

**DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE D'IMMUNISATION PASSIVE DU
POULET DE CHAIR VIS-A-VIS DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS ET
TYPHIMURIUM A L'AIDE D'ANTICORPS DU JAUNE D'ŒUF**

**Marcq Christopher¹, Chalghoumi Raja^{1,2}, Beckers Yves¹, Portetelle Daniel³,
Théwis André¹**

¹*Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Unité de Zootechnie -
Passage des Déportés, 2 B-5030 Gembloux, Belgique,*

²*Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture,
Rue d'Egmont, 5 B-1000 Bruxelles, Belgique*

³*Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Unité de Biologie Animale
et Microbienne, Avenue Maréchal Juin, 6 B-5030 Gembloux, Belgique*

RÉSUMÉ

Cette étude évalue la possibilité d'employer l'immunisation passive à l'aide d'anticorps du jaune d'œuf (IgY) comme stratégie de lutte contre *Salmonella* Enteritidis (SE) et Typhimurium (ST) chez le poulet de chair. Dans un premier temps, des œufs hyper-immuns ont été obtenus chez des poules pondeuses immunisées à l'aide de protéines de la membrane externe de SE et ST en émulsion avec les adjuvants de Freund. Ce traitement a permis une production massive d'IgY dirigés contre les deux serovars de *Salmonella* dans les jaunes d'œufs sans effet négatif significatif sur les taux de mortalité et de ponte des animaux ayant reçu le vaccin. Les jaunes d'œufs ont ensuite été conditionnés sous forme de poudre par atomisation ou lyophilisation. Dans le but d'étudier les effets de ces poudres sur les performances zootechniques de poulets de chair, 384 poussins d'un jour indemnes de salmonelles ont reçu un aliment complété (5 % de poudre de jaune d'œuf lyophilisé) plus ou moins riche en IgY spécifiques anti-SE/ST dès leur arrivée et ont ensuite été infectés individuellement à quatre jours à l'aide de 10⁶ ufc de SE et ST. Nous avons mesuré une amélioration significative des performances de croissance dans les groupes recevant les régimes enrichis en poudres de jaune. Néanmoins, aucun des traitements n'a permis d'égaliser les performances sur vingt-huit jours d'animaux non infectés ($p < 0,05$). La poudre de jaune non immune a également montré des effets positifs sur les performances des animaux infectés. Nos résultats suggèrent qu'une immunisation passive avec des IgY spécifiques de *Salmonella* spp. pourrait constituer un moyen efficace de réduire les effets négatifs d'une infection intestinale du poulet sur ses performances.

ABSTRACT

The present study investigates the potential of oral immunotherapy using hen egg yolk immunoglobulins (IgY) as a strategy to reduce the impact of *Salmonella* contamination on broilers. In a first step, hyperimmune eggs were obtained from laying hens immunized using *Salmonella* Enteritidis (SE) and Typhimurium (ST) outer membrane proteins in emulsion with Freund adjuvants. This led to the production of high levels of IgY antibodies directed against the two *Salmonella* serovars in egg yolks. Furthermore, no adverse effects were detected on mortality or laying rate in hens injected with this vaccine. Powders were obtained from these eggs by spray- or freeze-drying the whole yolk. In order to study the effect of these powders on broiler's growth performances, a challenge trial was conducted. 384 *Salmonella* spp.-free day-of-hatch chickens received supplemented feed (5 % freeze-dried egg yolk powder) since arrival, and were infected at day four with 10⁶ cfu of SE and ST per animal. We found a significant improvement in growth performances for the groups receiving the yolk-enriched diets. Nevertheless, none of the supplement concentrations allowed to raise the same body weight after 28 days of complementation than in uninfected broilers ($p < 0,05$). Interestingly, nonimmune egg yolk powder also exhibited a positive effect on performances of broilers experimentally infected with SE and ST. Our results suggest that passive immunization through egg yolk powders could be useful to reduce negative effects of *Salmonella* infection on broilers growth performances.

INTRODUCTION

Salmonella est la deuxième cause de toxi-infections alimentaires collectives déclarées dans l'Union Européenne (EFSA, 2007a). Parmi les denrées alimentaires responsables de ces intoxications, les viandes de volailles sont fréquemment incriminées (EFSA, 2008). La limitation de la contamination de ces produits par *Salmonella* constitue dès lors un enjeu économique et sanitaire pour la filière avicole, et ce dès la production primaire. En effet, malgré les efforts réalisés depuis plusieurs années, l'importance de la contamination des lots de poulets de chair en Europe demeure élevée avec 23,7 % des lots positifs avant leur départ pour l'abattoir (EFSA, 2007b).

La stratégie adoptée dans cette recherche repose sur le principe de l'immunisation passive qui consiste à apporter à l'animal par voie orale des anticorps ciblés contre des pathogènes déterminés. Dans ce domaine, l'emploi des anticorps provenant du jaune d'œuf (IgY) constitue une voie de recherche prometteuse à plusieurs titres. Ainsi, les IgY ont récemment fait l'objet de nombreuses études visant à les employer à des fins d'immunisation passive de diverses espèces animales vis-à-vis de virus ou de bactéries (Schade et al., 2005). En outre, le mode d'obtention de ces anticorps, par l'intermédiaire de la poule, représente d'un point de vue éthique une alternative intéressante à une collecte d'anticorps chez les mammifères, incluant une saignée (Schade et al., 2005).

Cette étude s'articule en trois phases. D'abord, des poules pondeuses sont vaccinées en vue de stimuler une production dans leurs œufs d'IgY ciblés simultanément contre *Salmonella* Enteritidis (SE) et *Salmonella* Typhimurium (ST), deux sérotypes prévalents chez la volaille et à l'origine de nombreux cas de salmonelloses humaines. Ensuite, un additif alimentaire est élaboré à base de ces jaunes d'œufs par séchage. Enfin, la poudre de jaune d'œuf est testée quant à ses effets prophylactiques sur des poulets de chair infectés expérimentalement par SE et ST.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Vaccination de poules pondeuses en vue d'une production d'IgY anti-*Salmonella* dans leurs œufs

Cent poules pondeuses de souche Shaver Brown (Volailles Lamballaises, Lamballe, FR) certifiées exemptes de salmonelles et non préalablement vaccinées contre ces pathogènes sont réparties aléatoirement dans deux groupes de 50 animaux. Les animaux du premier groupe sont immunisés selon un protocole décrit par Chalghoumi et al. (2008). Ce protocole a été approuvé par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale compétent sous la référence *fusagx n°05/04 NPC*. Brièvement, il consiste en une première immunisation à l'âge de 18 semaines suivie de quatre immunisations de rappel (21, 24, 27 et 30 semaines). Le vaccin employé correspond aux

protéines de la membrane externe de SE et ST en émulsion dans l'adjuvant de Freund (AF), sous sa forme complète (AF-C) en première immunisation et incomplète par la suite (AF-I). Il est injecté à l'animal par voie intramusculaire en quatre sites du muscle pectoral. Les deux souches SE et ST employées dans l'ensemble de cette étude proviennent de la collection du Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI, Gembloux, BE). Ce premier groupe de poules permet l'obtention de jaunes d'œufs dits hyper-immuns (HI) car riches en IgY anti-SE/ST. Les poules du second groupe ne subissent quant à elles aucun traitement d'immunisation particulier. Elles pondent des œufs dits non-immuns (NI) car dépourvus d'IgY anti-SE/ST. Durant 40 semaines consécutives à la première injection, les œufs sont récoltés quotidiennement. Un suivi des taux de ponte hebdomadaire et de mortalité est réalisé. Un dosage des titres en IgY spécifiques anti-*Salmonella* dans les jaunes des œufs HI est effectué toutes les trois semaines durant 24 semaines à compter de la première injection par la méthode ELISA sur la fraction hydrosoluble du jaune telle que décrite par Chalghoumi et al. (2008).

1.2. Séchage du jaune d'œuf pour la production d'un additif alimentaire pour volailles

Les œufs sont cassés manuellement et les jaunes sont récupérés, dilués deux fois à l'eau distillée, et conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Ces jaunes dilués sont ensuite séchés par lyophilisation ou par atomisation. L'impact des deux procédés est déterminé par comparaison des titres en IgY totaux avant et après séchage dans le jaune d'œuf (rendement en IgY), mesurés par la méthode ELISA à l'aide du Chicken IgG ELISA Quantitation Kit (E30-104, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, USA) ainsi que par une mesure du rendement massique de l'opération de séchage. La qualité nutritionnelle des poudres est déterminée par une mesure de la teneur en matière sèche (MS), en extrait étheré (EE), et en matières azotées totales (MAT) (AOAC, 1990). La teneur en énergie brute (EB) est mesurée par combustion dans une bombe calorimétrique (Parr Inst., Moline, USA).

1.3. Evaluation *in vivo* de l'efficacité de l'additif alimentaire au travers d'un challenge bactérien

Un régime de base unique est formulé (30,0 % de froment ; 27,0 % de maïs ; 23,8 % de tourteau de soja 48 ; 8,9 % d'huile de soja ; acides aminés, minéraux, vitamines) et est destiné à satisfaire les besoins des animaux sur l'ensemble de la période d'essai (de 1 à 28 jours). Les aliments expérimentaux ne contiennent ni coccidiostatique, ni enzyme exogène, ni antibiotique. Cette ration de base est ensuite complétée à l'aide de jaune entier lyophilisé (JEL) ou par un substitut. Une fois le mélange avec l'additif effectué, une analyse de la composition chimique est réalisée (cellulose brute CB, MAT, EE, EB) et

l'activité des IgY totaux et spécifiques est mesurée. L'absence de salmonelles dans l'aliment est contrôlée par un double enrichissement puis étalement sur gélose sélective *Salmonella-Shigella* (SS, Biokar Diagnostics, Beauvais, FR). Les colonies sont identifiées sur base de leur aspect.

L'essai d'immunisation passive porte sur 384 poussins mâles de souche Ross (statut *Salmonella*-free, Couvoir Vervaeke, Tielt, BE). Dès leur arrivée à un jour, ces animaux sont répartis dans huit groupes (n = 48) de poids homogènes correspondants à huit régimes expérimentaux (Tableau 1) : cinq doses effectives d'anticorps T1 à T5 (incorporation de JEL dans la ration à raison de 5 % de la matière fraîche MF, en faisant varier le ratio JEL-HI/JEL-NI de 0 à 100%), un groupe contrôle positif TP (infectés et ne recevant pas le JEL, remplacé par une caséine pure et de l'huile de soja afin d'équilibrer les régimes éprouvés en termes énergétique et protéique) et deux groupes témoins négatifs TN1 et TN2 (non infectés, maintenus dans un local isolé mais dans des conditions environnementales similaires à celles des animaux infectés). Chaque groupe comporte six cages de huit animaux réparties selon un dispositif en blocs aléatoires complets. Dès leur arrivée, les animaux reçoivent à volonté le régime éprouvé attribué.

Tableau 1. Description des régimes étudiés.

Régime éprouvé	Nombre d'animaux	JEL incorporé (% MF)	Ratio HI/Ni
T1	48	5	100 : 0
T2	48	5	75 : 25
T3	48	5	50 : 50
T4	48	5	25 : 75
T5	48	5	0 : 100
TP	48	0*	0 : 0
TN1	48	5	100 : 0
TN2	48	5	0 : 100

* Remplacé par une caséine (VWR Prolabo, Leuven, BE) (1,56 % MF) et une huile de soja (3,14 % MF).

A quatre jours, les animaux sont pesés, bagués, et inoculés (à l'exception des témoins négatifs TN1 et TN2) à l'aide de 10^6 ufc d'un complexe pathogène, mélange de SE et ST à parts égales. A partir du septième jour et de façon hebdomadaire, les animaux sont pesés individuellement tandis qu'une mesure de l'ingestion est réalisée par cage.

Ce protocole est enregistré auprès du comité d'éthique compétent sous la référence *fusagx 08/04 NPC*.

1.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses sont menées à l'aide du logiciel Minitab® 15.1. Concernant l'essai de vaccination (1.1.), les taux de ponte sont comparés par le test de Kruskal-Wallis, équivalent non paramétrique de l'analyse de la variance, en raison de distributions non normales. Les données de mortalité font quant à elles l'objet d'un test t. Concernant le challenge bactérien

(1.3.), les paramètres étudiés sont traités statistiquement (procédure GLM) suivant un modèle croisé mixte. Le poids vif (PV) des animaux mesuré à sept jours a été inséré en tant que covariable dans le modèle. Les moyennes sont structurées à l'aide du test de Newman et Keuls ($\alpha = 0,05$).

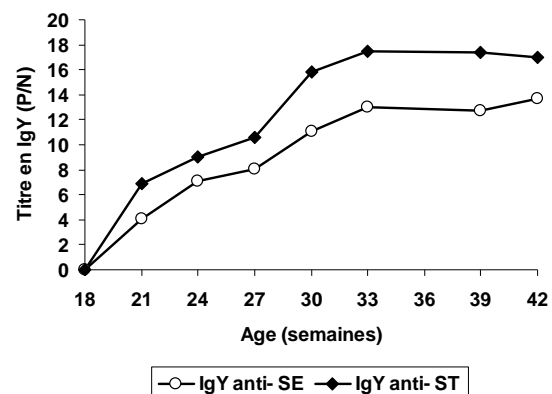
2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Vaccination de poules pondeuses en vue d'une production d'IgY anti-*Salmonella* dans leurs œufs

Les préparations vaccinales utilisées dans cette étude s'avèrent être bien tolérées par les poules immunisées. Si certaines poules développent une réaction inflammatoire au niveau des sites d'injections dans les jours qui suivent la première immunisation (avec l'AF-C), celle-ci se résorbe néanmoins par la suite. La mortalité est identique parmi les deux groupes d'animaux ($p > 0,05$). Les taux de ponte hebdomadaires calculés pour l'ensemble de la période d'essai ne sont pas influencés par la vaccination ($89,6 \pm 8,1$ % pour le groupe HI contre $88,9 \pm 6,6$ % pour le groupe NI, $p > 0,05$). Un impact des premières injections sur la ponte est toutefois constaté sur le groupe HI pour les semaines 4 à 6 ($p < 0,01$). Ces résultats confirment cependant à une plus grande échelle que l'emploi des adjuvants de Freund chez la poule n'altère pas durablement sa capacité de ponte, même lorsque la première immunisation est pratiquée à l'aide de l'AF-C (Chalghoumi et al., 2008).

La cinétique d'apparition des IgY spécifiques dans les œufs pondus est donnée à la Figure 1. La valeur P/N (Li et al., 2006) correspond au rapport entre P, la densité optique donnée pour un ELISA dosant les IgY spécifiques dans le jaune d'œuf pour une poule immunisée, et N, la valeur de densité optique correspondante pour une poule non immunisée.

Figure 1. Cinétique d'apparition des IgY spécifiques dans les jaunes d'œufs de poules vaccinées.



Des IgY spécifiques sont détectés dans le jaune des œufs des poules immunisées dès la troisième semaine suivant la première injection. Chacune des immunisations de rappel permet ensuite d'accroître les titres en IgY spécifiques. A la suite du quatrième

rappel, les titres en IgY spécifiques se stabilisent durant plusieurs semaines sans qu'une nouvelle injection ne soit nécessaire.

2.2. Séchage du jaune d'œuf pour la production d'un additif alimentaire pour volailles

Les caractéristiques des poudres produites par les deux procédés de séchage envisagés sont données au Tableau 2.

Tableau 2. Caractéristiques des poudres de jaunes d'œufs produites en fonction du mode de séchage.

		LYO*	ATO*
Rendement en poudre	g/l	270	227
Rendement en IgY	%	96,7	80,6
MS	%	98,4	96,6
EE	% MS	58,9	57,6
MAT (6.25 x N)	% MS	31,5	31,5
EB	kJ/g MS	7796	7476

* LYO : Lyophilisation ; ATO : Atomisation.

Le rendement massique se révèle plus élevé lors de la lyophilisation comparativement à l'atomisation. D'un point de vue immunologique, l'atomisation est plus dégradante pour les anticorps du jaune d'œuf que la lyophilisation qui n'a que peu d'impact sur leur activité. Ces chiffres sont en accord avec les résultats publiés par Jaradat et Marquardt (2000) qui relatent en outre que la matrice protéo-lipidique constituée par le jaune d'œuf confère aux IgY une protection lors des processus de séchage. La qualité nutritionnelle des deux poudres obtenues est similaire pour l'ensemble des paramètres chimiques dosés. Ces poudres de jaunes d'œufs sont caractérisées par une teneur importante en matières protéiques et en matières grasses.

2.2. Evaluation *in vivo* de l'efficacité de l'additif alimentaire au travers d'un challenge bactérien

Les régimes épreuves distribués sont similaires pour tous les paramètres chimiques mesurés (EB, EE, MAT, CB ; résultats non montrés) ainsi que pour leur concentration en IgY totaux (0,060 % MF \pm 0,009). Ils diffèrent donc uniquement en ce qui concerne leurs teneurs en IgY spécifiques (Tableau 3). L'activité des IgY spécifiques varie en fonction de la proportion de JEL-HI présente dans le régime. Un signal est mesuré pour les régimes T5 et TN2 (ne contenant pas de JEL-HI) indiquant une faculté de réactivité croisée des IgY non spécifiques présents dans le jaune d'œuf NI.

Les performances réalisées par les animaux sont présentées au Tableau 4. Les animaux sont de PV identiques lors de l'assignation à un régime. Par contre, dès l'infection, les poids des animaux ne sont plus similaires ($p < 0,001$; données non montrées).

Cette différence de poids au démarrage du challenge justifie l'introduction du PV à sept jours comme covariable dans le modèle statistique.

Tableau 3. Teneurs en IgY anti-SE/ST dans les régimes distribués (n = 3).

Régime épreuve	Teneur en IgY anti-SE*	Teneur en IgY anti-ST*
T1	0,57	0,53
T2	0,53	0,55
T3	0,44	0,45
T4	0,35	0,38
T5	0,15	0,20
TN1	0,56	0,56
TN2	0,19	0,20

* Densité optique à la dilution 500 fois lue à 450 nm.

Les résultats montrent que la croissance des animaux varie significativement en fonction des régimes épreuves reçus. En particulier, l'absence de jaune d'œuf dans la ration d'animaux infectés (régime TP) influence très négativement l'ingestion et la croissance ($p < 0,001$). Cela pourrait refléter l'impact négatif de la charge élevée en salmonelles inoculée aux animaux sur leurs performances zootechniques, déjà évoqué par d'autres équipes effectuant des challenges à *Salmonella* (Hegazy et Adachi, 2000). L'apport de JEL parvient à compenser, au moins partiellement, ces effets négatifs liés à l'infection sans toutefois permettre d'égaliser les PV moyens à 28 jours des animaux non contaminés (régimes TN1 et TN2). Les animaux recevant les régimes complétés présentent des IC similaires ($p > 0,05$) qu'ils soient infectés ou non. C'est au niveau de l'ingestion que la différence se marque et ce dès la première semaine suivant l'infection ($p < 0,01$; résultats complets non montrés). L'absence de liaison claire entre la dose d'IgY spécifiques administrée et les performances des animaux infectés pose question. Notamment, le régime T5 (enrichi uniquement en jaune NI) confère lui aussi un effet positif sur les performances d'animaux contaminés expérimentalement. L'existence d'un potentiel anti-salmonelles du jaune NI serait en accord avec les résultats de Kassaify et Mine (2004) qui parvenaient à réduire ou éliminer l'infection de poules pondeuses par ST au niveau du tube digestif par l'ajout dans la ration alimentaire de 5 à 10 % de poudre de jaune d'œufs provenant de poules non immunisées. Ils n'étaient toutefois pas parvenus à identifier le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) la poudre de jaune d'œuf pouvait interférer avec le pathogène. Nous voyons à ce stade plusieurs hypothèses explicatives à nos résultats. D'une part, il est possible que les IgY non spécifiques de SE ou ST et présents dans le régime T5 soient capables d'améliorer les défenses immunitaires de l'animal. Une faible activité spécifique a par ailleurs été mise en évidence dans ce même régime (Tableau 3). Celle-ci pourrait représenter une dose suffisante d'IgY à administrer, ce qui pourrait expliquer le fait

que l'impact sur les performances n'ait pu être relié à la dose d'IgY spécifiques reçus. D'autre part, le bénéfice octroyé par le régime T5 pourrait également indiquer que l'influence sur les performances d'une incorporation de poudre de jaune d'œuf dans la ration n'est pas liée aux seuls IgY anti-SE/ST. Ainsi, d'autres composés potentiellement bénéfiques contenus dans le jaune d'œuf (Nau et al., 2003) pourraient expliquer la compétitivité du régime T5 par rapport aux autres traitements enrichis en IgY anti-SE/ST. Cette présence d'autres facteurs bénéfiques dans les poudres de jaune distribuées pourraient dès lors avoir rendu moins visible l'impact des IgY anti-SE/ST. Enfin, nous ne pouvons exclure une dégradation importante des IgY distribués dans la

première partie du tractus digestif. En effet, les immunoglobulines subissent la digestion protéolytique au même titre que toute autre protéine. Si la dégradation encourue par les anticorps est amoindrie du fait de l'incorporation sous forme de poudre de jaune entier (Marcq et al., 2008), la digestion a malgré tout pu affecter sensiblement le taux d'IgY parvenant à l'intestin des animaux.

Il sera à présent intéressant d'évaluer l'impact qu'ont pu avoir ces régimes enrichis en JEL sur la contamination intestinale par SE et ST. L'étude se poursuit dans ce sens actuellement.

Tableau 4. Synthèse des performances zootechniques réalisées en fonction des régimes distribués. Poids vifs (PV) à 1 jour (g) ; ingestions cumulées entre 7 et 28 jours (g MS/j) ; PV à 28 jours (g) et indices de consommation (IC) cumulés entre 7 et 28 jours (g MS/g).

	T1	T2	T3	T4	T5	TP	TN1	TN2	SEM	p
PV 1 j	49,1	49,3	49,0	49,9	49,2	48,4	49,4	48,4	0,194	NS
Ingestion	65,0 ^b	62,0 ^b	63,0 ^b	66,9 ^b	64,7 ^b	54,6 ^a	77,0 ^c	74,9 ^c	1,32	***
PV 28 j	1253 ^b	1203 ^b	1185 ^b	1295 ^b	1262 ^b	1020 ^a	1412 ^c	1429 ^c	15,5	***
IC	1,28 ^a	1,30 ^a	1,33 ^a	1,28 ^a	1,28 ^a	1,40 ^b	1,30 ^a	1,31 ^a	0,01	*

^{a,b} : Dans une même ligne, les moyennes affectées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) ; NS : $p > 0,05$; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. SEM : erreur standard sur la moyenne.

CONCLUSION

Le contrôle des salmonelles et autres microorganismes zoonotiques par l'emploi d'additifs alimentaires représente un outil de choix, d'autant plus lorsque les additifs en question peuvent affecter positivement, à la fois la contamination mais aussi les performances zootechniques réalisées par les animaux. Les résultats présentés laissent entrevoir ce potentiel dans le cas du jaune d'œuf et de ses anticorps. Le JEL contribue à préserver le poulet des conséquences néfastes d'une infection, ce qui pourrait s'expliquer par une amélioration de la défense immunitaire de l'animal. Bien que les résultats n'aient pu être clairement reliés à la dose d'IgY spécifiques

reçue, une amélioration de la consommation, du gain de poids et de l'indice de consommation ont été observés à la suite d'un ajout de poudre de jaunes d'œufs dans la ration alimentaire.

REMERCIEMENTS

Ces travaux sont financés par la Direction Générale de l'Agriculture du Ministère de la Région wallonne. Nous remercions en outre J.-C. Bergen, S. D'Hoostelaere, V. Graide, P. Peeters et F. Walmacq pour leur aide ainsi que Biopole S.A. (Les Isnes, Belgique) et ATISA asbl (Gembloux, Belgique) pour leur assistance technique lors de la production des poudres de jaunes d'œufs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1990. Official methods of analysis, Arlington, VA.
- Chalghoumi R., Thewis A., Portetelle D., Beckers Y., 2008. *Poult. Sci.*, 87, 32-40.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2007a. *The EFSA Journal*, 130, 3-352.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2007b. *The EFSA Journal*, 98, 1-85.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2008. *The EFSA Journal*, 625, 1-32.
- Hegazy S.M., Adachi Y., 2000. *Poult. Sci.*, 79, 331-335.
- Jaradat Z.W., Marquardt R.R., 2000. *Food Agric. Immunol.*, 12, 263-272.
- Kassaify Z.G., Mine Y., 2004. *Poult. Sci.*, 83, 1497-1506.
- Li X., Shuai J., Fang W., 2006. *J. Zhejiang Univ. Sci.*, 7, 922-928.
- Marcq C., Graide V., Beckers Y., Portetelle D., Thewis A., 2008. 13th Conference on Food Microbiology, Ghent, BE, 106-107.
- Nau F., Anton M., Nys Y., 2003. Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, FR.
- Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H.R., 2005. *Altern. Lab. Anim.*, 33, 129-154.