

## IMPLICATION DU VIRUS DE LA MYXOMATOSE DANS L'EXISTENCE DE TROUBLES PASTEURELLIQUES CHRONIQUES EN ÉLEVAGE CUNICOLE

Lopez S.<sup>1</sup>, Nouvel L.<sup>2</sup>, Chateigner F.<sup>3</sup>, Ridremont B.<sup>3</sup>, Bertagnoli S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Univet SE, ZI Très le Bois, Impasse Monge, 22600 Loudeac, France

<sup>2</sup> Cybelvet, Parc Activités d'Étrelles, 35370 Étrelles, France

<sup>3</sup> MSD Santé Animale Rue Olivier de Serres, BP 17144, 49071 Beaucozé Cedex, France

<sup>4</sup> IHAP Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France.

Correspondant: sebastien.lopez@univetse.fr

**Résumé** – La pasteurellose est l'une des pathologies majeures en élevage cunicole, tant par la mortalité et la dégradation des performances induites que par le recours nécessaire aux antibiotiques associé pour la contrôler. Dans cette étude, nous avons cherché à voir si le virus de la myxomatose pouvait être impliqué dans la persistance de troubles pasteurelliques en élevage. Sept élevages ne présentant pas de signes cliniques de myxomatose ont été inclus. Deux élevages (groupe P+) présentaient des signes chroniques de pasteurellose avec un contrôle décevant de la maladie. Trois élevages (groupe P) présentaient une situation de pasteurellose maîtrisée et deux élevages (groupe T) ne présentaient pas de signes de pasteurellose. Des recherches du virus par PCR sur écouvillons conjonctivaux ont été réalisées sur 10 lapins au moment de l'apparition des premiers signes cliniques pour les élevages P+ et P et en fin d'engraissement pour les élevages T. Deux séries d'analyses sérologiques à trois semaines d'intervalle ont également été réalisées pour les élevages E1 et E2 du groupe P+. Les résultats PCR ont été positifs pour les élevages E1 et E2. Les tests sérologiques ont montré une séroconversion contre la myxomatose en cours d'engraissement. Ces résultats, conformes à d'autres études similaires, montrent l'implication de la myxomatose sous sa forme amyxomateuse dans l'existence de troubles pasteurelliques chroniques. Ils mettent en avant l'intérêt de la vaccination des reproducteurs pour contrôler la circulation du virus en engraissement. Ces résultats amènent à conseiller la recherche de circulation du virus myxomateux sur des cas de pasteurellose chronique, particulièrement dans des élevages non vaccinés, en privilégiant la recherche directe du virus par PCR à l'apparition des symptômes

**Abstract – Influence of myxoma virus infection on *Pasteurella*-based chronic respiratory disorders in meat rabbits farms.** Pasteurellosis is one of the main infectious diseases in meat rabbit farms, in terms of mortality, decrease of performances and increased use of antibiotics to control it. In this study, we investigated whether myxoma virus (MV) could be involved in chronic respiratory disorders due to *Pasteurella* on the field in West of France. Seven farms with no clinical signs of myxomatosis were included in the present study. Two farms (P + group) showed chronic respiratory signs of pasteurellosis with failure in the control of this disease. Three farms (P group) were globally successful in terms of disease control and two farms (T group) showed no clinical evidence of pasteurellosis. MV was investigated by PCR method on palpebral swabs, which were performed on 10 rabbits at the onset of the first clinical signs for P + and P farms and at the end of fattening period for T farms. Two series of serologies (Elisa test) were carried out at three weeks interval for the E1 and E2 farms (from P + group). PCR results were positive for E1 and E2 farms. Serology showed seroconversion against myxomatosis during fattening period. These results, consistent with other similar studies, underline the implication of MV in its amyxomatous form in the persistence of chronic respiratory disorders due to *Pasteurella*. These field data in French context highlight the necessity to consider vaccination of reproductive animals against myxomatosis to control the circulation and spreading of MV in the fattening units. These results suggest that investigation of MV in cases of chronic pasteurellosis, particularly in non vaccinating farms, should be encouraged, preferably by PCR at the onset of clinical signs.

### Introduction

La pasteurellose est l'une des principales pathologies rencontrées en élevage cunicole. Elle est ainsi citée comme première pathologie latente ou chronique en terme de prévalence pour la période 2014-2015 par les élevages du réseau d'élevages de référence cunicoles (programme Cunimieux – Itavi). Elle se manifeste

principalement par une atteinte de l'arbre respiratoire, souvent sous forme de pleuropneumonie purulente et par des affections également purulentes sur différents organes, notamment des abcès cutanés (Coudert et al., 1999). Son importance tient d'une part à l'impact économique pour les élevages, en particulier dû à l'augmentation de la mortalité, aux retards de croissance, à l'hétérogénéité des lapereaux, ainsi

qu'aux saisies pour abcès, qui constituent le premier motif de retrait sanitaire en abattoir. D'autre part, la maîtrise de la maladie en élevage nécessite la plupart du temps le recours à des traitements antibiotiques répétés, ce qui ne contribue pas aux efforts de la filière cunicole par rapport à sa lutte contre l'antibiorésistance. Ainsi, les tétracyclines et les sulfamides, molécules couramment prescrites dans le traitement des pasteurelloses en élevages constituent les deux familles d'antibiotiques les plus fréquemment utilisées en élevage cunicole (rapport de l'ANSES-ANMV sur le suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015). Différents moyens de contrôle de la pasteurellose existent, associant le pilotage de la ventilation, l'application de mesures de biosécurité strictes, la préparation des jeunes femelles, ... mais restent souvent insuffisants. L'utilisation d'autovaccins contre la pasteurellose s'avère souvent inefficace en élevage conventionnel. Le recours même aux traitements antibiotiques peut s'avérer parfois décevant, et ceci en dépit d'une forte sensibilité de *Pasteurella multocida* aux antibiotiques les plus fréquemment testés (91 à 99% - données Resapath bilan 2015).

Dans la littérature, deux formes de manifestation clinique de la myxomatose ont été décrites sur le lapin. Une forme nodulaire classique et une forme amygomateuse dite également respiratoire, caractérisée par une prédominance des signes respiratoires, avec un nombre restreint voire l'absence complète de myxome (Arthur *et al.*, 1988 in Marlier *et al.*, 1997). Ces deux formes se compliquent souvent d'une surinfection bactérienne à Gram – lié à l'effet immunosuppresseur induit par le virus (Marlier *et al.*, 2000a). Le but de ce travail est de mesurer l'implication potentielle du virus de la myxomatose dans l'expression clinique de pasteurellose, en recherchant la présence du virus dans plusieurs élevages cunicoles présentant des profils d'infection pasteurellique différents.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Protocole expérimental

L'étude a été menée, de septembre 2016 à avril 2017, dans 7 élevages de production sélectionnés en fonction des signes cliniques de pasteurellose présents sur les lapins en engraissement, conduits en bande unique, avec vide sanitaire total après départ des animaux à l'abattoir. Le premier groupe d'élevage identifié P+ regroupe des élevages (E1, E2) présentant des signes cliniques de pasteurellose importants depuis plus d'un an, se manifestant par une forte mortalité par pneumonie/septicémie, des abcès cutanés et auriculaires, des retards de croissance et des saisies importantes pour abcès à l'abattoir. Les analyses bactériologiques ont mis en évidence systématiquement une infection à *Pasteurella multocida*, parfois associée à *Bordetella bronchiseptica*. Les tests ODC (ornithine

décarboxylase) réalisée sur les isollements de *Pasteurella multocida* se sont avérés variables d'une analyse à l'autre, de même que la taille des colonies bactériennes au sein d'un même élevage. Bien que les antibiogrammes sur ces deux bactéries présentaient une bonne sensibilité à la plupart des antibiotiques habituellement utilisés sur ces pathologies (tétracyclines, sulfamides, macrolides), les réponses aux différents traitements antibiotiques utilisés se sont avérées décevantes. Le deuxième groupe identifié P comprend trois élevages (E3, E4, et E5) présentant également des signes cliniques de pasteurellose proches de ceux décrits pour le groupe P+ mais d'intensité plus modérée, notamment du fait d'une réponse satisfaisante aux traitements antibiotiques mis en place, permettant le contrôle de la maladie. Les isollements bactériens ont révélés également la présence de *Pasteurella multocida* et de *Bordetella bronchiseptica*, avec la même variabilité sur les caractères biochimiques et morphologiques en fonction des isolats pour *Pasteurella multocida*. Le troisième groupe, témoin, comprend deux élevages (T1 et T2) n'ayant pas présenté de signe de pasteurellose sur les lapins d'engraissement depuis plus de deux ans. Il est à noter que les femelles reproductrices ne présentaient pas ou peu de signes cliniques de pasteurellose, ceci sur l'ensemble des élevages de l'étude. Aucun épisode clinique de myxomatose n'avait été diagnostiqué dans les élevages de l'étude depuis plus de 5 ans. Des prélèvements par écouvillonnage au niveau de la face interne des 2 paupières ont été effectués sur 10 lapins en engraissement dans chaque élevage. Pour les groupes P+ et P, ces prélèvements ont été réalisés au moment de l'apparition des premiers troubles pasteurelliques sur des animaux morts présentant des lésions de pneumonie ou sur des animaux vivants avec une conjonctivite ou des signes de détresse respiratoire. Pour le groupe T, en l'absence de signe clinique de pasteurellose, les prélèvements ont été réalisés de façon arbitraire en fin d'engraissement sur 10 animaux avec des troubles respiratoires ou un retard de croissance sans signe de diarrhée associé. Pour les élevages E1 et E2, deux séries de buvards pour profil sérologique, à J0 (apparition des symptômes) et trois semaines plus tard, ont également été réalisés sur 10 lapins provenant des mêmes cages que les lapins prélevés par écouvillonnage.

Les principales caractéristiques des élevages et les prélèvements réalisés dans chacun d'eux sont récapitulés dans le tableau 1.

### 1.2. Analyses de laboratoire

-Recherche du virus myxomateux par PCR en temps réel : Après élution des écouvillons dans 500 ml d'eau nanopure, les extraits ont été répartis pour constituer des mélanges de 5 échantillons. Pour chaque mélange 200 ml ont subi une extraction d'ADN total (kit « One -4-all Genomic DNA Mini-prep », Biobasic.). Les

ADN ont été testés par PCR en temps réel (amplification du gène M071L du virus myxomateux), selon le protocole adapté du « Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018 » de l'OIE (kit Biorad Sybr, thermocycleur Roche 4). Pour chaque mélange positif, les échantillons le constituant ont été testés individuellement selon le même protocole.

-Recherche des anticorps spécifiques anti-virus myxomateux par test ELISA : Après élution des buvards en tampon salin, les solutions obtenues ont été testées par ELISA indirect selon le protocole décrit par Gelfi *et al* (1999). Les résultats ont été exprimés qualitativement (positif, négatif, douteux) par comparaison des densités optiques obtenues (DO 405 nm) avec celles de sérums négatifs connus.

**Tableau 1 : Principales caractéristique des élevages et types de prélèvements réalisés**

Groupe	Élevage	Bâtiment engraissement	Vaccination myxomatose des reproducteurs	Âge des lapins (engraissement) lors de la réalisation des prélèvements	Analyses réalisées
P+	E1	Semi plein air et Duo*	Non	40 jours	PCR Sérologie
				61 jours	Sérologie
	E2	Duo	Non	48 jours	PCR Sérologie
				66 jours	Sérologie
P	E3	Duo	Oui	56 jours	PCR
	E4	Duo	Oui	36 jours	PCR
	E5	Duo	Oui	47 jours	PCR
T	T1	Duo	Non	68 jours	PCR
	T2	Duo	Non	63 jours	PCR

\* Duo : salles maternité et engraissement identiques avec cages polyvalentes, conduite en alternance avec transfert des femelles au sevrage.

## 2. Résultats et discussion

L'analyse PCR a permis de mettre en évidence la présence du virus myxomateux sur les deux élevages appartenant au groupe P+ (1 échantillon pour E1 et 2 échantillons pour E2). Dans ces deux ateliers, la recherche d'anticorps s'est révélée positive en fin d'engraissement sur 8/8 et 7/9 des sérums qu'il a été possible d'analyser respectivement pour les élevages E1 et E2. De plus la cinétique d'anticorps montre une séroconversion entre J0 et J+3 semaines pour 3/8 et 5/9 des animaux prélevés.

Les résultats des analyses de laboratoire sont présentés dans les tableaux 2 et 3.

**Tableau 2: Résultats des analyses PCR pour recherche du virus de la myxomatose.**

Groupe	Elevage	Test PCR
P+	E1	Positif (1/10)
	E2	Positif (2/10)
P	E3	Négatif
	E4	Négatif
	E5	Négatif
T	T1	Négatif
	T2	Négatif

**Tableau 3: Résultats des cinétiques sérologiques pour recherche des anticorps anti-virus de la myxomatose par ELISA.**

Elevage	Numéro lapin	1 <sup>ère</sup> série	2 <sup>ème</sup> série
E1	Lapin 1	+	+
	Lapin 2	+	+
	Lapin 3	+	+
	Lapin 4	+	+
	Lapin 5	-	+
	Lapin 6	-	+
	Lapin 7	-	+
	Lapin 8	-	pdsi
	Lapin 9	+	pdsi
	Lapin 10	+	+
E2	Lapin 11	-	+
	Lapin 12	-	pdsi
	Lapin 13	-	+
	Lapin 14	-	+
	Lapin 15	-	+
	Lapin 16	+	+
	Lapin 17	+	+
	Lapin 18	-	+

Pdsi : prise de sang insuffisante.

L'identification des PCR + au moment de l'apparition des premiers signes cliniques, associée à une séroconversion des animaux sur la période incriminée, semble indiquer un effet favorisant du virus myxomateux vis-à-vis de l'infection pasteurelle qui pourrait être considérée comme une infection

secondaire. La mauvaise réponse aux traitements antibiotiques mis en place sur les élevages concernés serait probablement à mettre en relation avec la co-infection virus/bactérie. Ces cas d'élevages pourraient être classés dans les formes amyxomateuses (ou respiratoires) décrites dans certaines publications (Marlier *et al.*, 1997, 2000a).

Un effet protecteur de la vaccination des reproducteurs vis-à-vis de la circulation du virus myxomateux en engraissement peut également être évoqué sur les élevages présentant des troubles pasteurelliques. Ainsi sur les 3 élevages E3, E4 et E5 qui vaccinent leur cheptel reproducteur, il n'a pas été détecté de présence de virus au moment de l'apparition des premiers signes cliniques de pasteurellose, à la différence des élevages E1 et E2.

Dans cette étude, deux techniques d'investigation ont été utilisées pour mettre en évidence la circulation de virus myxomateux sur les lapins. Les analyses sérologiques permettent de révéler l'existence d'un contact avec le virus myxomateux au sein de l'élevage, mais ne permettent pas de dater l'évènement, sauf à être réalisées en cinétique de séroconversion. En outre, une analyse unique sur les lapins d'engraissement peut s'avérer difficile à interpréter en raison de la persistance des anticorps d'origine maternelle qui peut aller au-delà de 6 semaines d'âge (Kerr, 1997). Par ailleurs, Marlier *et al.* (2000b) dans une étude portant sur la recherche de myxomatose sur des lapins avec lésions de pneumonie n'établissent pas de relation entre la présence d'anticorps contre la myxomatose et l'isolement d'une bactérie pathogène sur les poumons. L'identification directe du virus par PCR au moment de l'apparition des signes cliniques nous semble donc la technique à privilégier. La réalisation des écouvillons au niveau des paupières, lieu à privilégier pour l'isolement du virus (Marlier *et al.*, 1996), présente en outre l'avantage d'être simple à pratiquer et non invasive pour l'animal.

Une étude épidémiologique réalisée dans plusieurs élevages de pays européens par Marlier *et al.* (2001) montre que des élevages présentant des troubles digestifs ou de la reproduction ont également une séroprévalence significativement plus élevée lors de détection par Elisa des anticorps dirigés contre le virus. La recherche du virus myxomateux par PCR dans des élevages présentant ce type de troubles chroniques récurrents (respiratoires ou digestifs) nous semblerait pertinente particulièrement en l'absence de vaccination ou dans des conditions d'élevage exposant plus au risque d'infection (type plein air ou semi-plein air).

## Conclusions

Dans un contexte économique difficile et en l'absence de symptômes classiques de la myxomatose sous sa forme nodulaire, une mauvaise observance dans la couverture vaccinale vis-à-vis de la myxomatose est parfois constatée sur le terrain. Les résultats de notre étude, similaires à ceux trouvés dans d'autres travaux plus anciens (Marlier *et al.*, 2000b ; Marlier *et al.*, 2001), montrent l'existence de circulation de virus de la myxomatose sous forme amyxomateuse en élevage cunicole. Cette circulation virale pourrait expliquer des échecs thérapeutiques sur des situations cliniques de pasteurellose, particulièrement à tropisme respiratoire. Nos résultats doivent en tout état de cause amener les éleveurs et les vétérinaires à s'interroger sur une potentielle implication du virus de la myxomatose sur des situations pathologiques chroniques en engraissement, particulièrement dans les élevages ne pratiquant pas de vaccination vis-à-vis de la myxomatose.

## Références

- Anses, Résapath – Réseau d'Epidémiologie de l'Antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, Bilan 2015, 23 et 114, Novembre 2016, Edition scientifique.
- Coudert P., Rideaud P., Kpodekon M., 1999. Le point sur la pasteurellose sur lapin. 8<sup>ème</sup> Journ. Rech. Cunicole. Paris, 3-12.
- Gelfi J., Chantal J., Phong T.T., Py R., Boucraut-Baralon C., 1999. Development of an ELISA for detection of myxoma virus-specific rabbit antibodies; test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 11, 240–245.
- Kerr P. J., 1997. An ELISA for epidemiological studies of myxomatosis : persistence of antibodies to Myxoma virus in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Wildlife Research*, 24, 53–65.
- Marlier D., Vindevogel H., 1996. La myxomatose amyxomateuse: isolement de trois souches en Belgique. *Ann. de Méd. Vét.* 140, 343–6.
- Marlier D., Coignoul F., Boucraut-Baralon C., Vindevogel H., 1997. Etude clinique et anatomopathologique de l'infection expérimentale de lapins par une souche virale amyxomateuse isolée en Belgique. *Ann. Med. Vet.*, 141, 479-486.
- Marlier D., Mainil J., Sulon J., Beckers J.F., Linden A., Vindevogel H., 2000a. Study of the virulence of five strains of amyxomatous myxoma virus in crossbred New Zealand white/Californian conventional rabbits, with evidence of long-term testicular infection in recovered animals. *J. Comp. Path.*, Vol. 122, 101–113.
- Marlier D., Mainil J., Linden A., Vindevogel H., 2000b. Infectious agents associated with rabbit pneumonia: isolation of amyxomatous myxoma virus strains. *The Vet. Jour.*, 159, 171–178.
- Marlier D., Herbots J., Detilleux J., Lemaire M., Thiry E., Vindevogel H. Cross-selectional study of the association between pathological conditions on myxoma-virus seroprevalence in intensive rabbit farms in Europe. 2001. *Prev. Vet. Med.* 48. 55-64.