines tendineuses ; on note aussi une hépatomégalie et une hypertrophie des reins qui sont mouchetés (17). Les symptômes et les lésions respiratoires sont semblables à ceux observés lors d'infection par MG, sauf qu'en général ils sont atténués, et qu'il existe une synergie entre MG et les autres agents pathogènes respiratoires (19). La virulence et le tropisme des souches de MS présentent une grande variabilité (18, 22, 26).

B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

La présence de MG ou de MS doit être confirmée par l'isolement de la bactérie dans un milieu acellulaire ou la détection de son ADN directement dans les tissus infectés ou des écouillons d'organes. Les tests sérologiques aussi sont fréquemment utilisés pour le diagnostic. Quand les résultats sont douteux, des prélèvements sont de nouveau effectués sur les oiseaux, même si des œufs embryonnés de poule ou des poulets peuvent être inoculés avec le matériel suspect. .

1. Identification de la bactérie

• Culture

Des échantillons peuvent être prélevés à partir des oiseaux vivants, de cadavres récents ou de cadavres rapidement congelés. Sur les oiseaux vivants, des écouillons de la fente palatine, de l'oropharynx, de l'œsophage, de la trachée, des yeux, du cloaque et du pénis peuvent être réalisés. Sur des oiseaux morts, des prélèvements de la cavité nasale, des sinus infra-orbitaires, de la trachée ou des sacs aériens peuvent être prélevés. Les exsudats des sinus infra-orbitaires et des articulations peuvent être aspirés.

Les échantillons peuvent également être collectés d'embryons morts dans l'œuf ou de poulets ou dindonneaux qui ont cassé leur coquille mais pas éclos. Des prélèvements peuvent être effectués sur la surface interne de la membrane vitelline, et à partir de l'oropharynx et des sacs aériens de l'embryon.

Tous les échantillons doivent être examinés dès que possible après collecte. Si un transport est nécessaire, de petits fragments de tissus doivent être placés dans du milieu pour mycoplasmes ou des écouillons doivent être chargés par agitation vigoureuse dans 1 à 2 ml de milieu pour mycoplasmes, puis retirés. L'autre solution consiste à imbiber les écouillons de milieu pour mycoplasmes avant de collecter les échantillons (36) puis à les remettre dans le tube pour le transport. De la glace ou d'autres moyens de réfrigération doivent être utilisés car MG et MS meurent rapidement à température ambiante. Des dilutions en série des échantillons dans un bouillon de mycoplasme sont parfois utiles car la présence d'anticorps spécifiques ou d'antibiotiques ou de substances inhibitrices dans les tissus, s'ils ne sont pas éliminés par dilution, peut inhiber la croissance des mycoplasmes.

Plusieurs milieux de culture convenables ont été décrits (10) et ceux qui sont satisfaisants pour l'isolement des mycoplasmes de volailles peuvent être achetés auprès de *Mycoplasma Experience*, *Reigate*, *Surrey*, Royaume-Uni. Les milieux pour mycoplasmes contiennent un extrait protéique et un extrait de viande supplémenté avec du sérum ou une fraction sérique, des extraits de levure, du glucose et des inhibiteurs de bactéries. Il est important que chaque nouveau lot de milieu soit validé avec des cultures de souches de MG récemment isolées et ayant un faible nombre de passages *in vitro* parce que la capacité de certains composants, en particulier l'extrait de levure et le sérum, à permettre la croissance des mycoplasmes peut varier.

Le milieu décrit par Frey *et al.* est largement utilisé aux États-Unis d'Amérique (USA) et dans d'autres pays pour l'isolement de MG et MS (2, 11). Le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) est un facteur de croissance pour le premier isolement de MS, mais il peut être omis du milieu pour la culture de MG.

Les milieux suivant liquides ou gélosés sont également satisfaisants :

- Partie A : base pour *Pleuropneumoniae like organism* (PPLO) sans cristal violet (Difco) (14,7 g) ; eau distillée ou déionisée (700 ml).
- Partie B : sérum de porc (chauffé à 56 °C pendant 1 h) (150 ml) ; extrait frais de levure à 25 % (p/v) (100 ml) ; solution de glucose à 10 % (p/v) (10 ml) ; acétate de thallium à 5 % (p/v) (10 ml), solution de pénicilline G à 200 000 unités internationale (UI)/ml (5 ml) et solution de rouge de phénol à 0,1 % (p/v) (20 ml). L'acétate de thallium peut être toxique pour les hommes et il convient de prendre des précautions lors de son usage. Le pH est ajusté à 7,8. Le sérum de porc peut être remplacé par du sérum de cheval, mais il est important de vérifier qu'il permet la croissance de MG.

La partie A est autoclavée à 121 °C sous une pression d'une atmosphère, pendant 15 min et après refroidissement est ajoutée à la partie B, qui a au préalable été stérilisée par filtration.

Pour obtenir le milieu gélosé, 10 g d'agar pur, validé pour la culture de MG, sont ajoutés à la partie A décrite ci-dessus. Le mélange est autoclavé comme décrit précédemment et conservé au bain-marie à 56 °C. Les constituants de la partie B, sauf le rouge de phénol, sont mélangés séparément, puis incubés à 56 °C. Les parties A et B sont mélangées délicatement pour éviter la formation de bulles d'air puis sont réparties dans des boîtes de Petri de 50 mm de diamètre, à raison de 7 à 9 ml par boîte. L'excès d'humidité peut être éliminé par une courte incubation à 37 °C. Les boîtes sont ensuite stockées à l'abri de l'air à environ 4 °C pendant au maximum 2 semaines.

L'extrait frais de levure est disponible dans le commerce, mais il est préférable de le préparer au laboratoire à partir de levure de boulangerie (250 g) suspendue dans de l'eau distillée (1 litre). Le mélange est porté à ébullition, refroidi puis centrifugé pendant 20 min à 3 000 g. Le surnageant est laissé à décanter puis son pH est ajusté à 8,0 avec de la soude NaOH 0,1M. Il est clarifié par centrifugation ou par filtration puis stérilisé par filtration. L'extrait est conservé à –20 °C. Le glucose (en qualité de réactif) (10 g) est dissous dans de l'eau distillée ou déionisée (100 ml) et le pH est ajusté à 7,8-8 avec du NaOH 0,1 M. Il est stérilisé par filtration et conservé à 4 °C. L'acétate de thallium (en qualité de réactif) (5 g) est dissous dans de l'eau distillée ou déionisée (100 ml), stérilisé par filtration et conservé à –20 °C. La solution de pénicilline (10⁶ UI de benzyl pénicilline dans 5 ml d'eau distillée) est conservée à 4 °C et se conserve une semaine. Pour isolement à partir d'échantillons fortement contaminés, la concentration de pénicilline peut être augmentée à 2 000 UI/ml ou de l'ampicilline (0,5 à 1 mg/ml) peut être utilisée à la place. Le rouge de phénol (0,1 g) est broyé dans du NaOH 0,1 M (2,8 ml) puis le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée stérile, le mélange est ensuite autoclavé à 115 °C sous une pression d'une atmosphère pendant 30 min, puis conservé à 4 °C (NB : l'acétate de thallium est hautement toxique et la préparation de la solution-mère doit être réalisée avec une grande prudence).

Les échantillons sont ensemencés sur les géloses et dans les milieux. Les milieux solides peuvent permettre la détection de colonies de mycoplasmes à croissance lente, qui sont supplantés par la croissance rapide de saprophytes en bouillon. Il peut être nécessaire de réaliser des dilutions jusqu'à 10⁻³ pour permettre l'isolement. Les géloses ensemencées sont incubées à 37 °C dans des récipients étanches. L'augmentation de l'humidité et du taux de CO₂ dans l'atmosphère peut améliorer la croissance ; ces conditions peuvent être obtenues par l'introduction de papier ou de coton imbibé et d'un mélange d'azote et de 5 à 10 % de CO₂ dans le container ou l'inclusion d'une bougie allumée ou l'utilisation d'une étuve à CO₂ ou d'un système adéquat de production de gaz.

Les bouchons des tubes ou flacons de milieux de culture doivent être bien fermés avant incubation à 37 °C pour éviter toute modification de pH inopinée. Pendant les premiers jours la présence de colonies est recherchée quotidiennement à l'aide d'une loupe binoculaire. Par la suite les boîtes sont examinées moins fréquemment. Les cultures à partir d'échantillons du terrain ne doivent pas être considérées comme négatives avant au moins 20 jours.

L'acidification du milieu liquide doit être recherchée quotidiennement et est indiquée par un virage du rouge à l'orange ou au jaune de l'indicateur coloré. Si une croissance est observée, le bouillon est ensemencé sur gélose immédiatement. S'il n'y a pas de changement de couleur, une subculture sur milieu gélosé est réalisée après 7 à 10 jours ou plus tôt car la présence de mycoplasmes hydrolysant l'arginine (donc alcalinisant) peut masquer le changement de couleur produit par MG.

Les colonies mycoplasmiques sur gélose sont en règle générale faciles à reconnaître, bien qu'elles puissent parfois ne pas avoir l'aspect typique « en œuf sur le plat ». Des colonies bactériennes peuvent apparaître au premier passage, mais elles sont souvent plus pigmentées et disparaissent après passage sur milieu pour mycoplasmes.

Les tests biochimiques (par exemple fermentation du glucose et absence d'hydrolyse de l'arginine) peuvent être utiles pour l'identification, mais ils ne sont pas spécifiques de MG ou de MS, et nécessitent une purification de la culture par clonage.

Les méthodes immunologiques et de détection de l'ADN peuvent être utilisées pour identifier les isolats mycoplasmatiques. Elles comprennent les épreuves d'immunofluorescence indirecte (IFI) et d'immunoperoxydase (IP) qui sont simples, sensibles, spécifiques et rapides à exécuter, les épreuves d'inhibition de croissance (IC) et d'inhibition du métabolisme (IM). Des cultures purifiées (clonées) sont nécessaires pour les épreuves d'IC et d'IM mais pas pour les épreuves d'IF ou d'IP. L'IF et l'IP peuvent détecter la présence de plusieurs espèces de mycoplasmes car les colonies spécifiques de l'antisérum réagiront, mais non les autres. Cependant *M. imitans*, une espèce qui est sérologiquement proche de MG et qui possède les mêmes caractères biochimiques, a été isolée chez les canards, les oies et d'autres espèces d'oiseaux non domestiques dans certains pays. Elle peut être différenciée de MG par un test de PCR-RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction [RFLP] après une amplification en chaîne par polymérase [PCR]) comme décrit par Kempf (16). Ou bien, les colonies de l'isolat peuvent être examinées par immunofluorescence en utilisant des dilutions en série des antisérums spécifiques de MG et *M. imitans* en parallèle. Le sérum homologue doit avoir un titre considérablement plus élevé.

Les méthodes de détection de l'ADN pour l'identification de MG ou de MS directement dans les tissus ou pour l'identification des isolats de laboratoire sont développées ci-dessous et sont généralement basées sur la PCR.

Dans certaines circonstances, lorsque les résultats des méthodes ci-dessus ne permettent pas de conclure, l'inoculation d'embryons de poulet ou les bio-essais sur poussins vivants peut être appropriés. Cependant ces méthodes nécessitent du temps, sont coûteuses et tendent à être remplacées par la technologie PCR, bien qu'elles restent un outil précieux pour la recherche. Les échantillons nécessaires pour l'inoculation aux embryons de poulet sont les mêmes que ceux utilisés pour l'inoculation de milieux artificiels. Ils sont préparés à partir de milieu sans acétate de thallium, incubés pendant 30 à 60 min à 37 °C, puis un aliquot de 0,05 à 0,1 ml est inoculé dans le sac vitellin de plusieurs embryons de 6 à 8 jours d'incubation, issus de lots de reproducteurs indemnes de mycoplasmes. Les œufs sont mirés tous les jours et les embryons qui meurent dans les 24 h après inoculation sont écartés. Tous les autres embryons qui meurent ensuite sont placés au réfrigérateur jusqu'à la mise en culture, et ceux qui survivent après 5 jours sont placés à 4 °C pendant 4 h pour les tuer et réduire les hémorragies lors de l'ouverture. Le vitellus estensemencé dans le milieu liquide et sur milieu gélosé. Les lipides du vitellus tendent à masquer les colonies, et il est donc essentiel de déposer le vitellus en couche très fine, ou mieux, de le diluer d'abord dans du milieu pour mycoplasmes.

Les épreuves biologiques peuvent être réalisées en préparant un homogénat de matériel suspect qui sera inoculé à au moins 4 poulets sensibles de 8 à 16 semaines, indemnes de mycoplasmes. Le diagnostic est confirmé par le réisolement du mycoplasme à partir de ces oiseaux, la démonstration de la présence de son ADN et/ou la mise en évidence d'anticorps spécifiques (28).

- **Méthodes immunologiques**

Les épreuves d'immunofluorescence et d'IP pour le diagnostic sont en règle générale utilisées pour des isolats de laboratoire plutôt que directement sur des exsudats ou des tissus infectés. Ceci parce que les micro-organismes sont trop petits pour être observés de façon concluante à l'aide du microscope optique et parce qu'il est peu probable de pouvoir avoir les échantillons correspondants de tissus ou d'exsudats de témoin positif et négatif.

- a) **Épreuve d'immunofluorescence indirecte**

La technique recommandée pour l'épreuve d'IFI (31) nécessite une culture sur gélose de l'isolat à identifier, avec de nombreuses petites colonies distinctes, une culture d'une souche connue de MG ou de MS comme témoin positif, et une culture d'une autre espèce mycoplasmatique comme *M. gallinaceum* ou *M. gallinarum* comme témoin négatif. Il faut également un sérum de lapin polyclonal anti-MG ou anti-MS, un sérum de lapin normal, et un conjugué marqué par un fluorochrome anti-immunoglobuline de lapin. Les sérums peuvent être préparés chez d'autres espèces que le lapin, mais des anticorps monoclonaux (AcM) ne devraient pas être utilisés parce que MG ou MS présente une expression variable de ses épitopes de surface et un AcM risquerait de ne pas reconnaître le micro-organisme. Les dilutions appropriées du sérum anti-MG ou anti-MS et du conjugué dilués en solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS ; 0,01 M, pH 7,2) sont d'abord déterminées par titration en échiquier, et les dilutions d'emploi sont sélectionnées en prenant les dilutions de 1/2 à 1/4 inférieures aux dilutions limites réelles. Ces dilutions sont appliquées sur les colonies de mycoplasmes à identifier, qui ont auparavant été obtenues sur géloses comme indiqué plus haut.

- **Protocole**

- i) Couper des blocs de gélose portant des colonies d'environ 1,0 x 0,5 cm, les placer sur une lame de microscope marquée avec les colonies orientées vers le haut ;
- ii) Pour permettre l'orientation du bloc par la suite, couper le coin inférieur droit des blocs. Un bloc avec l'isolat inconnu, un bloc avec la culture connue de MG, un bloc avec la culture connue de MS et un bloc avec la culture d'un autre mycoplasme différent, mais connu sont placés sur une lame. Un bloc avec l'isolat inconnu est placé sur une autre lame ;
- iii) Déposer une goutte du sérum anti-MG (ou anti-MS) convenablement dilué à la surface de chaque bloc de la première lame et une goutte de sérum de lapin normal sur le seul bloc de la seconde lame ;
- iv) Incuber tous les blocs pendant 30 min à température ambiante en atmosphère humide ;
- v) Placer chaque bloc dans un tube numéroté contenant du PBS pH 7,2 et faire un lavage pendant 10 min par rotation sur un agitateur rotatif, puis laver de nouveau et déposer de nouveau les blocs sur les lames de microscope ;
- vi) Éliminer l'excès d'humidité à l'aide de matière absorbante sur le côté des blocs. Ajouter une goutte de conjugué dilué sur chacun des blocs, et incuber et laver comme précédemment ;
- vii) Déposer les blocs sur les lames et examiner les colonies à l'aide de la source incidente de lumière d'un microscope à épifluorescence.

L'interprétation des résultats est subjective et nécessite une certaine habitude ; la comparaison avec les témoins est essentielle et ceux-ci doivent donner les réactions attendues.

Certains laboratoires utilisent un antisérum conjugué à la fluorescéine pour l'épreuve d'immunofluorescence directe (IFD). Une technique qui est largement utilisée pour l'IFD est celle dans laquelle les réactifs sont appliqués successivement à l'intérieur de cylindres d'acier inoxydable placés sur la boîte de gélose avec les colonies (32). Bien que cela soit rapide et facile à réaliser, les résultats obtenus sont moins spécifiques que par la méthode indirecte, qui de ce fait est préférée.

b) Épreuve d'immunoperoxydase indirecte

Cette épreuve est basée sur un principe similaire à celui de l'IFD à ceci près que la fixation des anticorps spécifiques aux colonies *in situ* est détectée en ajoutant un conjugué anti-immunoglobulines de lapin marqué par l'enzyme peroxydase. Une réaction positive se développe ensuite lorsqu'on ajoute un substrat approprié, qui une fois oxydé, produit des colonies colorées. Une épreuve d'immuno-empreinte (ou *Immunobinding*) peut également être utilisée et consiste à appliquer les colonies à identifier sur un filtre de nitrocellulose (21) qui est ensuite traité de manière similaire. Comme pour le test d'IFI, un sérum polyclonal doit être utilisé pour sérotyper les isolats par IP. L'avantage de l'épreuve d'IP par rapport à l'épreuve d'IFI est que l'épreuve d'IP ne nécessite pas un coûteux microscope à fluorescence.

c) Épreuve d'inhibition de croissance

Dans l'épreuve d'IC, la croissance des mycoplasmes est inhibée par un antisérum spécifique, ce qui permet l'identification de l'espèce. Cette épreuve est relativement peu sensible et les sérums doivent être de titre élevé, monospécifiques, et préparés sur mammifères car les sérums de volailles n'inhibent pas toujours suffisamment la croissance des mycoplasmes. Le micro-organisme à tester doit être en culture pure (cloné), et plusieurs dilutions doivent être testées ; une concentration de 10^4 unités formant colonies (UFC/ml) est optimale. La vitesse de croissance du micro-organisme peut influencer l'inhibition de croissance et il est judicieux de retarder la croissance au départ en incubant à 27 °C pendant 24 h, puis de poursuivre ensuite l'incubation à 37 °C. Les détails de l'épreuve et de son interprétation sont publiés par ailleurs (6).

- **Méthodes de détection des acides nucléiques**

Une alternative aux méthodes conventionnelles de culture et d'identification est l'utilisation des méthodes de détection spécifique de l'ADN. MG ou MS peuvent être détectés par hybridation avec des sondes ADN spécifiques, mais il est maintenant beaucoup plus commun d'utiliser la PCR pour amplifier des fragments spécifiques de l'ADN présent dans l'échantillon. Au moins un kit de diagnostic commercial pour MG réalise une PCR sur le matériel directement extrait des écouvillons. Une société commerciale produit un kit de diagnostic qui détecte les souches de MG sauvages et un autre qui identifie la souche vaccinale F. Plusieurs épreuves « faites maison » ont également été publiées pour MG dont une PCR multiplexe qui est conçue pour détecter les quatre mycoplasmes pathogènes des volailles (34), mais qui n'a pas été validée avec des échantillons cliniques. Plusieurs méthodes sont citées par Kempf (16) et, en outre, un manuel publié par Lauerman (23) décrit un essai de PCR validé pour MG, MS et d'autres mycoplasmes de volailles, basé sur des séquences présentes dans le gène ARNr 16S. Cette méthode pour MG est présentée ci-dessous. Aux États-Unis, une PCR basée sur le gène

mgc2 de MG (12) ou sur le gène *vihA* de MS (14) est devenue d'usage fréquent, car l'identification préliminaire des souches peut être réalisée par le séquençage du produit de PCR ; il convient de rappeler que des souches sans aucune parenté peuvent partager la même séquence.

a) Isolement de l'ADN

L'ADN est extrait des écouvillons (3 à 5 qui peuvent être rassemblés), suspendus dans 1 ml de PBS (qualité PCR) dans un tube Ependorf de 1,5 ml. La suspension est centrifugée pendant 30 min à 14 000 **g** à 4 °C. Le surnageant est délicatement ôté à l'aide d'une pipette Pasteur et le culot est suspendu dans 25 µl d'eau (qualité PCR). Le tube et son contenu sont portés à ébullition pendant 10 min puis placés dans la glace pendant 10 min avant centrifugation à 14 000 **g** pendant 5 min. L'ADN est dans le surnageant.

b) Amorces

Les amorces MG possèdent les séquences suivantes :

MG-14F : 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG-13R : 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

Les amorces MS possèdent les séquences suivantes :

MS-F : 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

MS-R : 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

c) Réaction d'amplification en chaîne

Le mélange de réaction doit être préparé dans un local séparé et propre en utilisant un jeu de pipettes dédiées. Pour une réaction de PCR de 50 µl, le mélange est le suivant :

H ₂ O ultrapure	35,75 µl
Tampon de PCR × 10	5,00 µl
dNTP (10 mM)	1,00 µl
Amorce F (20 pmole/µl)	0,50 µl
Amorce R (20 pmole/µl)	0,50 µl
Taq (5 U/µl)	0,25 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,00 µl

Un volume de 45 µl du mélange est distribué dans chaque tube de PCR. Le mélange doit être recouvert de quelques gouttes d'huile minérale de faible densité sauf si le thermocycleur est équipé d'un couvercle chauffant. Les tubes sont ensuite apportés dans une autre zone propre où l'ADN de l'échantillon approprié (5 µl) est ajouté à chaque tube. Des témoins positif et négatif doivent être inclus à chaque série.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur pour les cycles suivants : 40 cycles : 94 °C pendant 30 s, 55 °C pendant 30 s, 72 °C pendant 60 s, 1 cycle (élongation finale) : 72 °C pendant 5 min et maintien à 4 °C.

d) Électrophorèse

Les produits de PCR sont détectés par électrophorèse sur gel d'agarose classique à 2 %, en incluant des marqueurs de taille appropriée, suivie d'un examen sous lumière UV. La taille du produit PCR pour MG est de 185 pb. La visualisation des produits amplifiés devrait être réalisée dans une zone séparée du laboratoire, à l'écart des autres étapes de la procédure PCR.

Les tests PCR tendent encore à être réalisés par des laboratoires spécialisés et devraient probablement être considérés comme des suppléments aux méthodes actuelles de diagnostic une fois que leur validité est fermement établie. Un grand soin doit être pris pour éviter la contamination des échantillons par l'ADN de MG ou de MS provenant de locaux voisins consacrés à l'autopsie, de salles où se réalisent des cultures ou de salles où des PCR ont déjà été effectuées à partir de prélèvements positifs (voir le Chapitre 1.1.5., « Validation et contrôle qualité des méthodes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses », pour les mesures appropriées à prendre). Cependant, le kit de diagnostic commercial mentionné plus haut est maintenant autorisé par le département de l'agriculture des États-Unis d'Amérique (USDA, *United States Department of Agriculture*) comme méthode de diagnostic et

son autorisation approuvée dans le cadre du plan national d'amélioration de l'aviculture (NPIP, *National Poultry Improvement Plan*). Il convient de souligner que les épreuves de PCR ne sont pas validées pour la détection de l'infection chez les poussins d'un jour.

Des méthodes moléculaires sont aussi disponibles pour la différenciation des souches de MG ou MS (16) mais leur usage est pour le moment restreint à des laboratoires spécialisés. Une méthode précise et rapide de « fingerprinting » de l'ADN utilise une PCR avec des amorces randomisées ou de l'ADN polymorphique amplifié (RAPD pour *random amplified polymorphic DNA*). Cette technique utilise de courtes amorces qui donnent des profils reproductibles en gels d'agarose (8). Elle est simple et rapide et s'est révélée utile pour l'identification rapide des souches de MG lors d'études épidémiologiques. Cependant, la reproductibilité peut poser problème, et il faut donc que les souches à comparer soient traitées sur le même gel. De même, l'interprétation des profils de bandes qui semblent identiques peut être difficile.

Le séquençage des gènes-cibles quand on effectue une PCR avec des amorces pour les gènes *mgc2*, *gapA*, *pvpA* et *MGA 0309* de MG constitue une méthode précise et reproductible pour typer les souches, qui devrait permettre des comparaisons entre laboratoires (9). L'identification préliminaire des souches, lors d'une PCR avec les amorces qui ciblent les gènes *mgc2* de MG et *vhA* de MS, est possible par le séquençage des produits de PCR sans que l'isolement du micro-organisme ne soit nécessaire (14, 15). Cependant, des souches non apparentées ont parfois des séquences identiques, lorsque l'on utilise ces amorces et une caractérisation supplémentaire est nécessaire.

2. Épreuves sérologiques

Les épreuves sérologiques d'usage courant peuvent manquer de spécificité et/ou de sensibilité. Leur utilisation est fortement recommandée pour la surveillance des élevages plutôt que pour tester un oiseau en particulier. Les responsables de diagnostic souhaitant utiliser ces épreuves devraient tester la sensibilité et la spécificité d'une épreuve (Chapitre 1.1.4., « Principes de validation des méthodes de diagnostic des maladies infectieuses ») dans les conditions de leur propre laboratoire. Il faut également noter que ces épreuves n'ont pas été validées pour des sérums d'oiseaux de gibier ou d'ornement d'un jour (4).

Les épreuves les plus utilisées sont les épreuves d'agglutination rapide sur lame (ARL), immuno-enzymatique (ELISA) ou d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) bien que d'autres aient été décrites telles que le radio-immuno-essai, la micro-immunofluorescence et l'épreuve d'IP. Le nombre de sérums à tester dans un troupeau dépend du niveau de détection et de l'intervalle de confiance désiré. Des minimums peuvent être requis pour le commerce international et la fréquence des épreuves peut aussi être stipulée comme dans le cadre de la directive du Conseil des Communautés Européennes 90/539/CEE. Des exigences de nombre et les épreuves approuvées ont également été établies pour les membres du NPIP aux USA.

Les compagnies avicoles qui utilisent l'ELISA pour analyser de nombreux sérums vis-à-vis des anticorps antiviraux peuvent souhaiter utiliser ces épreuves pour le dépistage des mycoplasmoses aviaires. La technologie ELISA ne sera pas décrite en détail ici parce qu'il existe de nombreux kits dans le commerce. Par contre, les détails de la méthode d'IHA sont donnés car les réactifs pour cette épreuve ne sont pas largement commercialisés.

a) Épreuve d'agglutination rapide du sérum

Les sérums sont prélevés à partir d'un échantillon du troupeau, et s'ils ne sont pas testés immédiatement, ils sont stockés à 4 °C et non congelés. L'épreuve doit être réalisée à température ambiante (20 à 25 °C) dans les 72 h suivant le prélèvement et les réactifs doivent aussi être à température ambiante. Une centrifugation préalable réduira les réactions non-spécifiques. Les réactifs pour ARL sont disponibles dans le commerce mais leur spécificité et leur sensibilité peuvent varier en fonction des fabricants et des lots. Ils doivent être conservés dans les conditions précisées par le fabricant. Des antigènes colorés pour l'ARL peuvent être préparés au laboratoire en utilisant des cultures telles que décrit dans la section B1. Elles sont ensuite colorées avec le colorant cristal violet. Les normes s'appliquant pour le contrôle de qualité des antigènes mycoplasmiens pour épreuves sérologiques sont décrites ci-dessous.

- **Protocole (1)**

- i) Déposer un volume (environ 0,02 ml) de sérum sur une plaque blanche propre ou une lame de verre puis un volume d'antigène coloré de MG ou de MS. Ne pas laisser le sérum sécher avant le dépôt de l'antigène. Il est important d'agiter vigoureusement et fréquemment le flacon d'antigène pendant l'utilisation de façon à conserver une quantité correcte d'antigène en suspension.
- ii) Utiliser une baguette pour agiter et pour étaler le mélange sur une surface circulaire d'environ 1,5 cm de diamètre. Agiter la plaque ou la lame pendant 2 min. Une agglutination est indiquée par la floculation de l'antigène dans les 2 min.
- iii) Inclure des témoins positif et négatif dans l'épreuve.

- iv) Tester de nouveau des dilutions des sérums qui agglutinent, après chauffage à 56 °C pendant 30 min. S'ils réagissent encore fortement, ils sont considérés comme positifs surtout s'ils agglutinent après dilution (au 1/4 ou plus).

Aux États-Unis, des sérums de référence positifs vis-à-vis de MG et de MS peuvent être obtenus auprès des laboratoires des services nationaux vétérinaires (NVSL, *National Veterinary Services Laboratories*) de l'USDA, et en Europe auprès de l'Afssa, site de Ploufragan¹, France. Les souches MG et MS et des sérums témoins produits sur poules et sur dindes et de différents titres peuvent être achetés. Des antisérums peuvent également être achetés au département de médecine aviaire de l'Université de Georgia (Department's of Avian Medicine) (États-Unis d'Amérique), en fonction des disponibilités.

Il n'y a pas de règle unanimement admise pour l'interprétation de ces épreuves, mais une grande proportion de sérums positifs dans un lot (10 % ou plus) indique une infection par MG, surtout en cas de confirmation par une épreuve d'IHA ou ELISA. Pour confirmation, le lot peut être testé de nouveau après un mois. Des résultats non concluants doivent entraîner la recherche de MG par culture ou la mise en évidence de son ADN. Des résultats douteux pour MG ou MS doivent susciter la réalisation d'épreuves avec l'antigène MS et vice-versa, car l'infection avec ces mycoplasmes provoque des réactions croisées.

Les épreuves peuvent être réalisées sur le vitellus comme sur le sérum bien que le vitellus doive d'abord être dilué ou extrait.

b) Épreuve d'inhibition de l'hémagglutination

MG et MS sont capables d'hémagglutiner les globules rouges de volailles et des anticorps sériques spécifiques peuvent inhiber l'hémagglutination. Une souche poussant bien et hémagglutinant de façon régulière doit être sélectionnée. L'épreuve d'IHA nécessite un antigène MG ou MS hémagglutinant correctement, des globules rouges frais et lavés de poulet ou de dinde en fonction des cas, et le sérum à tester. L'antigène peut être soit une culture fraîche soit une suspension lavée concentrée de mycoplasme dans du PBS. Il peut être difficile de maintenir un stock d'antigène de titre élevé sous forme de culture. Cependant l'utilisation d'antigène concentré (contenant en général 20 à 50 % de glycérol et conservé à -70 °C) augmente les risques de réaction non spécifiques. Aux USA, des antigènes MG et MS hémagglutinants (HA) peuvent être achetés auprès des NVSL.

L'épreuve d'IHA suit des procédures bien connues (1). Le titre hémagglutinant de l'antigène est d'abord déterminé selon des dilutions de deux en deux, l'unité hémagglutinante étant définie comme la plus petite quantité d'antigène capable de donner une hémagglutination complète dans les conditions de l'épreuve utilisée. L'épreuve d'IHA doit être réalisée avec 4 unités hémagglutinantes selon la méthode suivante ou une méthode dont la sensibilité a été démontrée équivalente à l'aide de sérums positifs connus.

Les épreuves de dosage des HA et d'IHA sont réalisées dans des plaques de plastique avec des cupules en V sous un volume constant de 50 µl. Un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif sont inclus à chaque série d'épreuve. Une rangée de 8 puits est utilisée pour chaque sérum à tester.

• Protocole

- i) Déposer 50 µl de PBS dans le premier puits de chaque rangée ;
- ii) Ajouter 8 unités hémagglutinantes sous un volume de 50 µl dans le deuxième puits de chaque rangée et 4 unités HA (UHA) sous un volume de 50 µl dans les puits 3 à 8 ;
- iii) Ajouter 50 µl d'une dilution au 1/5 du sérum à tester préalablement préparée, dans le premier puits, mélanger et transférer 50 µl dans le deuxième puits et ainsi de suite et rejeter 50 µl du dernier puits. Le premier puits sert au sérum témoin ;
- iv) Six puits sont nécessaires pour le contrôle de l'antigène. Ajouter 50 µl de PBS dans les puits 2 à 6 inclus, et ajouter 50 µl de l'antigène titrant 8 UHA dans les puits 1 et 2. Mélanger le contenu du puits 2 et transférer 50 µl au puits 3, mélanger et répéter jusqu'au puits 6 et rejeter 50 µl ;
- v) Deux puits sont nécessaires pour le contrôle des globules rouges. Ajouter 50 µl de PBS à chacun de ces puits ;
- vi) Ajouter 50 µl d'une suspension de globules rouges à 0,5 % (globules rouges de poulet pour des sérums de poulet, globules rouge de dindes pour des sérums de dindes) dans chaque puits ;
- vii) Agiter doucement la plaque pour assurer le mélange du contenu des puits, et lire après environ 50 min d'incubation à température ambiante ou quand le titre de l'antigène est 4 UHA. Pour la lecture,

1 Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) Ploufragan, Unité de mycoplasmiologie bactériologie, 22440 Ploufragan, France.

la plaque doit être inclinée et seuls les puits dans lesquels les globules rouges « descendent » (sédimentent) comme les globules rouges des puits témoins globules rouges doivent être considérés comme inhibés. Le sérum témoin doit montrer un net bouton de globules rouges et les témoins positifs et négatifs doivent être conformes. Le titre du sérum est la plus forte dilution du sérum montrant une inhibition complète de l'HA.

Les sérums donnant une hémagglutination non spécifique doivent être adsorbés pour éliminer les hémagglutinines non spécifiques de façon à ce qu'un net bouton de sédimentation des globules rouges soit visible dans le puits sans antigène HA. L'adsorption est pratiquée en incubant 1 ml de la dilution du sérum avec 6 à 8 gouttes d'une suspension de globules rouges de poulet ou de dindes lavés et concentrés. Les cellules sont éliminées après incubation à 37 °C pendant 10 min, et l'activité hémagglutinante du surnageant est testée.

Il n'y a pas de définition officielle des résultats positifs ou négatifs pour le commerce international mais le NPIP aux USA stipule que des titres de 1/80 ou plus sont considérés comme positifs et des titres de 1/40 sont fortement suspects.

c) Méthode immuno-enzymatique

Plusieurs kits de diagnostic ELISA pour la recherche des anticorps anti-MG ou anti-MS sont commercialisés. La sensibilité est déterminée dans une certaine mesure par les recommandations du fabricant pour le seuil des réactions positives ou douteuses. La sensibilité peut parfois être volontairement diminuée pour éviter les réactions croisées bien connues entre MG et MS. Un ELISA utilise un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope correspondant à un polypeptide de 56 kDa de MG (7). Dans ce système, les plaques ELISA sont sensibilisées avec un antigène cellulaire total de MG et les sérums à tester sont déposés comme dans une épreuve conventionnelle indirecte, mais la réaction est mesurée en fonction de la capacité de blocage de la fixation de l'anticorps monoclonal marqué. Un kit de diagnostic ELISA pour MS a aussi été mis sur le marché. L'avantage est que le test peut être utilisé avec des sérums de toutes espèces aviaires sans adaptation.

- **Contrôle de qualité des antigènes *Mycoplasma gallisepticum* et *M. synoviae***

- i) **Antigènes *Mycoplasma gallisepticum***

Les antigènes sont généralement préparés à partir de la souche de MG, S6 ou A5969. Des antigènes préparés à partir d'autres souches peuvent également être utilisés quand nécessaire.

*Antigène *Mycoplasma gallisepticum* pour ARL* : les méthodes de contrôle de qualité décrites ci-dessous s'appliquent uniquement à des suspensions de MG colorées avec un colorant adéquat, contenant des agents de conservation et préparées en vue d'épreuves d'agglutination rapide sur lame avec des sérums. De tels antigènes sont disponibles dans le commerce.

À l'examen microscopique, l'antigène doit paraître comme une suspension homogène sans floccules ni précipités et le liquide de suspension ne doit pas contenir de résidus de colorant. Il doit être indemne de contamination bactérienne ou fongique. Le pH doit se situer entre 6,5 et 7. Il doit être conservé à 5 ± 3 °C et être réchauffé à température ambiante avant utilisation.

La sensibilité et la spécificité de l'antigène sont déterminées selon les résultats obtenus avec des sérums positifs connus de titres élevés ou faibles et des sérums négatifs connus. Une réaction est positive quand il y a formation de flocculats colorés et éclaircissement du mélange. Les critères définis ci-dessus sont applicables jusqu'à la date de péremption définie par le fabricant.

Antigène MG pour l'épreuve d'IHA : l'épreuve est pratiquée de préférence avec des cultures fraîches en phase de croissance. L'antigène doit être indemne de contamination bactérienne ou fongique.

Antigène MG pour l'ELISA : il peut être difficile de préparer un antigène pour un test ELISA indirect sans expérimentation préalable et confirmation de sa sensibilité et spécificité. L'utilisation de kits commerciaux fiables est sans doute la meilleure stratégie pour la plupart des laboratoires de diagnostic. Certains kits sont maintenant reconnus par l'USDA et leur utilisation dans le cadre du NPIP approuvée aux USA.

- ii) **Antigène *Mycoplasma synoviae***

Des antigènes préparés à partir de la souche WVU1853 ou d'autres souches convenables peuvent être utilisés.

*Antigènes *Mycoplasma synoviae* pour l'ARL* : les spécifications décrites pour les antigènes MG pour ARL s'appliquent.

*Antigène *Mycoplasma synoviae* pour épreuves d'IHA* : les spécifications décrites pour les antigènes pour IHA MG s'appliquent.

- iii) **Autres commentaires**

Les sérums donnant des réactions non spécifiques en ARL ne donnent pas, en règle générale, de réaction positive lors d'épreuve d'IHA, si on utilise un antigène hémagglutinant frais. Des réactions positives en ARL peuvent être confirmées par une épreuve d'IHA avec des sérums prélevés après les 2 à 3 premières semaines d'infection (le temps nécessaire au développement des anticorps inhibant l'hémagglutination). Cependant l'épreuve d'IHA tend à être spécifique de souche (20) et peut donc manquer de spécificité. L'ELISA peut être une alternative intéressante.

Les échantillons de sérums ne doivent pas être congelés avant utilisation pour l'ARL. Ils ne doivent pas être hémolysés ni contaminés pour éviter les réactions non spécifiques. L'utilisation de vaccins inactivés pour d'autres maladies peut donner des réactions non spécifiques. Les échantillons doivent être testés aussi vite que possible (dans les 72 h) parce que les anticorps anti-mycoplasmiques peuvent se dégrader lors du stockage. Les sérums peuvent être inactivés par chauffage dans un bain-marie à 56°C pendant 30 min.

C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE

La meilleure méthode de contrôle est le maintien de troupeaux indemnes de MG et de MS. La vaccination ne doit être envisagée que dans les situations dans lesquelles l'exposition est inévitable comme dans des sites multi-âges. Le risque d'exposition des troupeaux de volailles voisins doit aussi être soigneusement considéré.

Deux types de vaccins sont disponibles pour le contrôle de MG. Il peut s'agir de vaccins vivants atténués ou avirulents ou de vaccins inactivés sous forme d'émulsion huileuse. Le sujet de la vaccination par MG a été revu par Whihear (35). Bien qu'il y ait des variations antigéniques entre les souches de MG, il est admis que la vaccination avec une seule souche est suffisante.

Les lignes directrices pour la production de vaccins vétérinaires sont données dans le Chapitre 1.1.8., « Principes de fabrication des vaccins à usage vétérinaire ». Les lignes directrices données ici et dans le Chapitre 1.1.8. sont d'ordre général et peuvent être complétées par des exigences nationales ou régionales.

• Vaccins vivants : méthode d'utilisation

L'utilisation de vaccins vivants est l'équivalent d'une « exposition contrôlée ». L'objectif est d'infecter le troupeau avec une souche peu pathogène et immunogène à un âge auquel les conséquences seront faibles ou non significatives. Une telle exposition provoque un futur état de résistance au cours de la vie des oiseaux comme dans le cas de sites de production multi-âges. Les oiseaux correctement vaccinés sont résistants à la maladie respiratoire, aux aérosacculites et à la chute de ponte causées par MG. La vaccination permet aussi de réduire le niveau de transmission verticale chez les reproducteurs.

La souche MG F a été la souche vaccinale la plus utilisée (5). C'est une souche naturelle de virulence faible à modérée pour le poulet mais virulente pour la dinde. Ordinairement, elle diffuse lentement d'oiseau à oiseau. L'administration à des poulets en bonne santé par voie respiratoire haute ne provoque que peu ou pas de symptôme respiratoire. Cependant lors d'administration par aérosol ou en présence d'autres agents responsables de maladies respiratoires, tels que les virus de la maladie de Newcastle ou de la bronchite infectieuse aviaire, des signes respiratoires ou des aérosacculites peuvent survenir. Les oiseaux vaccinés sont des porteurs chroniques et une seule dose suffit. L'utilisation de la souche vaccinale F dans chaque nouveau lot dans un site multi-âge va finalement provoquer le remplacement de la souche sauvage par la souche vaccinale. Les souches ts-11 et 6/85 ne sont pas virulentes et ne diffusent pas vers les oiseaux non vaccinés, sauf éventuellement de façon limitée vers des oiseaux en contact étroit (25).

Les poulettes commerciales sont vaccinées en règle générale entre 12 et 16 semaines mais la vaccination d'oiseaux plus jeunes ou plus âgés est permise. Il est essentiel de vacciner avant que le lot ne soit infecté naturellement. En cas de risque d'infection pour des jeunes, il est possible de vacciner dès 2 à 4 semaines. Pour la souche F une vaccination par voie intranasale ou par instillation oculaire est préférable. En cas d'administration par l'eau de boisson, certains oiseaux risquent de ne pas être vaccinés, si la procédure d'administration n'est pas rigoureuse. L'administration par nébulisation doit également être effectuée avec soin, de façon à ce que tous les oiseaux soient exposés. Une réaction respiratoire peut être attendue environ 5 à 7 jours après vaccination par aérosol. Les lots vaccinés doivent être contrôlés par agglutination rapide sur lame environ 3 à 4 semaines après la vaccination pour s'assurer que tous les oiseaux ont été correctement infectés. Il est souhaitable de vacciner les oiseaux à un âge auquel il n'y a pas de réaction vis-à-vis des autres vaccins respiratoires. La souche ts-11 doit être administrée par instillation oculaire et la souche 6/85 par fin aérosol. La vaccination avec la souche ts-11 provoque une réaction sérologique faible, mais significative observée par agglutination rapide sur lame, IHA ou ELISA alors que la souche 6/85 n'induit pas de réponse sérologique. Aucune réaction vaccinale ne doit être observée avec les souches 6/85 ou ts-11. Les lots vaccinés avec la

souche F ou la souche ts-11 sont positifs en culture pendant toute leur vie alors que la souche 6/85 peut être difficile à réisoler après plus de 4-6 semaines après vaccination.

Les vaccins commerciaux vivants doivent être utilisés dans les 1 à 2 h qui suivent la reconstitution. Les vaccins lyophilisés doivent être conservés à 4 °C. Certains fabricants fournissent un vaccin congelé. Ces vaccins doivent être conservés dans l'azote liquide ou la neige carbonique, à –70 °C ou à une température inférieure. Les vaccins MG vivants ne sont pas stables pendant de longues périodes dans un réfrigérateur ordinaire. Un stockage de plus de quelques jours à –20 °C doit être évité.

L'innocuité des souches 6/85 et ts-11 est meilleure que celle de la souche F mais leur niveau de protection est plutôt inférieur ; elles peuvent être utilisées soit comme première vaccination dans un site multi-âges soit comme deuxième génération de vaccin sur un site précédemment vacciné avec la souche F. Elles peuvent également être préférées dans les cas de risque d'exposition accidentelle de troupeaux avoisinants. La souche F « déplace » les souches sauvages de MG plus efficacement que les souches ts-11 ou 6/85, mais la souche ts-11 a été utilisée pour éradiquer la souche F de site de ponte d'âges multiples (33). Dans les sites multi-âges où la souche 6/85 est couramment utilisée, les réactions sérologiques vis-à-vis de MG sont souvent négatives suggérant que la souche sauvage a été remplacée.

Les vaccins vivants ont également été utilisés dans certains pays pour vacciner les poulettes reproductrices de type chair. En Australie, le vaccin ts-11 est largement utilisé pour la vaccination des poulettes futures reproductrices type chair comme pour celle des poules pondeuses. La souche vaccinale F a été utilisée pour les poulettes futures reproductrices type chair élevées sur des sites d'âges multiples dans certains pays d'Amérique Latine pendant plusieurs années ; plus récemment les souches 6/85 et ts-11 ont été employées de façon limitée. Selon ce qui est rapporté et l'expérience personnelle concernant les performances des reproducteurs et les troubles respiratoires de leurs progénitures, il semble que ces vaccins aient été utiles et efficaces lorsqu'ils étaient bien administrés. La souche vaccinale 6/85 a été employée de façon limitée comme vaccin pour les dindes de production aux États-Unis d'Amérique mais il n'y a pas de données satisfaisantes sur son efficacité. En règle générale, la vaccination des dindes avec des vaccins vivants n'est pas recommandée et la vaccination des poulets de chair avec soit des vaccins vivants soit des vaccins inactivés n'est pas efficace. Aucun vaccin n'a été validé pour l'usage pour les oiseaux sauvages.

Un vaccin vivant contre l'infection par MS est disponible dans certains pays pour usage sur les poulets de chair et les poules pondeuses. Il est produit à partir d'un mutant froid, MS-H (29). Ses caractéristiques et ses modalités d'utilisation sont semblables à celles du vaccin ts-11 contre l'infection par MG.

• **Vaccins inactivés : méthode d'utilisation**

Les bactérines MG sont préparées à partir de suspensions concentrées de cellules entières qui sont émulsifiées avec un adjuvant huileux. Une forte concentration antigénique est indispensable.

Les bactérines sont généralement utilisées chez les poulettes commerciales pour les protéger des chutes de ponte qui surviennent dans les sites d'âges multiples (13). Elles peuvent également être utilisées chez les futures reproductrices pour réduire le niveau de transmission verticale. L'utilisation des bactérines chez le poulet de chair est limitée par le fait que les oiseaux vaccinés avant 1 à 2 semaines d'âge ne sont pas protégés. Bien que les bactérines puissent protéger vis-à-vis des signes respiratoires, de l'aérosacculite et des chutes de ponte, les lots vaccinés demeurent infectés. La durée de l'immunité n'est pas connue, mais la plupart des lots sont exposés 1 à 2 mois après vaccination.

L'administration se fait par voie intramusculaire ou sous-cutanée, avec en général une dose de 0,5 ml par oiseau. La vaccination par voie intramusculaire risque d'entraîner une réaction persistante au lieu d'injection ce qui nécessitera un parement de la carcasse ; aussi une administration par voie sous-cutanée dans le haut de la partie dorsale du cou est la voie la plus utilisée. Deux doses sont préférables mais des considérations de coût et de main d'œuvre peuvent dicter la réalisation d'une seule administration, en règle générale vers 16 à 18 semaines pour des poulettes commerciales. Une seringue multi-dose peut être employée. Tous les matériels doivent être nettoyés et stérilisés entre chaque lot et les équipes de vaccination doivent respecter les mesures de biosécurité quand elles opèrent sur plusieurs lots. Le vaccin doit être conservé à 2-8 °C jusqu'à utilisation. Il ne doit pas être congelé ni être exposé à une forte lumière.

Une bactérine semblable a obtenu l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis, mais son utilisation reste limitée.

1. Gestion des semences bactériennes

a) Caractéristiques de la semence bactérienne

- **Vaccins vivants**

La souche vaccinale doit être immunogène, doit coloniser facilement l'appareil respiratoire supérieur et causer un minimum de lésions de l'appareil respiratoire. Une forte réponse en anticorps n'est pas forcément corrélée avec l'immunité.

La semence primaire doit être indemne de tout autre agent. La culture doit être clonée pour s'assurer de sa pureté. Si nécessaire les profils de restriction de l'ADN mycoplasmique doivent être analysés par électrophorèse sur gel d'agarose pour s'assurer de l'identité et de la pureté de la souche.

La culture primaire doit être stable et ne pas avoir tendance à recouvrer sa virulence. Ceci peut être confirmé par 10 passages successifs sur poulets sensibles. Des poulets « contacts » peuvent être introduits chaque semaine. Si nécessaire des écouvillonnages peuvent être réalisés sur les oiseaux infectés, puis les écouvillons sont insérés dans la trachée des poulets « contacts ». La transmission du micro-organisme doit être prouvée. L'isolat ainsi obtenu peut ensuite être utilisé pour tester des poulets sensibles.

- **Vaccins inactivés**

Pour les vaccins inactivés, les caractéristiques les plus importantes sont un bon rendement et un fort pouvoir antigénique. Il est supposé mais non prouvé que les souches virulentes sont préférables. La semence primaire doit être indemne de tout autre micro-organisme.

b) Méthode de culture

La culture primaire peut êtreensemencée dans un milieu semblable à celui décrit plus haut (section B.1). Pour les vaccins vivants, le milieu de culture est lyophilisé ou surgelé à une température inférieure ou égale à -70°C . Pour les bactérines, la culture doit être concentrée et resuspendue dans un petit volume de solution saline ou de PBS avant la préparation de l'émulsion.

c) Validation de la semence candidate comme semence vaccinale

Des données d'efficacité doivent être obtenues avant de lancer la préparation de vaccins en fermenteur. Des poulets doivent être vaccinés selon la voie qui sera utilisée sur le terrain. Les oiseaux vaccinés doivent être testés et le niveau de protection vis-à-vis des symptômes respiratoires, d'un écoulement nasal et ou de l'aérosacculite doit être déterminé. Dans l'absolu, il faudrait également évaluer la protection vis-à-vis des pertes de production d'œufs mais de tels essais sont coûteux et lourds.

Test d'efficacité : des groupes de 20 poulets exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) ou au moins indemnes de mycoplasmes, âgés d'au moins 2 semaines, sont vaccinés par instillation oculaire ou une autre voie d'administration avec une dose d'un vaccin vivant ou par voie sous-cutanée ou intramusculaire avec une dose (en général 0,5 ml) de bactérines. Un groupe identique de poulets non vaccinés est maintenu séparément et sert de témoin. Tous les poulets doivent être testés avec une culture de 24 h d'une souche virulente de MG, 2 à 3 semaines après vaccination. Une méthode d'épreuve simple consiste à inoculer 0,1 ml de la culture d'épreuve dans le sac aérien thoracique postérieur. Tous les oiseaux sont autopsiés 7 à 10 jours après épreuve et les lésions des sacs aériens sont notées. Une méthode alternative consiste à inoculer 0,1 ml dans le sinus infra-orbitaire et à examiner les oiseaux pour rechercher un écoulement nasal 7 à 14 jours après épreuve ou à tester par aérosol et mesurer l'épaisseur de la muqueuse trachéale sur des coupes microscopiques en 4 ou 6 points équidistants prédéterminés (35).

2. Méthode de fabrication

Le vaccin doit être préparé dans des locaux appropriés, propres et sécurisés, bien séparés des locaux réservés au diagnostic ou aux volailles commerciales. Une attention particulière doit être portée pour éviter la contamination par MG des autres produits préparés dans les mêmes locaux.

La production vaccinale doit être faite par lot de semence, en utilisant une souche convenable de MG, d'origine, de nombre de passages, et de pureté connus. Le milieu de culture est comparable à celui décrit plus haut. Le sérum utilisé pour le milieu de culture doit être inactivé par chauffage à 56°C pendant 1 h pour éviter les contaminations par d'autres mycoplasmes éventuellement présents, puis stérilisé par filtration. Un sérum issu d'animaux EOPS est recommandé.

Le milieu de culture est inoculé avec un inoculum à croissance rapide, à un niveau d'environ 5 % (v/v). L'incubation est conduite à 37 °C. La production peut être faite en lots en utilisant de larges flacons ou dans un fermenteur. Lors de la production, la récolte est réalisée environ 24 h après inoculation. Les vaccins vivants sont conservés par lyophilisation ou surgélation à -70 °C, dans l'azote liquide ou la neige carbonique.

Pour la production de bactérines, l'antigène doit être concentré, en général par centrifugation ultrafiltration ou tout autre méthode convenable. Les bactérines sont préparées sous forme d'émulsion eau-dans-huile, généralement 80 % d'huile minérale et 20 % d'eau avec des agents émulsifiants appropriés.

3. Contrôles en cours de fabrication

Contenu antigénique : lors de la récolte, le titre devrait être entre 10^8 et 10^9 UFC/ml. La concentration antigénique des bactérines est difficile à normaliser mais peut être basée sur le volume des cellules après centrifugation qui est typiquement de 1 % (v/v) de cellules après centrifugation dans le produit final.

Inactivation des vaccins tués : l'inactivation est souvent faite à l'aide de bêta-propiolactone ou du formol. L'agent d'inactivation et la procédure d'inactivation doivent avoir montré, dans les conditions de préparation du vaccin, leur capacité à inactiver la souche vaccinale et de potentiels contaminants.

Avant inactivation, l'attention doit être portée à l'obtention d'une suspension homogène, sans particules qui risquent de ne pas être pénétrées par l'agent d'inactivation. Un test d'inactivation doit être conduit par mise en culture dans un milieu pour mycoplasmes de chaque lot récolté après inactivation, et du produit final. Il ne doit être observé aucune culture de mycoplasmes.

Stérilité des vaccins tués : l'huile utilisée pour le vaccin doit être stérilisée par chauffage à 160 °C pendant 1 h, ou par filtration, et la preuve de l'efficacité du procédé doit être démontrée. Les tests appropriés aux vaccins huileux sont effectués sur chaque lot de produit final, comme décrit par exemple dans la Pharmacopée britannique (Vétérinaire) 1985.

4. Contrôles des lots

a) Stérilité

Les tests de contrôle de stérilité et d'absence de contaminants biologiques peuvent être trouvés dans le Chapitre 1.1.9., « Contrôle de la stérilité ou de l'absence de contamination des matériels biologiques ».

b) Innocuité

- **Test d'innocuité pour les vaccins vivants**

Les oiseaux utilisés dans le test d'efficacité décrit plus haut peuvent être utilisés pour évaluer l'innocuité du vaccin.

- **Test d'innocuité des vaccins inactivés**

Les oiseaux utilisés dans le test d'efficacité décrit plus haut doivent faire l'objet d'une observation pour la mise en évidence de réactions locales ou générales.

c) Activité

Les tests d'activité des vaccins vivants ou inactivés peuvent être conduits selon les procédures décrites plus haut pour les tests d'efficacité. Le titre des vaccins vivants doit être suffisant pour induire une infection selon la voie d'administration recommandée ; 10^5 UFC par dose est suffisant pour une administration par voie oculaire pour la souche vaccinale F. La dose recommandée pour la souche vaccinale ts-11 est supérieure à $10^{7,7}$ unités changeant la couleur (UCC)/dose et pour la souche 6/85 une dose de 10^7 à 10^8 UFC était efficace lors des expérimentations. Pour la souche MS-H, des doses supérieures ou égales à $4,8 \times 10^5$ se sont révélées efficaces.

d) Durée de l'immunité (vaccins inactivés)

Les volailles étant généralement exposées dans les 1 à 2 mois après vaccination, la durée de l'immunité n'est pas une considération primordiale. Après une exposition naturelle, la résistance est considérée permanente.

e) Stabilité

Il doit être prouvé sur 3 lots de vaccin que le vaccin satisfait au test d'activité 3 mois après la date limite d'utilisation.

f) Agents de conservation

Un agent de conservation est généralement nécessaire dans les flacons multidoses. La concentration de l'agent de conservation dans le vaccin final et sa persistance jusqu'à la date limite d'utilisation doivent être contrôlées.

Un agent de conservation convenable qui a déjà été évalué dans des circonstances identiques doit être utilisé. Les mycoplasmes sont sensibles à de nombreux antimicrobiens à l'exception des pénicillines ; ces antibiotiques ne doivent pas être utilisés comme agents de conservation.

g) Précautions d'emploi et mise en garde

Les vaccins sous forme d'émulsions huileuses provoquent des blessures graves lors d'injections accidentelles dans la main ou d'autres tissus. En cas d'un tel accident, la personne doit se rendre immédiatement à l'hôpital, en emportant l'emballage du flacon de vaccin avec elle. Chaque flacon de vaccin et chaque emballage doivent comporter une indication claire mettant en garde contre les conséquences graves d'auto-injection accidentelle. De telles blessures doivent être traitées par le médecin urgentiste comme des blessures par arme à feu.

Les personnes vaccinant des oiseaux par nébulisation avec des vaccins à virus vivants doivent porter des vêtements protecteurs et des masques.

5. Contrôles du produit fini

a) Innocuité

Voir section C.4.b.

b) Activité

Voir section C.4.c.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLAN W.H. & GOUGH R.E. (1974). A standard haemagglutination test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.*, **95**, 120–123.
2. ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE (APHIS), USDA (2004). National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. APHIS Publication 91-55-063. APHIS, USDA, Riverdale, Maryland, USA, 97–100.
3. BRADBURY J.M. (2001). Avian mycoplasmas. *In: Poultry Diseases, Fifth Edition*, Jordan F., Pattison M., Alexander D. & Faragher T., eds. W.B. Saunders, London, UK, 178–193.
4. BRADBURY J.M. (2005). Workshop of European Mycoplasma Specialists. *World Poult. Sci. J.*, **61**, 355–357.
5. CARPENTER T.E., MALLINSON E.T., MILLER K.F., GENTRY R.F. & SCHWARTZ L.D. (1981). Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.*, **25**, 404–409.
6. CLYDE W.A., JR. (1983). Growth inhibition tests. *In: Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405–410.
7. CZIFRA G., SUNDQUIST B., TUBOLY T. & STIPKOVITS L. (1993). Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian Dis.*, **37**, 680–688.
8. FAN H.H., KLEVEN S.H. & JACKWOOD M.W. (1995). Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.*, **39**, 729–735.

9. FERGUSON N.M., HEPP D., SUN S., IKUTA N., LEVISOHN S., KLEVEN S.H. & GARCÍA M. (2005). Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies *Microbiol.*, **151**, 1883–1893.
10. FREUNDT E.A. (1983). Culture media for classic mycoplasmas. *In: The Mycoplasmas*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA and London, UK, 127–135.
11. FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 2163–2171.
12. GARCÍA M., IKUTA N., LEVISOHN S. & KLEVEN S.H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.*, **49**, 125–132.
13. HILDEBRAND D.G., PAGE D.E. & BERG J.R. (1983). *Mycoplasma gallisepticum* (MG) — laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. *Avian Dis.*, **27**, 792–802.
14. HONG Y., GARCÍA M., LEITING L., BENCINA D., DUFOUR-ZAVALA L., ZAVALA G. & KLEVEN S.H. (2004). Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis.*, **48**, 606–616.
15. HONG Y., GARCIA M., LEVISOHN S., SAVELKOUL P., LEITING V., LYSNYANSKY I., LEY D.H. & KLEVEN S.H. (2005). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Dis.*, **49**, 43–49.
16. KEMPF I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol.*, **27**, 7–14.
17. KLEVEN S.H. (2003). *Mycoplasma synoviae* infection. *In: Diseases of Poultry*, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 756–766.
18. KLEVEN S.H., FLETCHER O.J. & DAVIS R.B. (1973). Variation of pathogenicity of isolates of *Mycoplasma synoviae* with respect to development of airsacculitis and synovitis in broilers. *Am. J. Vet. Res.*, **163**, 1196–1196.
19. KLEVEN S.H., KING D.D. & ANDERSON D.P. (1972). Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis.*, **16**, 915–924.
20. KLEVEN S.H., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1988). Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.*, **32**, 731–741.
21. KOTANI H. & MCGARRITY G.J. (1985). Rapid and simple identification of Mycoplasmas by immunobinding. *J. Immunol. Methods*, **85**, 257–267.
22. LANDMAN W.J.M. & FEBERWEE A. (2004). Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol.*, **33**, 591–598.
23. LAUERMAN L.H. (1998). Mycoplasma PCR Assays. *In: Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases*, Lauerman L.H., ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, 41–52.
24. LEY D.H. (2003). *Mycoplasma gallisepticum* infection. *In: Diseases of Poultry*, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 722–744.
25. LEY D.H., MCLAREN J.M., MILES A.M., BARNES H.J., MILLER S.H. & FRANZ G. (1997). Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.*, **41**, 187–194.
26. LOCKABY S.B., HOERR F.J., LAUERMAN L.H., SMITH B.F., SAMOYLOV A.M., TOIVIO-KINNUNAN M.A. & KLEVEN S.H. (1999). Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.*, **43**, 251–261.

27. LUTTRELL M.P., FISCHER J.R., STALLKNECHT D.E. & KLEVEN S.H. (1996). Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian Dis.*, **40**, 335–341.
28. MALLINSON E.T., ECKROADE R.J. & KLEVEN S.H. (1981). *In vivo* bioassay and supplemental serologic techniques for the detection of *Mycoplasma* in suspect breeding chickens. *Avian Dis.*, **25**, 1077–1082.
29. MARKHAM J.F., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1998). Efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Dis.*, **42**, 671–676.
30. MAROIS C., DUFOUR-GESBERT F. & KEMPF I. (2002). Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.*, **31**, 163–168.
31. ROSENDAL S. & BLACK F.T. (1972). Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]*, **80**, 615–622.
32. TALKINGTON F.D. & KLEVEN S.H. (1983). A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. *Avian Dis.*, **27**, 422–429.
33. TURNER K.S. & KLEVEN S.H. (1998). Eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.*, **42**, 404–407.
34. WANG H., FADL A.A. & KHAN M.I. (1997). Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. *Molec. Cell. Probes*, **11**, 211–216.
35. WHITHEAR K.G. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 1527–1553.
36. ZAIN M.Z. & BRADBURY J.M. (1996). Optimising the conditions for isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on applicator swabs. *Vet. Microbiol.*, **49**, 45–57.

*
* *

NB: Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la mycoplasmosse aviaire (*Mycoplasma gallisepticum* et *M. synoviae*) (se reporter à la liste de la partie 4 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : <http://www.oie.int/fr/expertise-scientifique/laboratoires-de-reference/liste-de-laboratoires/>).
Veuillez contacter les laboratoires de référence de l'OIE pour plus d'informations sur les tests de diagnostic et réactifs pour la mycoplasmosse aviaire

NB: ADOPTÉE POUR LA PREMIÈRE FOIS EN 1991 COMME MYCOPLASMOSE (*MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*) ;
MIS À JOUR LA PLUS RÉCENTES ADOPTÉE EN 2008.