



## **Rapport annuel d'activité, année 2022**

### **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 Mycoplasmiologie, Bactériologie et Antibiorésistance (MBA)

## **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'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 DE (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 2022 a augmenté par rapport aux 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 326 prélèvements provenant de 13 élevages de poules pondeuses de la région de Sfax (Algérie), dans la cadre de l'encadrement d'une étudiante en thèse sur les mycoplasmoses aviaires en Algérie. Cette étude a conduit à l'isolement de nombreuses souches de *Mycoplasma gallinarum*. L'année 2022 a été marquée par la mise au point de nouveaux spectres de référence pour l'identification de différentes espèces de mycoplasmes aviaires par la technique de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Ces nouveaux spectres de référence ont permis de conforter l'identification de certaines espèces pour lesquelles il n'existait qu'un seul spectre de référence, ou de permettre l'identification d'espèces pour lesquelles nous ne disposons pas encore de spectres de référence. La validation de ces spectres a permis d'améliorer l'identification des différentes espèces « mineures » pour lesquelles il n'existait pas de PCR spécifique d'espèce, sans passer par une étape de séquençage. Le LNR a participé activement au cours de cette année aux discussions sur la révision de la norme NF-U47-012 (recherche des anticorps spécifiques de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis* ou *Mycoplasma synoviae* dans le sérum par la technique d'agglutination rapide sur lame), notamment pour tenir compte des résultats obtenus par le LNR ces dernières années sur l'effet prozone. Une étude interlaboratoires sur la technique d'agglutination rapide sur lame (ARL) pour la détection d'anticorps dirigés contre *Mycoplasma (M.) gallisepticum* et/ou *M. synoviae* chez la poule et la dinde a été initiée par le LNR. Ce projet, mis en place au cours de l'été 2021, avait pour objectif de déterminer si un effet prozone pouvait être observé sur des sérums issus d'élevages de poules ou de dindes infectés par *M. gallisepticum* et/ou *M. synoviae*, en comparant les résultats obtenus par deux techniques ARL réalisées en parallèle sur les mêmes sérums par les laboratoires d'analyses. Cependant, très peu de laboratoires ont répondu à cette enquête, rendant les résultats inexploitable. La commission de l'AFNOR, n'arrivant pas à trouver un consensus sur la révision de la norme, a finalement décidé de la supprimer de son catalogue de techniques en fin d'année 2022. Les laboratoires désirant être accrédités pour cette technique devront l'être sur l'ancienne version de la norme, en portée fixe.

## **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).

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

#### **Détail par type d'analyse de première intention**

Pas d'activité officielle sur l'année.

### **3.2 Analyses officielles de confirmation**

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

2 analyse(s).

Le LNR n'avait pas effectué d'analyses de ce type au cours des quatre années précédentes.

#### **Détail par type d'analyse de confirmation**

Dans le cadre du contrôle des mycoplasmoses aviaires pour les échanges intracommunautaires de volailles, le LNR a été sollicité à deux reprises pour confirmer/infirmier les résultats ARL obtenus sur deux lots de dindes destinés à l'exportation. La première demande (suspicion de contamination par *M. gallisepticum*) a donné lieu à des analyses ARL, ELISA et PCR (avec nouveaux prélèvements dans l'élevage). La deuxième demande (suspicion de contamination par *M. meleagridis*) a conduit à des analyses ARL et ELISA sur sérums. Dans les deux cas, les analyses n'ont pas permis de confirmer les analyses de première intention et les lots ont été libérés pour l'exportation.

### **3.3 Autres analyses**

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

16401 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, 6716 agglutinations rapides sur

lame (ARL) et 176 analyses par ELISA ont été réalisées en 2021 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, 2080 ARL ont été réalisées (contrôles lors de la production du nouveau sérum et contrôles des sérums disponibles à la vente). Enfin, 577 prélèvements non liés au suivi des troupeaux EOPS ont été reçus et ont donné lieu à 5701 analyses de première intention (mise en culture et PCR, ARL ou ELISA en fonction des prélèvements) au cours de l'année 2022. Ces chiffres sont en augmentation par rapport aux deux dernières années car ils incluent des analyses effectuées à partir de 326 prélèvements provenant de 13 élevages de poules pondeuses de la région de Sfax (Algérie), dans le cadre de l'encadrement d'une étudiante en thèse sur les mycoplasmoses aviaires en Algérie. Sans ces prélèvements, les chiffres du LNR sont restés relativement stables par rapport aux années précédentes. 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 2022 pour différentes cultures pour lesquelles un changement de couleur a été observé (activité métabolique des mycoplasmes), des clones et des souches. Ces analyses (496 en tout, 170 sans les analyses effectuées dans le cadre de la thèse Algérienne) ne sont pas 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. En plus des spectres de référence déjà développés lors des dernières années vis-à-vis de 12 espèces de mycoplasmes aviaires (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae*, *M. meleagridis*, *M. pullorum*, *M. glycyphilum*, *M. gallinaceum*, *M. anatis*, *M. columborale*, *M. iners*, *Acholeplasma (A.) axanthum* et *A. Laidlawii*), 16 nouveaux spectres de référence ont été testés et entrés dans la base de spectres de référence du Biotyper en 2022 (pour conforter l'identification des espèces citées ci-dessus et ajouter les six nouvelles espèces dans la base : *M. gallinarum*, *M. gallopavonis*, *M. columbinasale*, *M. columbinum*, *M. cloacale* et *M. anseris*). La très grande majorité des espèces de mycoplasmes aviaires peuvent maintenant être identifiés par spectrométrie de masse dès lors qu'ils se multiplient *in vitro*. Enfin, des essais de comparaison de différents kits ELISA commerciaux pour la détection d'anticorps anti-MS et/ou anti-MG 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 poules ou des dindes ces dernières années, ont représenté 1728 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 négatif (560 mL) a été produit au cours de l'année 2022. Six séries de lyophilisations ont été effectuées en 2022 pour reconstituer les stocks de flacons des différents sérums (positifs ou négatifs, de poules ou de dindes). En tout, 626 flacons ont été lyophilisés.

**Nombre d'unités distribuées au plan national**

Quantités de sérums vendus au cours de l'année 2022 (flacons de 1 mL) :

- Sérum de poule positif vis-à-vis de *M. synoviae* : 109 flacons ;
- Sérum de poule positif vis-à-vis de *M. gallisepticum* : 100 flacons ;
- Sérum de dinde positif vis-à-vis de *M. synoviae* : 14 flacons ;
- Sérum de dinde positif vis-à-vis de *M. gallisepticum* : 24 flacons ;
- Sérum de dinde positif vis-à-vis de *M. meleagridis* : 28 flacons ;
- Sérum de dinde négatif : 4 flacon ;
- Sérum de poule négatif : 46 flacons.

### **Analyse de l'évolution (augmentation, diminution) des tendances en termes d'activité sur les 5 dernières années**

Cette activité a augmenté sur les cinq dernières années, et plus particulièrement sur 2017 et 2018. Elle semble s'être stabilisée en 2019 et a légèrement diminué en 2020 et 2021. 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 trois 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 pour les analyses ARL au sein du LNR, en complément ou en remplacement des antigènes CEVA Biovac.

### **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**

Quatre contrôles de lots d'antigènes ont été effectués au cours de l'année 2022.

### **Analyse de l'évolution (augmentation, diminution) des tendances en termes d'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 diminué en 2022, cette diminution étant due en partie à des commandes moins élevées de lots avec des dates de péremption plus longues et à l'absence de production de lots de sérums positifs.

## **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 en 2022 à un groupe de travail initié 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 (quatre réunions de 2-3 heures chacune). 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](mailto: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 estimées à environ ½ 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 secrétome des mycoplasmes animaux : comparaison interspèces, rôle dans le pouvoir pathogène et application au diagnostic (thèse co-encadrée Anses Lyon/Ploufragan)	en cours
Thèse (Sfax)	Algérie Accueil et encadrement d'une étudiante en thèse sur les mycoplasmoses aviaires en Algérie, dans la région de Sfax (techniques d'isolement et de détection/identification des différentes espèces de mycoplasmes)	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