



Rapport annuel d'activité, année 2023

Laboratoire National de Référence

Mycoplasmoses aviaires

Nom du responsable du LNR

Anne BOUCHARDON

Nom du laboratoire où l'activité du LNR est mise en œuvre

Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort -- site de Ploufragan

Nom de l'unité où l'activité du LNR est mise en œuvre

Unité Mycoplasmodologie, Bactériologie et Antibiorésistance

Dangers sanitaires tels que définis par l'article L.201-1 du code rural et de la pêche maritime couverts par le mandat

Mycoplasma gallisepticum chez la poule et la dinde, et *Mycoplasma meleagridis* chez la dinde, sont des maladies réglementées qui font l'objet de mesures de contrôle (dépistage et suivi obligatoire des élevages de sélection et de reproduction : DGAL/SDSPA/N2000-8059 et 8060) nécessitant le support d'un LNR. Ces mycoplasmes aviaires sont également inscrits sur la liste de l'OMSA (ex OIE). Elles n'apparaissent pas dans l'arrêté modifié du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et de deuxième catégorie pour les espèces animales. Elles sont cependant classées D/E (obligation de déclaration, de surveillance et de certification) dans la gestion des maladies animales de la nouvelle loi européenne de santé animale (règlement UE 2016/429).

Les faits marquants de l'année

Le nombre d'analyses réalisées au cours de l'année 2023 est restée stable par rapport à l'année 2022 mais a augmenté par rapport aux trois années précédentes. Cette augmentation est, en partie, due à des envois plus fréquents de souches de mycoplasmes (sous forme de bouillons ou de géloses) par des laboratoires d'analyses vétérinaires pour identification de souches (notamment avec le développement de l'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF) et/ou mise en souchothèque au LNR. Mais cette augmentation est également liée à une étude ciblée réalisée à partir de 300 prélèvements provenant de dix élevages de poules pondeuses et de cinq élevages de dindes de la région de Sfax (Tunisie), dans la cadre de l'encadrement d'une étudiante en thèse sur les mycoplasmoses aviaires en Tunisie. Cette étude a conduit à l'isolement de nombreuses souches de *Mycoplasma gallinarum*, *M. pullorum* et *M. gallinaceum*. Le LNR a entamé au cours de l'année 2023 une démarche de redémarrage de souches très anciennes conservées en souchothèque : l'identification de ces souches, pour la plupart isolées avant 2000, était basée sur des caractères biochimiques et n'a pas été réalisée avec des techniques désormais disponibles et de meilleure spécificité, telles que la PCR ou la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Enfin, le LNR est parvenu à isoler des souches de différentes espèces de mycoplasmes à partir d'un prélèvement effectué sur un aigle royal.

Abréviations

ARL : agglutination rapide sur lame

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

PCR : polymerase chain reaction

MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption/ionisation – time of flight

MG : *Mycoplasma (M.) gallisepticum*

MS : *Mycoplasma (M.) synoviae*

MM : *Mycoplasma (M.) meleagridis*

MI : *Mycoplasma (M.) iowae*

1. Méthodes développées ou révisées

Activités relatives au développement de méthodes

Pas de développement méthodologique

Nombre de méthodes développées ou révisées, prêtes à être mises en œuvre

0 méthode(s)

Nombre total de méthodes transférées par le LNR à son réseau dans l'année

0 méthode(s)

2. Matériels biologiques ou chimiques, échantillons et souches d'intérêt

Information disponible auprès du LNR.

3. Activités d'analyse

3.1 Analyses officielles de première intention

Nombre d'analyses officielles de première intention réalisées dans l'année

0 analyse(s)

Détail par type d'analyse de première intention

Le LNR n'a pas effectué d'analyses de première intention au cours des cinq dernières années.

3.2 Analyses officielles de confirmation

Nombre d'analyses officielles de seconde intention réalisées dans l'année

0 analyse(s)

Détail par type d'analyse de confirmation

Pas d'analyse de ce type en 2023. Le LNR a effectué deux analyses de ce type en 2022.

3.3 Autres analyses

Nombre estimé d'autres analyses (non officielles) réalisées dans l'année en lien avec le mandat de LNR

14991 analyse(s)

Détail par type d'autres analyses

Le LNR effectue essentiellement des diagnostics de première intention pour le suivi sanitaire des troupeaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS) (poules et dindes) ou conventionnels (poules) du Laboratoire de Ploufragan : en tout, 6220 agglutinations rapides sur lame (ARL) et 80 analyses par ELISA ont été réalisées en 2023 pour ces troupeaux. Ces chiffres sont restés relativement stables sur les cinq dernières années. Dans le cadre de la production et de la distribution de sérums de référence pour la technique ARL, 2438 ARL et 200 ELISA ont été réalisées (contrôles lors de la production du nouveau sérum et contrôles des sérums disponibles à la vente). Enfin, 363 prélèvements non liés au suivi des troupeaux EOPS ont été reçus et ont donné lieu à 6053 analyses de première intention (mise en culture et PCR, ARL ou ELISA en fonction des prélèvements) au cours de l'année 2023. Ces chiffres sont restés relativement stables par rapport aux deux dernières années. Ils incluent des analyses effectuées à partir de 300 prélèvements provenant de 10 élevages de poules pondeuses et 5 élevages de dindes de la région de Sfax (Tunisie), dans la cadre de l'encadrement d'une étudiante en thèse sur les mycoplasmoses aviaires en Tunisie. Des essais d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (collaboration avec le Laboce22) ont également été réalisés au cours de l'année 2023 pour différentes cultures pour lesquelles un changement de couleur a été observé (activité métabolique des mycoplasmes), des clones et des souches. Ces analyses (581 en tout, 332 sans les analyses effectuées dans le cadre de la thèse Tunisienne) sont incluses dans le total ci-dessus car le LNR prépare la cible avec les échantillons, mais les lectures/analyses sont effectuées dans les locaux du Laboce22. Le nombre d'analyses effectuées par spectrométrie de masse sont en augmentation constante ces cinq dernières années car cette technique permet une identification rapide et fiable de différentes espèces de mycoplasmes aviaires (ou de mélanges d'espèces dans les cultures) non reconnues par les tests classiques de PCR développés uniquement vis-à-vis des quatre espèces reconnues les plus pathogènes pour les poules et les dindes. Les spectres de référence développés par le LNR lors des dernières années permettent maintenant d'identifier la très grande majorité des espèces de mycoplasmes aviaires par spectrométrie de masse dès lors qu'ils se multiplient in

vitro : *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis*, *M. pullorum*, *M. glycyphilum*, *M. gallinaceum*, *M. anatis*, *M. columborale*, *M. iners*, *M. gallinarum*, *M. gallopavonis*, *M. columbinasale*, *M. columbinum*, *M. cloacale*, *M. anseris*, *Acholeplasma (A.) axanthum* et *A. Laidlawii*. Enfin, des essais de comparaison de différents kits ELISA commerciaux pour la détection d'anticorps anti-MM ont été réalisés afin de choisir plus particulièrement un kit à utiliser dans le cadre des analyses réalisées par le LNR. Ces essais, réalisés à partir de sérums récoltés au cours de différentes cinétiques de production de sérums de référence chez des dindes ces dernières années, ont représenté 838 analyses ELISA en tout.

3.4 Essais interlaboratoires d'aptitude auxquels le LNR a participé dans l'année **Détail des essais interlaboratoires d'aptitude (EILA) auxquels le LNR a participé dans l'année, dans le cadre : National; UE (en particulier les EILA organisés par le LRUE); International**

Pour la technique ARL, un EILA européen est organisé par le laboratoire Royal GD B.V. Animal Health (Deventer, Pays-Bas) tous les ans. Le LNR y participe pour la détection des anticorps dirigés contre *M. gallisepticum* et *M. synoviae* dans les sérums de poules par les techniques ARL et ELISA.

4. Activités de production et de contrôle de matériaux de référence et de réactifs biologiques

Le LNR produit des réactifs à usage du LNR uniquement

Non

Le LNR produit des réactifs à usage du LNR et du réseau

Non

Le LNR produit des matériaux de référence à usage du LNR uniquement

Non

Le LNR produit des matériaux de référence à usage du LNR et du réseau

Oui

Types de matériaux de référence produits et fournis (MRE, MRI, contrôle positif ou négatif, autre)

Mycoplasma gallisepticum chez la poule et la dinde, et *M. meleagridis* chez la dinde, sont des maladies qui font l'objet de mesures de contrôle. Le LNR fournit des sérums de référence (positifs et négatifs) pour la méthode ARL, norme NF U47-012. Il fournit également des sérums de poules et de dindes positifs vis-à-vis de *M. synoviae*, maladie non réglementée, mais qui entraîne des pertes importantes dans les élevages avicoles.

Format (sérum, souche, produit chimique, autre) de ces matériaux de référence

Le LNR fournit :

- Des sérums de poules ou de dindes EOPS (contrôles négatifs pour la méthode ARL) ;
- Des sérums de poules positifs pour *M. gallisepticum* ou *M. synoviae* (contrôles positifs pour la méthode ARL) ;
- Des sérums de dindes positifs pour *M. gallisepticum*, *M. synoviae* ou *M. meleagridis* (contrôles positifs pour la méthode ARL).

Ces sérums sont utilisés en interne au LNR, mais sont également vendus aux laboratoires d'analyses effectuant des ARL vis-à-vis des mycoplasmoses aviaires. Ces sérums sont vendus sous forme lyophilisée, en flacons de 1 mL.

Nombre de lots produits dans l'année

Un nouveau lot de sérum de poule positif vis-à-vis de *M. synoviae* (962 mL) a été produit au cours de l'année 2023. Deux séries de lyophilisations ont été effectuées en 2023 pour reconstituer les stocks de flacons des différents sérums (positifs ou négatifs, de poules ou de dindes). En tout, 119 flacons ont été lyophilisés.

Nombre d'unités distribuées au plan national

Quantités de sérums vendus au cours de l'année 2023 (flacons de 1 mL) :

- Sérum de poule positif vis-à-vis de *M. synoviae* : 120 flacons ;
- Sérum de poule positif vis-à-vis de *M. gallisepticum* : 120 flacons ;
- Sérum de dinde positif vis-à-vis de *M. synoviae* : 15 flacons ;
- Sérum de dinde positif vis-à-vis de *M. gallisepticum* : 26 flacons ;
- Sérum de dinde positif vis-à-vis de *M. meleagridis* : 67 flacons ;
- Sérum de dinde négatif : 1 flacons ; - Sérum de poule négatif : 46 flacons.

Analyse de l'évolution (augmentation, diminution) de l'activité sur les 5 dernières années

Cette activité a légèrement diminué en 2020 et 2021 par rapport à 2019. Une légère augmentation a été observée en 2022, essentiellement due à une augmentation des ventes de sérums de dindes. La légère diminution observée en 2020 et 2021 pourrait être due, en partie, à la crise sanitaire due au SARS-Cov2 et à des problèmes récurrents de fourniture en antigènes nécessaires à la réalisation des tests ARL pour lesquels ces sérums servent de contrôles positifs et négatifs. En effet, le seul fournisseur de ces antigènes au niveau Européen, CEVA Biovac, a rencontré des problèmes de production au cours de ces quatre dernières années, entraînant des ruptures de stock d'antigènes dans différents laboratoires français et européens. Pour pallier ces problèmes d'approvisionnement et pouvoir continuer à effectuer des analyses ARL, le LNR a pris contact, commandé et testé des antigènes de l'entreprise Charles River, basée aux USA. Ils sont maintenant couramment utilisés depuis 2021 pour les analyses ARL au sein du LNR, en complément ou en remplacement des antigènes CEVA Biovac. Le nombre de sérums vendus en 2023 a augmenté par rapport à 2022 (395 contre 325), essentiellement pour les sérums de poules positifs vis-à-vis de *M. gallisepticum* et *M. synoviae*, et pour les sérums de dindes positifs vis-à-vis de *M. meleagridis*.

Le LNR réalise des contrôles de réactifs commerciaux

Oui

Modalités de contrôle (contrôles initiaux, contrôles aléatoires de lots, contrôles lot par lot)

Le LNR contrôle uniquement les antigènes qu'il utilise pour ses essais ARL (CEVA Biovac et Charles River). Les antigènes utilisés dans les ARL font l'objet de contrôles initiaux puis lot par lot. Leur spécificité, sensibilité et stabilité dans le temps sont ensuite contrôlées régulièrement aux cours des essais réalisés au sein du LNR.

Nombre de contrôles - ou de lots contrôlés - dans l'année

Sept contrôles de lots d'antigènes ont été effectués au cours de l'année 2023.

Analyse de l'évolution (augmentation, diminution) de l'activité sur les 5 dernières années

Cette activité fluctue légèrement en fonction des années. Une augmentation a été observée en 2019-2021 par rapport aux années précédentes. Elle pouvait s'expliquer par des ruptures de stocks régulières chez le seul fournisseur européen, CEVA Biovac (obligeant à commander de plus petites quantités, avec des changements de lots plus fréquents), et par des commandes d'antigènes chez Charles River (USA) depuis le début de l'année 2021 pour pallier ces ruptures de stock et comparer les antigènes de ces deux fournisseurs (notamment lors des productions de lots de sérums). Le nombre de contrôles a augmenté en 2023 par rapport à 2022, cette augmentation étant due en partie à la production d'un lot de sérum positif, qui entraîne une consommation plus importante d'antigènes commandés chez les deux fournisseurs pour tester les sérums au cours de la cinétique d'infection.

5. Activités d'appui scientifique et technique

5.1 Demandes d'appui scientifique et technique (AST) des ministères (de l'agriculture, de la santé ...) ou d'instances européennes ou internationales qui concernent le domaine de compétence du LNR

Nombre de demandes d'AST reçues dans l'année

0 demande(s)

Nombre de rapports d'AST rendus dans l'année, issus de demandes de l'année ou de l'année précédente

0 rapport(s)

5.2 Autres expertises

Les membres de l'équipe du LNR peuvent avoir des activités d'expertise (internes : CES, GT ou externe : EFSA ...) ou des activités auprès de commissions de normalisation (Afnor ...).

La responsable du LNR a participé à un groupe de travail initié en 2023 par la DGAI (Bureau de l'Identification et du Contrôle des Mouvements des Animaux, BICMA) sur le programme de surveillance dans le cadre des agréments UE des établissements de volailles, plus particulièrement pour la partie mycoplasmoses aviaires (partage de documents à corriger et finaliser, après plusieurs réunions ayant eu lieu en 2023). La responsable du LNR a été sollicitée par des journaux pour la relecture d'articles scientifiques (traitant des mycoplasmes aviaires ou de la résistance des mycoplasmes aux antibiotiques) avant publication. Ces activités, réalisées intuitu personae, ne sont cependant pas considérées comme un travail du LNR proprement dit.

5.3 Dossiers de demande d'agrément

Nombre de dossiers de demande d'agrément étudiés dans l'année

0 dossier(s)

5.4 Activités d'appui

Description de ces activités et estimation du temps consacré

Les appels et messages sont essentiellement reçus et gérés par la responsable du LNR (ou son adjointe en cas d'absence). Une boîte aux lettres spécifique au LNR est consultable par toutes les personnes impliquées dans le LNR : lnr.mycoaviaires@anses.fr. Beaucoup de professionnels continuent néanmoins à contacter directement la responsable du LNR sur sa boîte professionnelle ou par téléphone. Le LNR reçoit en moyenne un à deux appels ou

messages par semaine de la part de laboratoires départementaux ou privés, de vétérinaires, ou de techniciens pour :

- Des demandes de renseignements sur la méthode ARL ou la disponibilité des réactifs, la culture des mycoplasmes (composition des milieux de culture, méthodes d'isolement par culture), les prélèvements à privilégier pour permettre l'isolement des mycoplasmes, etc.
- Des demandes de renseignements généraux sur les modes de transmission des mycoplasmes aviaires, les moyens de lutte (protection, prévention, antibiothérapie, vaccins disponibles ou autovaccins).

En lien avec la nouvelle loi de santé animale, le bureau de la Santé Animale (BSA) de la DGAI a contacté la responsable du LNR à plusieurs reprises pour obtenir des précisions sur les mycoplasmoses aviaires (espèces de mycoplasmes pathogènes, prévalence sur le terrain...) et les techniques de diagnostic utilisées sur le terrain. La mise en place d'une enquête sur le terrain permettrait d'actualiser les données de prévalence, mais ce type de travail nécessiterait des moyens humains et financiers supplémentaires. Ces activités d'appui et de conseil peuvent être estimée à environ une journée par semaine en moyenne.

6. Animation du réseau de laboratoires agréés ou reconnus

6.1 Description du réseau

Animation d'un réseau de laboratoires agréés

Non

Animation d'un réseau de laboratoires reconnus

Non

6.2 Essais interlaboratoires d'aptitude

6.2.1 Organisation d'essais interlaboratoires d'aptitude

Nombre d'EILA organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILA

6.2.2 Exploitation de résultats d'essais interlaboratoires d'aptitude organisé par un tiers

Le LNR exploite les résultats d'EILA organisé(s) par un (des) tiers (LRUE, autre...)

Non

6.3 Autres actions visant à vérifier l'aptitude des laboratoires

Actions mises en œuvre

Sans objet

6.4 Formation, organisation d'ateliers

Nombre de journées d'échange et de restitution rassemblant les laboratoires agréés du réseau, organisées dans l'année

0 journée(s)

Nombre de sessions de formation des personnels des laboratoires agréés aux méthodes utilisées pour les contrôles officiels, organisées dans l'année

0 session(s) de formation

Autres formations dans le cadre des activités du LNR

Sans objet

6.5 Organisation d'autres essais interlaboratoires (EIL)

Nombre d'EIL de validation (EILV) organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILV

Nombre d'EIL de transfert (EILT) organisés par le LNR au cours de l'année

0 EILT

7. Surveillance, alertes

7.1 Surveillance programmée par l'autorité sanitaire, notamment PS/PC et prophylaxie officielle en santé animale

L'autorité sanitaire a mis en œuvre dans l'année une surveillance programmée dans le champ du LNR

Non

7.2 Autres activités de surveillance

Le LNR est impliqué dans des activités de surveillance autres que celle programmée par l'autorité sanitaire

Non

7.3 Fiches d'alerte ou de signal

Le LNR a émis dans l'année des fiches d'alerte ou de signal dans Salsa (système d'alerte sanitaire de l'Anses)

Non

8. Activités de recherche en lien avec l'activité de référence

Acronyme	Titre	Statut
EXOVIRULOME	Le sécrétome des mycoplasmes animaux : comparaison interespèces, rôle dans le pouvoir pathogène et application au diagnostic (thèse co-encadrée Anses Lyon/Ploufragan)	en cours
Thèse Tunisie (Sfax)	Accueil et encadrement d'une étudiante en thèse sur les mycoplasmoses aviaires en Tunisie, dans la région de Sfax (techniques d'isolement et de détection/identification des différentes espèces de mycoplasmes, détermination des niveaux de résistance à certains antibiotiques)	en cours
MyMIC	Standardization of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing and clinical interpretation in animal mycoplasmas MyMIC est un réseau collaboratif comprenant 22 laboratoires de 18 pays travaillant sur le diagnostic des mycoplasmes animaux et leur sensibilité aux antimicrobiens. Ce réseau conduira à l'élaboration de lignes directrices pour la culture, l'identification et la détermination standardisées des CMI pour les espèces de mycoplasmes isolées d'élevages. De plus, il pourrait conduire à la définition de valeurs d'ECOFF et des seuils cliniques des différentes espèces de mycoplasmes. Dans le cadre de ce réseau, le LNR a réalisé des essais de titrages de souches de mycoplasmes avec une nouvelle technique de cytométrie en flux par impédance électrique.	en cours
Mycoplasmes des serpents	Le LNR a été sollicité par le laboratoire Laboklin GmbH (Bad Kissingen, Allemagne) pour essayer d'isoler des mycoplasmes à partir de prélèvements issus de serpents.	en cours

9. Relations avec le CNR

Existence d'un CNR dont le mandat recouvre au moins en partie celui du LNR

Non

10. Relations avec le LRUE

Détention d'un mandat LRUE qui recouvre au moins en partie celui du LNR

Non

Existence d'un LRUE dont le mandat recouvre au moins en partie celui du LNR

Non

11. Détention d'autres mandats de référence au niveau international

Autres mandats détenus par le LNR dans le même domaine de compétences

Aucun

ANNEXES

Liste des publications et communications 2023 dans le cadre du mandat de LNR Mycoplasmoses aviaires

Les noms des auteurs appartenant au LNR sont soulignés. Les publications de cette liste sont sous presse ou publiées.

Communications internationales ('conference proceedings ou 'conference paper')

Gautier-Bouchardon, A.V., M. Jäy, S.M. Klose, A. Heuvelink, I. Lysnyansky, M. Gyuranecz, A.S. Ramirez, M. Bottinelli, A. Ridley, A. Feberwee, C. Becker, et F. Tardy. 2023. « MyMIC: a network for standardization of diagnostics, antimicrobial susceptibility testing and clinical interpretation in animal mycoplasmas. » 9^e symposium sur la résistance aux antimicrobiens chez les animaux et dans l'environnement (ARAE 2023), Tours, France, 3-5 July 2023.

Gautier-Bouchardon, A.V., M. Jäy, S.M. Klose, A. Heuvelink, I. Lysnyansky, M. Gyuranecz, A.S. Ramirez, M. Bottinelli, A. Ridley, A. Feberwee, C. Becker, et F. Tardy. 2023. « MyMIC: a network for standardization of diagnostics, antimicrobial susceptibility testing and clinical interpretation in animal mycoplasmas. 24th Biennial Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), Osaka, Japan, 16-20 July 2023.