

Sous la direction de
Ilaria Capua, Dennis J. Alexander

Influenza aviaire et maladie de Newcastle

Un manuel de diagnostic de terrain et de laboratoire

Préface de Bernard Vallat et Joseph Domenech



Influenza aviaire et maladie de Newcastle

Springer

Paris

Berlin

Heidelberg

New York

Hong Kong

Londres

Milan

Tokyo

Sous la direction de
Ilaria Capua • Dennis J. Alexander

Influenza aviaire et maladie de Newcastle

Un manuel de diagnostic de terrain
et de laboratoire

Traduction supervisée par Véronique Jestin,
Chef d'unité virologie, immunologie, parasitologie aviaires
et cunicoles et responsable du Laboratoire national de
référence pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle

Préface de Bernard Vallat (OIE) et Joseph Domenech (FAO)

Coordinateurs

Ilaria Capua

Chef du service de virologie
Directeur de l'OIE/FAO et du
laboratoire national de référence
pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Legnaro, Padoue, Italie
icapua@izsvenezie.it

Dennis J. Alexander

Ancien directeur du
laboratoire de référence de l'UE OIE/FAO
pour l'influenza aviaire
et la maladie de Newcastle
Agences des laboratoires vétérinaires
Weybridge, Royaume-Uni.
d.j.alexander@vla.defra.gsi.gov.uk

Additional material to this book can be downloaded from <http://extras.springer.com>.

ISBN 978-2-287-99336-7 Springer Paris Berlin Heidelberg New York

© Springer-Verlag France, Paris, 2013

Springer est une filiale de Springer Science+Business Media
springer.com

Cet ouvrage est la traduction de la version anglaise :

Avian Influenza and Newcastle Disease : A Field and Laboratory Manual by Ilaria Capua and Dennis J. Alexander

ISBN 978-88-470-0825-0

© Springer-Verlag Italia 2009

Imprimé en France

Cet ouvrage a été produit avec la collaboration technique de L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Les points de vue exprimés dans ce livre sont ceux des auteurs et ne reflètent pas nécessairement ceux de la FAO.

Cet ouvrage est soumis au copyright. Tous droits réservés, notamment la reproduction et la représentation, la traduction, la réimpression, l'exposé, la reproduction des illustrations et des tableaux, la transmission par voie d'enregistrement sonore ou visuel, la reproduction par microfilm ou tout autre moyen ainsi que la conservation des banques de données. La loi française sur le copyright du 9 septembre 1965 dans la version en vigueur n'autorise une reproduction intégrale ou partielle que dans certains cas, et en principe moyennant le paiement des droits. Toute représentation, reproduction, contrefaçon ou conservation dans une banque de données par quelque procédé que ce soit est sanctionnée par la loi pénale sur le copyright.

L'utilisation dans cet ouvrage de désignations, dénominations commerciales, marques de fabrique, etc. même sans spécification ne signifie pas que ces termes soient libres de la législation sur les marques de fabrique et la protection des marques et qu'ils puissent être utilisés par chacun.

La maison d'édition décline toute responsabilité quant à l'exactitude des indications de dosage et des modes d'emplois. Dans chaque cas il incombe à l'utilisateur de vérifier les informations données par comparaison à la littérature existante.

Les coordinateurs et les éditeurs remercient Papi Editore de les avoir autorisés à reproduire une partie de l'iconographie publiée dans l'ouvrage *A colour Atlas and Text on Avian Influenza* (I. Capua, F. Mutinelli).

© 2001, Papi Editore

Illustration de couverture : reproduite avec l'aimable autorisation d'Amelio Meini

Maquette de couverture : Jean-François Montmarché

Mise en page : Thomson Digital

Cet atlas est dédié à la mémoire de Dr Giovanni Vincenzi, ancien chef des services vétérinaires de la région de la Vénétie en Italie, en reconnaissance sincère pour sa contribution inestimable dans le domaine de la santé publique vétérinaire.



Remerciements

Pour la version française, les auteurs remercient tout particulièrement Angélique Angot pour son aide précieuse et son soutien à la validation de la traduction, et Paul-Pierre Pastoret, Conseiller scientifique à l'OIE.

Les coordinateurs et les éditeurs expriment leur gratitude envers Giovanni Ortali, Veniero Furlattini, Anna Toffan, Roberta De Nardi, Ezio Bianchi, Francesco Prandini, Filippo Cilloni pour leurs contributions et envers toutes les personnes qui ont fourni l'iconographie contenue dans ce manuel.

Nous sommes particulièrement reconnaissants envers Roberta Bassan, Anna Bidese, Marilena Campisi, Michaela Mandelli et Marta Vettore pour leur soutien au niveau de l'organisation et du secrétariat.

Nos remerciements particuliers vont à Amelio Meini pour ses croquis et dessins ainsi que pour le tableau illustrant la couverture.

Les coordinateurs et les éditeurs souhaitent également exprimer leur gratitude envers les collègues suivants, pour leur avoir accordé l'autorisation de reproduire des images scientifiques et des dessins leur appartenant :

Nadim Mukhles Amarin Boehringer Ingelheim, office régional du Moyen-Orient, Dubai, EAU

Daniel Baroux Laboratoire départemental d'analyses de l'Ain, chemin de la Miche, 01000 Bourg-en-Bresse, France

Caroline Brojer Service des plantes et animaux sauvages, des poissons et de l'environnement, Institut national vétérinaire (SVA) SE-751 89 Uppsala, Suède

Corrie Brown Service de pathologie vétérinaire, Université de Médecine Vétérinaire, 501 D.W. Brooks Drive, Athens, GA 30602-7388, USA

Antonio Camarda Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Sezione Patologie Aviarie, Str. Prov. per Casamassima Km 3, Valenzano, 70010 Bari, Italie

Ahmed Abd ElKarim Consultant privé, Giza, Caire, Égypte

Victor Irza Centre fédéral pour la santé animale (FGI-ARRIAH), Fédération de Russie

Desiree Jansson Service des volailles, SVA, 75189 Uppsala, Suède

Walid Hamdy Kilany Institut de recherche sur la santé animale, Laboratoire national pour le contrôle de la qualité vétérinaire de la production avicole, rue Nadi El Saied, Dokki, Giza, Égypte

Amelio Meini Intervet Italia, Via Tobagi 7, 20068 Peschiera Borromeo, Italie

Zenon Minta Institut national de recherche vétérinaire, Al.Partyzantow, 57, Pulawy, PL-24-100, Pologne

Vladimir Savic Directeur de l'Institut vétérinaire croate, chef du centre avicole, Zagreb, Croatie

Thierry Van den Berg Centre de recherche vétérinaire et agrochimique, Groeselenberg 99B-1180 Bruxelles, Belgique

A.H. Zahdeh Vétérinaire privé, Jordanie

L'élevage des volailles est l'une des principales activités agricoles permettant de procurer à la planète entière des protéines de grande qualité.

Au cours du siècle dernier, les pays industrialisés et de nombreux pays en transition ou en développement sont passés d'un élevage à prédominance familiale à un élevage avicole de type intensif intégré.

Les maladies virales sont très présentes chez les volailles, mais du fait du peu de signes cliniques spécifiques ou de lésions pathognomoniques liées aux différentes affections, elles sont souvent mal diagnostiquées.

Les infections des volailles par le virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP), ou celui responsable de la maladie de Newcastle (ND), s'accompagnent généralement d'une forte mortalité et de pertes économiques importantes pour l'industrie productrice de volaille, non seulement du fait de la perte d'animaux ou de productivité résultant directement de la maladie, mais également du fait des restrictions imposées au commerce et des embargos.

De plus, certaines souches de l'IAHP sont pathogènes pour l'homme, chez qui elles entraînent régulièrement des conséquences mortelles. L'infection mortelle d'autres mammifères comme les félidés ne peut être négligée.

L'influenza aviaire hautement pathogène et la maladie de Newcastle sont considérées comme étant les deux maladies les plus importantes des volailles.

L'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont toujours reconnu l'importance cruciale de ces deux maladies et ont répondu aux épizooties de manière proactive, par la rédaction de lignes directrices, ainsi que d'autres publications et recommandations, par l'organisation de missions dans les pays où ces maladies surviennent afin d'évaluer la situation et de fournir de l'expertise et du support à leurs Pays Membres. Même si la situation s'est améliorée ces dernières années, la vigilance reste de mise. Prenant conscience du défi auquel la communauté vétérinaire fait face pour améliorer le statut sanitaire des animaux à l'échelle mondiale, ce manuel a été conçu comme un instrument d'appui aux laboratoires, ainsi qu'aux Services vétérinaires officiels et privés, pour faciliter le diagnostic et la gestion des foyers d'influenza aviaire et de maladie de Newcastle. On peut constater que l'objectif a été atteint. L'amélioration des efforts de diagnostic à un niveau global se traduira inévitablement par une amélioration parallèle des stratégies de contrôle, avec pour résultat une meilleure sécurité alimentaire et le maintien de la rentabilité de l'industrie productrice de volaille dans un environnement sain tant pour l'homme que pour l'animal.

Nous tenons à féliciter et à remercier les deux coordinateurs de cet ouvrage, Drs Ilaria Capua et Dennis J. Alexander, ainsi que tous les auteurs sollicités. Nous remercions également le Dr Véronique Jestin, pour avoir supervisé la traduction de la version française, et Madame Nathalie Huilleret des éditions Springer.

Nous souhaitons une large diffusion à cet ouvrage extrêmement utile.

*Docteur Bernard Vallat
Directeur général
Organisation mondiale
de la santé animale (OIE)*

*Docteur Joseph Domenech
Ex Chef du service santé animale
et Chef vétérinaire officiel
Organisation des Nations unies
pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)*

Remarques préliminaires

Cette publication témoigne des efforts entrepris ces dernières années par le personnel du Laboratoire international de référence de l'OIE/FAO (LIR) pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, à l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) de Padoue en Italie, en réponse à la crise mondiale de l'influenza aviaire. Les virologues, les diagnosticiens, les biologistes moléculaires et les épidémiologistes du LIR ont rassemblé les informations recueillies dans le cadre de la gestion et du diagnostic des épizooties d'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle à travers le monde, avec pour objectif l'amélioration de la santé animale et publique. Nous souhaitons adresser nos sincères remerciements à tous les membres du personnel de l'IZSVe impliqués dans ce projet, au Dr D.J. Alexander pour ses conseils et ses contributions et au Dr B. Vallat et au Dr A. Petrini de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) pour le temps et le soutien qu'ils ont pu nous accorder. Cette publication n'aurait pas été possible sans le soutien de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la Commission européenne, le ministère italien de la Santé et les Services vétérinaires de la région de la Vénétie, qui ont promu et soutenu financièrement le LIR à travers des projets ciblés, axés sur la collaboration internationale. Notre reconnaissance va également à nos collaborateurs pour la mise à disposition de données et de tableaux, conférant à cette publication un caractère unique.

*Giuseppe Dalla Pozza
Président
Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie*

*Igino Andrighetto
Directeur général
Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie*

*Stefano Marangon
Directeur scientifique
Istituto Zooprofilattico
Sperimentale delle Venezie*

Je suis honoré par l'opportunité qui m'est offerte de présenter ce livre, qui est le reflet concret des niveaux d'excellence atteints par les scientifiques italiens travaillant dans le secteur de la santé publique vétérinaire. Le laboratoire de référence italien de l'OIE et de la FAO pour la maladie de Newcastle et l'influenza aviaire, basé à l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie de Padoue en Italie, est reconnu sur le plan international comme étant l'un des principaux laboratoires dans ce domaine en matière de recherche et de diagnostic. Il a conduit à la réalisation de nombreuses percées dans ses domaines d'expertise, y compris la mise en place de stratégies de vaccination visant à la maîtrise et à l'élimination de l'influenza aviaire à déclaration obligatoire, ainsi que la réalisation d'une campagne internationale pour le partage des données génétiques obtenues à partir des isolats d'influenza aviaire et impliquant des instituts de recherche médicale et vétérinaire. De plus, l'institut a appuyé et soutenu les efforts entrepris à travers le monde dans les domaines de la recherche et du diagnostic, en particulier sur le continent africain, en Asie centrale et au Moyen-Orient, mettant, de ce fait, des données pertinentes à disposition de l'ensemble de la communauté scientifique dans ses efforts pour gérer la menace que représente l'influenza aviaire. Le réseau mondial établi en réponse à la crise du H5N1, et en particulier la coopération entre les pays méditerranéens, africains et arabes, a ouvert la voie à des collaborations productives dans tous les domaines de la santé vétérinaire publique et a permis de progresser constamment vers l'objectif global d'amélioration de la santé publique à travers le monde.

Romano Marabelli
Chef des services vétérinaires italiens

Cette publication fait suite à un premier volume traitant de ce sujet et intitulé *An Atlas and Text on Avian Influenza*, publié en 2001 avec le soutien de la région de la Vénétie. La première édition servit à la diffusion de l'information recueillie par le personnel de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie durant l'épizootie italienne d'influenza aviaire H7N1 de 1999–2000, présageant une série d'épizooties dévastatrices en Europe, en Amérique, en Asie et en Afrique. Ilaria Capua et son équipe scientifique, en collaboration avec Dennis Alexander, ont recueilli les données générées sur le plan international entre 1999 et 2008 sur les infections provoquées par l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle. Des informations concernant l'épidémiologie, les signes cliniques, la pathologie, les techniques de laboratoire et une importante quantité de figures et de tableaux ont été rassemblées intelligemment au sein de cette publication destinée à soutenir les efforts des diagnosticiens, des scientifiques et des vétérinaires officiels dans le cadre de la gestion de ces infections.

Nous souhaitons nous joindre aux auteurs pour reconnaître le rôle clef du Dr Giovanni Vincenzi, auquel ce livre est dédié, dans la gestion des crises relatives à la santé animale ayant affecté le Nord-Est de l'Italie lorsqu'il était au poste.

Nous exprimons notre reconnaissance aux éditeurs et auteurs de cette publication qui deviendra certainement un guide essentiel dans la lutte contre l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle au niveau mondial.

Giancarlo Galan
Gouverneur de la région de Vénétie

Elena Donazzan
Chef des autorités de santé vétérinaire
Région de Vénétie

Ces derniers temps, la propagation des virus de l'influenza aviaire (IA) à travers le monde, en particulier les virus IA hautement pathogènes appartenant spécifiquement au sous-type H5N1, ont mis en péril la vie des petits établissements avicoles ruraux qui avaient été historiquement menacés par les virus de la maladie de Newcastle (ND). L'apparition de ces deux infections à l'échelle mondiale menace aussi bien les systèmes d'élevage avicole intensifs que les élevages en plein air.

Ces maladies présentent de nombreux points communs, notamment un taux de mortalité élevé des troupeaux et certaines conclusions sur les plans cliniques et pathologiques. Elles peuvent donc facilement être mal diagnostiquées ou confondues l'une avec l'autre ou avec d'autres maladies virales ou bactériennes.

Afin de réduire l'impact et la propagation de l'IA et de la ND, il est impératif de diagnostiquer la maladie de façon correcte et de mettre en œuvre des mesures appropriées pour contenir l'infection et éliminer définitivement le virus de la zone contaminée. Il a été démontré que les deux maladies se propagent facilement à travers les frontières et sur des continents entiers. L'information relative à leur épidémiologie est donc essentielle à l'amélioration des directives existantes en ce qui concerne leur maîtrise.

La conception de ce manuel est le fruit des efforts entrepris dans le but de guider les laboratoires de référence internationaux, d'où l'acquisition d'expérience et d'information provenant des épizooties ayant eu lieu dans de nombreux pays du monde. Notre intention est de fournir aux vétérinaires et aux techniciens un manuel de terrain et de laboratoire contenant toutes les informations se rapportant au diagnostic et à la gestion d'une épizootie d'IA ou de ND. Nous y avons également inclus, à l'usage des autorités vétérinaires, des informations et documents d'appui permettant de résoudre leurs problèmes de gestion.

Le CD-Rom, joint à cette publication, a pour objectif de proposer aux formateurs et aux enseignants d'université des diapositives et des vidéoclips des infections rencontrées sur le terrain et des infections obtenues par voie expérimentale ; cela permettra ainsi aux étudiants et aux stagiaires de découvrir les aspects cliniques et pathologiques de l'IA et de la ND. Des fichiers PDF des protocoles et des formulaires de demandes peuvent également être téléchargés si besoin.

Nous pensons que cette publication sera utile aux professionnels concernés par les élevages d'oiseaux. Enfin nous sommes convaincus que l'amélioration des communications et du diagnostic favorisera une plus grande disponibilité de l'information essentielle à une meilleure compréhension de l'écologie, de l'épidémiologie et des implications de ces maladies sur la santé animale et humaine.

Table des matières

1	Écologie, épidémiologie et implications sur la santé humaine des infections provoquées par le virus de l'influenza aviaire.....	1
	Ilaria Capua et Dennis J. Alexander	
2	Écologie et épidémiologie de la maladie de Newcastle	21
	Dennis J. Alexander	
3	Notification de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE)	31
	Antonio Petrini et Bernard Vallat	
4	Interventions d'urgence en cas de suspicion d'une épizootie d'influenza aviaire ou de maladie de Newcastle.....	37
	Manuela Dalla Pozza et Stefano Marangon	
5	Techniques d'examen <i>post-mortem</i> et prélèvement d'échantillons	41
	Calogero Terregino	
6	Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des infections à virus influenza aviaire ; directives pour la visite des exploitations et diagnostic différentiel.....	51
	Ilaria Capua et Calogero Terregino	
7	Diagnostic conventionnel de l'influenza aviaire	79
	Calogero Terregino et Ilaria Capua	
8	Diagnostic moléculaire de l'influenza aviaire	93
	Giovanni Cattoli et Isabella Monne	
9	Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de l'infection causée par le virus de la maladie de Newcastle ; directives pour la visite des élevages et le diagnostic différentiel	119
	Calogero Terregino et Ilaria Capua	
10	Méthode conventionnelle de diagnostic de l'infection par le virus de la maladie de Newcastle.....	129
	Calogero Terregino et Ilaria Capua	

11 Diagnostic moléculaire du virus de la maladie de Newcastle.....	133
Giovanni Cattoli et Isabella Monne	
12 Règles générales de décontamination après une épizootie d'influenza aviaire ou de maladie de Newcastle.....	139
Maria Serena Beato et Paola De Benedictis	
Sites Internet	159
Annexe 1 Checklist pour la visite de lieux suspects	161
Manuela Dalla Pozza	
Annexe 2 Formulaire d'enquête épidémiologique sur les foyers d'influenza aviaire et de maladie de Newcastle.....	163
Manuela Dalla Pozza	
Annexe 3 Procédures de biosécurité	177
William G. Dundon	
Annexe 4 Réactifs de laboratoire	183
William G. Dundon	
Annexe 5 Directives pour l'expédition des échantillons de virus d'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle aux laboratoires de référence de l'OIE	185
William G. Dundon	
Index	191

Collaborateurs

Dennis John Alexander, OBE, BTech, PhD, CBiol FIBiol, FRCPath, DSc, ancien directeur du laboratoire de référence de l'UE OIE/FAO pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, VLA Weybridge, KT15 3NB RU, d.j.alexander@vla.defra.gsi.gov.uk

Maria Serena Beato, DVM, service de virologie du laboratoire de référence de l'OIE/FAO pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle ; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie ; msbeato@izsvenezie .it

Giovanni Cattoli, DVM, PhD, chef du service de virologie du laboratoire de recherche et de développement du laboratoire de référence national et de l'OIE/FAO pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, Istituto Zooprofilattico, Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie ; gcattoli@izsvenezie.it

Manuela Dalla Pozza, DVM, service d'épidémiologie de l'Istituto Zooprofilattico, Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie, crev.mdallapozza@izsvenezie .it

Paola De Benedictis, DVM, service de virologie du laboratoire de référence national et de l'OIE/FAO pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue Italie, pdebenedictis@izsvenezie .it

William G. Dundon, BA(mod), PhD, service de virologie du laboratoire de référence national et de l'OIE/FAO pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie, wdundon@izsvenezie.it

Stefano Marangon, DVM, directeur scientifique, Istituto Zooprofilattico, Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie ; smarangon@izsvenezie.it

Isabella Monne, DVM, laboratoire de recherche et développement du laboratoire de référence national et de l'OIE/FAO pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie ; imonne@izsvenezie.it

Antonio Petrini, DVM, adjoint au chef du service de l'information, OIE, 12, Rue de Prony, 75017 Paris, France, a.petrini@oie.int

Calogero (Lillo) Terregino, DVM, PhD, chef du service de virologie diagnostique du laboratoire de référence national et de l'OIE/FAO pour la maladie de Newcastle et l'influenza aviaire, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padoue, Italie, cterregino@izsvenezie.it

Bernard Vallat, DVM, directeur général, OIE, 12, Rue de Prony, 75017 Paris, France, b.vallat@oie.int

Écologie, épidémiologie et implications sur la santé humaine des infections provoquées par le virus de l'influenza aviaire

1

Ilaria Capua et Dennis J. Alexander

1.1 Introduction

L'influenza aviaire (IA) est l'une des préoccupations majeures en matière de santé publique ayant récemment* surgi des réservoirs animaux. L'IA, sous sa forme hautement pathogène (IAHP), était connue de la communauté vétérinaire depuis la fin du XIX^e siècle lorsqu'un scientifique italien, Edoardo Perroncito, fit état de ce que l'on considère comme étant le premier cas documenté de « peste aviaire » en tant que maladie à part entière. Pourtant, pendant plus de 100 ans, l'IAHP s'était révélée être une maladie avicole se manifestant rarement et qui, la plupart du temps, touchait un nombre non significatif d'oiseaux. En général, l'application de mesures visant à éradiquer l'infection dans les zones touchées permettait à celle-ci de s'autoréguler ou de la maîtriser efficacement. Cependant, au tournant du nouveau millénaire, il y eut une nette augmentation du nombre de foyers d'IA chez les volailles. La mesure de l'impact de l'IA sur l'industrie avicole a reflété une augmentation 100 fois supérieure, avec 23 millions d'oiseaux atteints sur une période de 40 ans allant de 1959 à 1998 et plus de 200 millions entre 1999 et 2004 (Capua et Alexander 2004). De plus, en conséquence de la propagation de la lignée asiatique du virus IAHP H5N1, les implications sur la santé humaine des infections causées par l'IA furent identifiées à partir de 1997. Cette propagation a attiré l'attention de la communauté scientifique de manière drastique et a complètement modifié le regard des communautés scientifiques vétérinaire et médicale sur les infections causées par l'IA.

Plus récemment, certains foyers sont restés de faible importance alors que d'autres ont causé des dommages considérables à l'industrie avicole, notamment les épizooties italiennes de H7N1 en 1999-2000, les

épizooties hollandaises de H7N7 en 2003 et les épizooties canadiennes de H7N3 en 2004 (Tableau 1.1). Les épizooties hollandaises et canadiennes se sont propagées également à l'homme, suscitant ainsi davantage d'inquiétudes en matière de santé humaine. Bien que ces trois épizooties aient été considérées comme exceptionnelles au niveau de leur amplitude, des coûts et de l'implication sur la santé humaine, elles ne furent qu'un prélude à la propagation du virus H5N1 asiatique et aux craintes engendrées par l'émergence d'un nouveau virus pandémique chez l'homme, via la chaîne de transmission des oiseaux à l'homme.

1.2 Étiologie et émergence de l'IAHP

Les génomes des virus de l'influenza sont constitués d'une molécule d'ARN simple-brin, segmentée et de polarité négative. Ces virus sont classés dans la famille des Orthomyxoviridés. À l'heure actuelle, cette famille comporte cinq genres : les *Influenzavirus A*, les *Influenzavirus B*, les *Influenzavirus C* (ces genres étaient considérés au départ comme étant des « virus influenza de types A, B et C » et cette terminologie est encore utilisée aujourd'hui), les *Thogotovirus* et les *Isavirus*. Seuls les virus du genre *Influenzavirus A* infectent les oiseaux.

Les virus influenza de type A sont classés en sous-types, en fonction des caractères antigéniques de deux glycoprotéines de surface : l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N). À l'heure actuelle, 16 sous-types H (H1-H16) et neuf sous-types N (N1-N9) ont été identifiés. Chaque virus comporte une combinaison d'un antigène H et d'un antigène N. Tous les sous-types des virus influenza de type A, rencontrés dans la majorité des combinaisons possibles, ont été isolés d'espèces avicoles. Jusqu'à présent, seuls les virus appartenant aux sous-types H5, H7 et H10 ont été reconnus comme

*Cet ouvrage est la traduction de la version anglaise *Avian Influenza and Newcastle Disease* parue en 2009. Malgré tout le soin apporté à sa réalisation par l'éditeur et les auteurs, il est possible que certains aspects épidémiologiques ne correspondent pas aux évolutions récentes de la maladie.

Coordonné par I. Capua et D.J. Alexander, *Influenza aviaire et maladie de Newcastle*
ISBN : 978-2-287-99336-7 © Springer-Verlag Paris 2013

Tableau 1.1 Épidémiologie de virus d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) depuis 1959 : nombre approximatif d'oiseaux et autres caractéristiques pertinentes, agent causal, séquence du site de clivage, index de pathogénicité intraveineuse (IPIV), nombre d'élevages.

Virus IAHP	Sous-type	Acides aminés du site de clivage HA0 (/ = point de clivage)	IPIV	Nombre d'élevages infectés	Nombre approxi- matif de volailles concernées	Remarques
1 A/Poulet/Écosse/59	(H5N1)	PQRKKR/GLF	2,87	1 (petit élevage de poulets)	NC	Premier influenza virus appartenant au sous-type H5
2 A/Dinde/Angleterre/63	(H7N3)	PETPKRRRR/GLF	2,78	2 (dindes)	~29 000	
3 A/Dinde/Ontario/7732/66	(H5N9)	PQRKKR/GLF			8 000	
4 A/Poulet/Victoria/76	(H7N7)	PEIPKKREKR/GLF	1,76		58 000	
5 A/Poulet/Allemagne/79	(H7N7)	PEIPKKKKR/GLF		2 (1 poulet, 1 oie)	600 000 poulets 80 oies	Peu d'information publiée au sujet de ces épizooties
		PEIPKKKKR/GLF, NC PEIPKKKKKKR/GLF				
6 A/Dinde/Angleterre/199/79	(H7N7)	PEIPKKRRKR/GLF, PEIPKKRRRR/GLF, PEIPKKREKR/GLF	2,80	3 (dindes)	9 262	Plusieurs isolats d'IAHP H7 dans les alentours, aucun ne comportant N7
7 A/poulet/Pennsylvania/1370/83	(H5N2)	PQRKKR/GLF,	2,37		17 000 000	H5N2 de faible virulence et présentant le même site de clivage ; a circulé pendant 7 mois avant de muter et d'acquies la virulence
8 A/Dinde/Irlande/1378/83	(H5N8)	PQRKKKKR/GLF	2,60 2,85	4 (2 dindes, 1 croisé, 1 canard)	306 020 (8 000 dindes, 28 020 poulets, 270 000 canards)	L'inspection a montré que les canards commerciaux étaient infectés, mais aucun signe clinique n'a été observé
9 A/Poulet/Victoria/85	(H7N7)	PEIPKKREKR/GLF	2,80	1 (poulet)	240 000	IAHP confirmé dans un élevage mais les animaux ayant été en contact ont été abattus par mesure de précaution
10 A/Dinde/Angleterre/50-92/91	(H5N1)	PQRKKRTR/GLF	3,00	1 (dinde)	8 000	Virus de faible virulence (IPIV 0) comportant le même site de clivage HA0, également isolé
11 A/Poulet/Victoria/1/92	(H7N3)	PEIPKKKKR/GLF	2,71	1 (poulet)	18 000	Anticorps anti H7 retrouvés chez des oiseaux sains de la ferme touchée et des fermes avoisinantes, y compris un canard
12 A/Poulet/Queensland/667-6/94	(H7N3)	PEIPKKRRKR/GLF	2,87	1 (poulet)	22 000	

(suite)

Tableau 1.1 (suite)

		(H5N2)	PQRKRKTR/GLF	NC	NC	NC	Situation confuse due à la présence de virus H5N2 IAFP circulant toujours et à l'utilisation de vaccin
13	A/Poulet/Mexique/8623-607/94	(H5N2)	PQRKRKTR/GLF	NC	NC	NC	Virus H7N3 IPIV 2,8 ayant réémergé en 2003 ; son rapport avec le virus de 1995 est confus. Situation compliquée par des infections répandues de virus H7N3 IAFP et H9N2
14	A/Poulet/Pakistan/447/94	(H7N3)	PETPKRRKR/GLF PETPKRRKR/GLF PETPKRRNR/GLF	2,86	Nombreux	3 200 000	Virus de faible virulence (IPIV 0) également isolé avec le même motif constituant le site de clivage A/oie/Guangdong/2/96
15	A/Oie/Guangdong/1/96 A/Poulet/Hong Kong/97 A/Poulet/Eurasie&Afrique/2003	(H5N1)	PQRRRRKKR/GLF PQRRRRKKR/GLF PQRRRRKKR/GLF	2,1	Voir note en bas de page	Voir note en bas de page	
16	A/Poulet/NGS/97	(H7N4)	PEIPKRKR/GLF	2,52, 2,90 1,30 (emeus)	3 (2 poulets 1 émeu)	160 000 poulets 261 émeus	
17	A/Poulet/Italie/330/97	(H5N2)	PQRRRRKKR/GLF	3,00	8 (poulets, dindes, oies, canards, pintades, pigeons, cailles)	8000	
18	A/Dinde/Italie/99	(H7N1)	PEIPKGSRRR/GLF	3,00	413	13 732 912	H7N1 IAFP ayant circulé pendant 9 mois avant de muter et d'acquies la virulence
19	A/Poulet/Chili/2002	(H7N3)	PEKPKTCSPLSRCRETR/GLF		2,43-3,00	~700 000	
20	A/Poulet/Pays-Bas/2003	(H7N7)	PEIPKRRRR/GLF	2,94	255	>25 000 000 ^{a,b}	
21	A/Poulet/Texas/2004	(H5N2)	PQRKKR/GLF	0,00	1	6600	IAHP dû à la présence du même site de clivage que Poulet/Écosse/59
22	A/Poulet/Canada-BC/2004	(H7N3)	PENPKQAYPKRMTR/GLF	2,87		16 000 000	
23	A/Autriche/Afrique du Sud/2004	(H5N2)	PQREKRRKR/GLF	2,73		>30 000	Isolat initial ayant un IPIV de 1,19
24	A/Poulet/Cotée du Nord/2005	(H7N7)	PEIPKGRHRRPKR/GLF	3,00	3 (poulet)	219 000	

NC, non connu.

Le « virus H5N1 IAHP de lignée asiatique » dont A/oie/Guangdong/1/96 était le virus souche s'est répandu à partir du sud de la Chine depuis 2003. Des foyers ont été rapportés à travers l'Asie jusqu'en Europe et en Afrique. Le virus semble être devenu enzootique chez les volailles dans certains pays d'Asie, d'Afrique et du Moyen-Orient.

^aPropagation vers l'Allemagne (un élevage, 419 000 poulets) et la Belgique (8 élevages, 2 300 000 poulets).

^b255 lots présentaient une infection confirmée, dont 233 lots commerciaux et 22 élevages de basse-cour ou d'agrément ; de plus, les oiseaux de 1 126 lots commerciaux et 16 521 élevages d'agrément furent éliminés à titre préventif.

responsables de l'IAHP chez les espèces sensibles. Mais tous les virus H5, H7 et H10 ne sont pas virulents.

Chez tous les virus influenza de type A, l'hémagglutinine est produite à partir d'un précurseur HA0. Ce précurseur doit subir un clivage post-traductionnel par les protéases de l'hôte afin d'être fonctionnel et de permettre aux particules virales de devenir infectieuses (Vey *et al.* 1992). Le site de clivage de la protéine précurseur HA0 des virus de l'influenza aviaire de faible virulence pour les volailles (virus IAFP) est constitué d'une seule arginine ainsi que d'un autre acide aminé basique situé en position -3 ou -4. Le clivage de ces virus ne peut être effectué que par des protéases extracellulaires de l'hôte telles que des enzymes de type trypsine. La multiplication est donc restreinte aux organes de l'hôte contenant de telles enzymes, notamment ceux des systèmes respiratoire et digestif. Les sites de clivage de HA0 des virus H5 et IAHP sont formés de plusieurs résidus basiques (arginine et lysine). Ces derniers proviennent, soit d'une insertion apparente, soit d'une substitution apparente (Wood *et al.* 1993 ; Senne *et al.* 1996 ; Vey *et al.* 1992) et permettent le clivage par une ou plusieurs protéases intracellulaires ubiquitaires. Il s'agit vraisemblablement d'une ou de plusieurs endoprotéases apparentées à la subtilisine et agissant sur les proprotéines, principalement la furine (Stieneke-Gröber *et al.* 1992). Les virus H5 et IAHP sont capables de se multiplier dans tout l'organisme de l'oiseau endommageant ainsi les organes vitaux et les tissus, et entraînant la maladie et la mort.

Certains virus H10 correspondent à la définition de l'IAHP (Alexander 2008) mais ils ne possèdent pas de site de clivage multibasique et ne provoquent pas d'infection systémique. Ils sont à tropisme rénal et lorsque le virus est administré par voie intraveineuse, l'altération de la fonction de cet organe est déterminante dans la mort de l'oiseau (Swayne et Alexander 1994).

Le contraire est aussi vrai. Ainsi que l'ont rapporté Londt *et al.* (2007), au moins quatre virus présentant des caractéristiques de virulence inhabituelles ont été isolés : A/Poulet/Pennsylvanie/1/83 (H5N2), A/Oie/Guangdong/2/96 (H5N1), A/Dinde/Angleterre/87-92BFC/91 (H5N1) et A/Poulet/Texas/298313/04 (H5N2). Les sites de clivage HA0 de ces virus sont formés de plusieurs résidus d'acides aminés basiques semblables à ceux des virus IA virulents. Mais ils ne sont pas virulents envers les poulets.

Aujourd'hui, hormis les isolats H10, seuls les virus appartenant aux sous-types H5 et H7 sont responsables de l'IAHP. Il semblerait que dans la plupart des cas l'apparition de ces virus IAHP soit postérieure à l'introduction des virus IAFP H5 et H7 chez les volailles à partir des réservoirs d'oiseaux

sauvages. Cette mutation semble avoir été causée par divers mécanismes. La plupart des virus IAHP seraient apparus à la suite d'une duplication spontanée des triplets de purine, qui se serait traduite par l'insertion d'acides aminés basiques sur le site de clivage HA0. La cause la plus probable en serait une erreur de transcription par le complexe polymérase (Perdue *et al.* 1998). Toutefois, et comme le font remarquer Perdue *et al.*, il ne s'agit certainement pas là du seul mécanisme responsable de l'émergence de virus IAHP, puisque certains virus ont été engendrés par substitution nucléotidique plutôt que par insertion alors que d'autres présentent des insertions ne comportant pas de nucléotides répétés.

Les sites de clivage des virus IAHP H7N3, découverts en 2002 au Chili (Suarez *et al.* 2004) et en 2004 au Canada (Pasick *et al.* 2005), présentent des séquences d'acides aminés distinctes et inhabituelles. Ces virus ont émergé suite à des recombinaisons avec d'autres gènes (gènes des nucléoprotéines et de la matrice). Ces recombinaisons ont entraîné une insertion de 11 acides aminés sur le site de clivage du virus du Chili et de 7 acides aminés pour le virus du Canada.

Les facteurs responsables de la mutation des IAFP en IAHP ne sont pas connus. Dans certains cas, la mutation semble avoir eu lieu rapidement (sur le site du cas index) après introduction à partir d'oiseaux sauvages. Dans d'autres cas, la souche de virus IAFP avait circulé pendant plusieurs mois chez les volailles avant de muter. Il est donc impossible de prédire si cette mutation aura lieu et quand elle se fera. On peut, cependant, raisonnablement supposer que plus la circulation est importante chez les volailles, plus la probabilité de mutation en IAHP augmente. Dans certains cas, les virus IAFP appartenant aux sous-types H5 ou H7 circulent pendant de très longues périodes sans muter en une forme hautement pathogène (Davison *et al.* 2003 ; Senne *et al.* 2006 ; Senne 2007).

Certaines preuves obtenues sur le terrain et en laboratoire attestent que l'émergence de l'IAHP s'est produite après son introduction chez les volailles. En effet, des résultats d'études phylogénétiques des virus appartenant au sous-type H7 indiquent que les virus IAHP ne constituent pas une ou des lignées distinctes mais semblent être issus de souches non pathogènes (Banks *et al.* 2000 ; Röhm *et al.* 1995). Ces résultats sont appuyés par la sélection *in vitro* de mutants virulents envers les poulets, à partir d'un virus H7 non virulent (Li *et al.* 1990). L'apparition entre 1999 et 2000 en Italie de foyers d'IAFP et d'IAHP H7N1

a offert l'opportunité d'étudier les modifications génétiques conduisant à l'apparition du virus IAHP. En effet, 199 foyers d'IAFP avaient alors précédé la mutation conférant la virulence, ce qui engendra ensuite 413 foyers d'IAHP et la perte d'environ 16 millions d'oiseaux (Capua et Marangon 2007). Les analyses phylogénétiques des virus IAFP et IAHP ont suggéré que les foyers s'étaient manifestés à la suite de l'introduction du virus IAFP, dont une seule lignée avait acquis la virulence par mutation, probablement sous l'effet de processus d'évolution associés à l'adaptation du virus à un nouvel hôte (la volaille) (Capua *et al.* 2000).

Les virus IAHP ne sont pas nécessairement virulents pour toutes les espèces avicoles. La gravité clinique observée chez un hôte quelconque varie selon l'espèce avicole et selon la souche virale (Alexander 2000). En particulier, les canards ont rarement présenté de signes cliniques suite aux infections par l'IAHP avant l'émergence du H5N1 asiatique. Les autruches manifestent également une réponse clinique atypique aux infections provoquées par le virus IA : les virus IAFP et IAHP semblent provoquer des états cliniques similaires, les oiseaux adultes présentant même une certaine résistance envers l'IAHP alors que les jeunes oiseaux manifestent des signes cliniques et une mortalité similaires avec les deux pathotypes (Capua et Mutinelli 2001).

1.3 Spectre d'hôtes

Il a été établi que les virus de l'influenza aviaire infectent les oiseaux et les mammifères. En général, les premiers sont infectés plus facilement et plus efficacement que les derniers. De plus, la transmission inter et intra-espèces au sein de la classe *Aves* se produit plus couramment que dans la classe *Mammalia*. La conformation du récepteur des cellules hôtes est l'un des facteurs influençant la réceptivité à l'infection. Les virus IA se lient préférentiellement aux saccharides ayant une extrémité acide sialique (SA)- α 2,3-Gal et portés par les cellules aviaires. En revanche, les virus d'influenza humains se lient préférentiellement aux saccharides ayant une extrémité SA- α 2,6-Gal, présents en grand nombre sur les cellules épithéliales humaines. Cette différence d'affinité de liaison est considérée comme étant l'un des principaux facteurs empêchant le franchissement de la barrière d'espèce. Toutefois, le fait que les virus IA puissent parfois infecter les êtres humains et les mammifères démontre que cette barrière n'est pas insurmontable.

1.3.1 Oiseaux

Il a été démontré que les virus de l'influenza infectent une grande variété d'oiseaux (Alexander 2000, 2001 ; EFSA 2005 ; Hinshaw *et al.* 1981a ; Lvov 1978), notamment les oiseaux sauvages, les oiseaux captifs, les canards, les poulets, les dindes et les autres volailles domestiques.

Ce n'est qu'à partir du milieu des années 1970 que des recherches furent menées de façon systématique sur l'influenza chez les oiseaux sauvages. Ces recherches révélèrent la présence d'immenses réservoirs de virus d'influenza chez les populations d'oiseaux sauvages (EFSA 2005 ; Olsen *et al.* 2006 ; Stallknecht 1988 ; Stallknecht et Shane 1998), en particulier chez les oiseaux aquatiques de la famille des Anatidés et de l'ordre des Ansériformes. Stallknecht et Shane (1998) relèvent lors de leurs enquêtes un total de 21 318 échantillons provenant de toutes les espèces et conduisant à l'isolement de 2 317 virus (10,9 %). Toutefois, 14 303 de ces échantillons ont été prélevés à partir d'oiseaux appartenant à l'ordre des Ansériformes et ont abouti à 2 173 isolats (15,2 %). Les taux d'isolement venant en deuxième et troisième position étaient respectivement de 2,9 % chez les Passériformes et de 2,2 % chez les Charadriiformes. Mais il faut comparer ces résultats au taux d'isolement général de 2,1 % obtenu à partir des oiseaux autres que les canards et les oies. Les études menées par Sharp *et al.* (1993) suggérèrent cependant que les oiseaux Ansériformes ne servaient pas de réservoir à tous les virus d'IA. Il est probable qu'une partie du réservoir de gènes de l'influenza soit maintenue chez les oiseaux de rivage et les mouettes ; la majeure partie des virus influenza isolés chez ces oiseaux appartenant à un sous-type différent de celui qui a été isolé chez les canards (Kawaoka *et al.* 1988).

Avant l'actuelle épizootie d'H5N1, l'IAHP n'a touché significativement les oiseaux sauvages qu'en une seule occasion, notamment en Afrique du Sud en 1961 où elle entraîna la mort d'environ 1 300 sternes (Beccker, 1966). L'IAHP semblait donc être une maladie restreinte aux oiseaux domestiques et les oiseaux sauvages n'étaient généralement porteurs que des formes faiblement pathogènes de ces virus. La situation sans précédent survenue en Asie entraîna la propagation de l'infection vers les populations naïves d'oiseaux sauvages. L'hypothèse fut notamment émise selon laquelle la présence de virus ayant causé la mort de nombreuses oies à tête barrée chez les oiseaux migrants du lac Qinghai dans l'Ouest de la Chine, aurait pu avoir constitué le moyen par lequel le virus H5N1 se

serait répandu vers l'ouest et le sud (Chen *et al.* 2005 ; Liu *et al.* 2005). Toutefois, presque tous les oiseaux sauvages chez lesquels le virus IAHP H5N1 asiatique avait été isolé étaient morts ou agonisants. De plus, la période d'incubation de cette maladie chez les oiseaux migrateurs est inconnue et présente sans doute une variabilité considérable au sein des familles et des espèces taxonomiques. En termes simples, la communauté scientifique ne dispose pour l'instant que d'une indication des espèces pouvant être infectées et pouvant succomber au virus. Certaines connaissances et informations ne sont pas disponibles : on ne connaît pas toutes les espèces sensibles à l'infection, ni la période d'incubation pour les oiseaux qui développent effectivement un état clinique, ni leur capacité à voler sur des distances significatives lorsqu'ils sont infectés, ni les données relatives à leur parcours, pas plus que la durée et le titre de l'excrétion virale. Certains rapports sont alarmants, notamment l'isolement du H5N1 IAHP chez des individus apparemment sains appartenant à trois espèces d'oiseaux migrateurs du lac Qinghai, un an après la première détection du virus à cet endroit (Lei *et al.* 2007). Actuellement, seules des hypothèses peuvent être formulées quant aux conséquences éco-épidémiologiques de cette propagation du virus IAHP vers les oiseaux sauvages.

Les efforts de surveillance continue des populations d'oiseaux sauvages d'Eurasie et d'Afrique suggèrent toutefois que le virus H5N1 IAHP n'est actuellement pas réellement enzootique chez les oiseaux sauvages. L'apparition du H5N1 chez les oiseaux sauvages d'Europe et de Méditerranée en 2006 et 2007 correspondait probablement à une situation exceptionnelle et pourrait même être considérée comme ayant été un phénomène qui s'est limité de lui-même. La poursuite des efforts de surveillance entrepris en collaboration avec les ornithologues fournira les données supplémentaires permettant de tirer des conclusions définitives sur ce point.

Les virus H5N1 asiatiques et leurs descendants ont infecté divers oiseaux sauvages en Europe, dont la majorité étaient des oiseaux aquatiques. Parmi ceux-ci, les cygnes tuberculés (*Cygnus olor*) semblent avoir été l'espèce la plus affectée (Alexander 2007).

1.3.2 Infections d'influenza aviaire chez les mammifères

1.3.2.1 Porcs

De toute évidence, les porcs jouent un rôle crucial au niveau de l'écologie et de l'épidémiologie de l'influenza ; principalement en raison de leur double

sensibilité envers les virus humains et aviaires. Les tissus de porc possèdent des saccharides portant à la fois des extrémités SA- α 2,3-Gal et SA- α 2,6-Gal. Ils sont donc considérés comme étant des « creusets » potentiels pour les virus de la grippe à partir desquels des virus réassortis pourraient émerger. Kida *et al.* (1994) ont démontré expérimentalement que les porcs étaient sensibles à l'infection par au moins un virus représentatif de chacun des sous-types H1–H13.

Aux États-Unis, il a été constaté que les virus H1N1 de la grippe porcine classique sont couramment introduits chez les dindes à partir de porcs infectés. Dans certains cas, des affections porcines semblables à la grippe ont immédiatement été suivies de signes de maladie chez les dindes (Halvorson *et al.* 1992 ; Mohan *et al.* 1981 ; Pomeroy 1982). Des études génétiques menées sur des virus H1N1 obtenus chez les dindes aux États-Unis ont révélé un taux élevé d'échanges génétiques et de réassortiment entre les virus influenza de type A provenant, respectivement, des dindes et des porcs (Wright *et al.* 1992). En Europe, les virus aviaires H1N1 furent transmis aux porcs, s'y sont établis, puis furent réintroduits chez les dindes à partir des porcs (Ludwig *et al.* 1994 ; Wood *et al.* 1997). Le virus H1N1 fut indépendamment introduit chez les porcs à partir d'oiseaux en 1979 en Europe (Pensaert *et al.* 1981). Une introduction semblable se produisit en Asie au début des années 1990, mais les virus impliqués étaient génétiquement différents de ceux d'Europe (Guan *et al.* 1996). Des virus H9N2 furent introduits chez les porcs dans le Sud-Est de l'Asie (Peiris *et al.* 2001). Des infections de porcs par des virus appartenant aux sous-types H4, H5 et H9 furent confirmées d'un point de vue sérologique (Karasin *et al.* 2004). Au cours de l'épizootie d'IAHP H7N7 survenue en 2003 aux Pays-Bas, 13 troupeaux de porcs provenant de fermes abritant des volailles infectées ont présenté des anticorps dirigés contre le sous-type H7, et ce bien qu'aucun virus n'ait été détecté (Loeffen *et al.* 2003, 2004). Par ailleurs, des virus aviaires appartenant aux sous-types H3N3 et H4N6 avaient été isolés chez les porcs au Canada (Karasin *et al.* 2000, 2004). De toute évidence, l'introduction de virus IA chez les porcs n'est pas un phénomène rare. Néanmoins, les seuls sous-types s'étant réellement établis chez les populations de porcs et se transmettant facilement au sein d'un lot et entre lots sont H1N1, H3N2 et les virus réassortant H1N2. Les analyses génotypiques des isolats de ces sous-types suggèrent, cependant, qu'il peut s'agir de réassortiments de virus provenant de différentes espèces de souches hôtes (porcine, humaine et aviaire).

L'infection naturelle de porcs par H5N1 fut constatée de manière sporadique et non documentée

(Van Reeth, 2007). Trois infections furent également réalisées expérimentalement à l'aide d'un total de huit virus H5N1. Six de ces virus se multiplièrent chez les porcs, malgré des signes cliniques bénins ou non apparents et des taux d'excrétion virale peu élevés. La transmission de porc à porc ne fut observée dans aucune des expériences (Choi *et al.* 2005 ; Isoda *et al.* 2006 ; Short-ridge *et al.* 1998).

1.3.2.2 Chevaux

Des cas isolés d'infection de chevaux par des virus appartenant aux sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 ont été cités (Tůmová 1980), mais seuls les sous-types H7N7 et H3N8 de l'influenza de type A furent responsables d'infections grippales chez ces animaux ; ces virus appartenaient à des lignées distinctes du point de vue phylogénétique. Toutefois, l'examen de virus H3N8 isolés lors des épizooties sévères de 1989 et 1990 touchant les chevaux des provinces du Jilin et du Heilongjiang dans le Nord-Est de la Chine, a démontré que ces virus étaient différenciables des autres virus H3N8 équins, au niveau antigénique et génétique. Guo *et al.* (1992) en conclurent alors que ce virus avait une origine aviaire récente et s'était probablement transmis directement aux chevaux, sans réassortiment. Ce virus ne semble pas s'être établi dans la population équine. Actuellement, l'infection naturelle des chevaux par H5N1 n'a pas été mise en évidence.

1.3.2.3 Mammifères marins

Au cours des années 1979 et 1980, aux alentours de la péninsule du cap Cod aux États-Unis, environ 500 phoques (*Phoca vitulina*), soit environ 20 % de la population des phoques, moururent d'une pneumonie hémorragique aiguë. Des virus influenza de type A appartenant au sous-type H7N7 furent isolés à maintes reprises à partir de poumons ou de cerveaux de phoques morts (Lang *et al.* 1981). Il a été démontré que le virus infectant les phoques était très étroitement apparenté aux virus IA, aussi bien au niveau antigénique que génétique (Webster *et al.* 1981) et pouvait avoir été transmis directement aux phoques, sans réassortiment.

En 1983, il y eut davantage de morts (2-4 %) chez les phoques des côtes de la Nouvelle Angleterre aux États-Unis. Le virus influenza de type A appartenant au sous-type H4N5 fut isolé. Les huit gènes de ce

virus étaient à nouveau manifestement d'origine aviaire (Webster *et al.* 1992). Suite à l'inspection menée sur les phoques de la péninsule du cap Cod, deux virus influenza de type A appartenant au sous-type H4N6 furent isolés en 1991, et trois autres appartenant au sous-type H3N3 en 1992. Tous provenaient de phoques retrouvés morts, apparemment d'une pneumonie virale (Callan *et al.* 1995). Les caractérisations antigénique et génétique révélèrent que les deux virus ayant pénétré la population de phoques étaient aviaires.

Deux virus appartenant aux sous-types H13N2 et H13N9 furent isolés chez un seul globicéphale ayant échoué sur la plage. L'analyse génétique indiqua que les virus avaient été récemment introduits à partir d'oiseaux (Chambers *et al.* 1989 ; Hinshaw *et al.* 1986).

1.3.2.4 Mustélidés

En octobre 1984, des foyers de maladie respiratoire affectèrent environ cent mille visons répartis sur 33 fermes très proches les unes des autres et situées dans une région côtière de la Suède méridionale. La morbidité fut de 100 % et la mortalité de 3 % (Klingeborn *et al.* 1985). Des virus influenza de type A appartenant au sous-type H10N4 furent isolés chez les visons. L'analyse génétique a indiqué que les virus étaient d'origine aviaire et étaient très étroitement apparentés à un virus du même sous-type que celui ayant été isolé de poulets et d'un canard sauvage en 1985 en Angleterre (Berg *et al.* 1990). Des infections expérimentales antérieures avaient suggéré que le vison était sensible à l'infection par divers sous-types de virus IA (Okazaki *et al.* 1983). Une lignée asiatique de virus IAHP H5N1 fut isolée d'une fouine sauvage (*Martes foina*), retrouvée malade en Allemagne le 2 mars 2006. Au même moment, de nombreux foyers de virus H5N1 furent constatés chez les oiseaux sauvages dans la région où la fouine avait été retrouvée (WHO : http://www.who.int/csr/don/2006_03_09a/en/index.html).

1.3.2.5 Félins

Des études menées par Hinshaw *et al.* (1981b) avaient démontré la capacité des virus IAHP à infecter les chats et à s'y multiplier. Ces derniers ne démontrèrent pas de signes cliniques ultérieurs d'infection. Cependant, au cours des épizooties d'IAHP H5N1 de 2003 à 2004 en Asie, des infections virales fatales causées par le

H5N1 furent constatées chez les chats domestiques et les félins des zoos, après que ces derniers eurent été nourris avec du poulet infecté par le virus (Keawcharoen *et al.* 2004 ; Songserm *et al.* 2006 ; Thanawongnuwech *et al.* 2005). Une mortalité des chats fut aussi constatée en Iraq. Elle avait été provoquée par un virus du clade 2,2 de la lignée du lac Qinghai (Yingst *et al.* 2006). Au cours d'études expérimentales, des chats excrétèrent le virus et développèrent une pathologie des poumons après inoculation intratrachéale de H5N1 ou après avoir été nourris avec du poulet infecté par le virus (Kuiken *et al.* 2004). Le virus fut en outre transmis aux chats sentinelles par des chats infectés. Les chats peuvent donc contracter l'infection par l'IA après avoir consommé de la chair fraîche de volaille infectée et pourraient répandre le virus aux autres chats.

1.3.2.6 Chiens

On pensait que les chiens étaient résistants à l'infection causée par l'IA, jusqu'à ce qu'un cas de H5N1 ne se produise récemment en Thaïlande. L'infection fatale fut très probablement causée par l'ingestion d'une carcasse de canard infectée. Le virus H5N1 fut détecté dans les poumons, le foie et les reins du chien et à partir de prélèvements d'urine (Songserm *et al.* 2006).

1.4 Transmission

Les mécanismes selon lesquels les virus de l'influenza sont transmis d'un oiseau à un autre et provoquent l'infection sont mal connus. Des tentatives d'évaluation expérimentale de la transmissibilité des virus IAFP et IAHP chez les volailles domestiques ont été effectuées par le passé (Alexander *et al.* 1978, 1986 ; Narayan *et al.* 1969 ; Tsukamoto *et al.* 2007 ; Westbury *et al.* 1979, 1981). Les résultats ont montré que la transmission d'oiseau à oiseau était extrêmement complexe et dépendait de la souche virale, de l'espèce aviaire et de facteurs environnementaux.

Dans les cas d'infections à la fois naturelle et expérimentale, la transmission des virus virulents entre poulets infectés et poulets sensibles (et entre dindes infectées et dindes sensibles) avait tendance à être bien plus faible que celle des virus de faible pathogénicité. La capacité des virus à se répandre facilement correspondrait, dans une certaine mesure, à la quantité de virus libéré par les voies respiratoires et intestinales. Les virus IAHP entraînent une mort extrêmement rapide chez ces oiseaux et

il est possible qu'une très faible quantité de virus ait été excrétée au cours de telles infections.

L'épidémiologie différente de l'IAHP H5N1 asiatique a conduit de nombreuses équipes de recherche à réexaminer le mécanisme de transmission de l'IA. Le changement de mode de transmission chez les oiseaux terrestres, entre la voie principalement fécale/orale et la voie principalement respiratoire, fut, en particulier, considéré comme significatif dans l'épidémiologie de ce virus, notamment dans sa transmission aux mammifères (Perez *et al.* 2003 ; Makarov *et al.* 2003 ; Humberd *et al.* 2006).

Il semble de toutes façons que la transmission d'oiseau à oiseau s'effectue à la suite d'un rapprochement entre hôtes infectés et hôtes naïfs. Généralement, le contact direct avec des oiseaux infectés ou des exsudats ou excréments contaminés serait nécessaire à la transmission de l'infection d'un oiseau à l'autre. Une diffusion dans l'air sur de grandes distances serait donc improbable. Aucun constat n'a d'ailleurs été publié à l'heure actuelle concernant un tel événement.

1.5 Distribution et propagation

Jusqu'à tout récemment, l'épidémiologie de l'IA semblait consister en un maintien chez les oiseaux sauvages de virus IAFP appartenant à tous les sous-types H et causant peu ou pas de maladie, mais se propageant de temps à autre chez les volailles. Les introductions de virus IAFP H5 ou H7 chez les volailles ont rarement entraîné leur mutation en virus virulents responsables d'IAHP.

Le degré de manifestation et de propagation de virus IAFP ou IAHP chez les volailles peut varier de manière importante et dépend des niveaux de biosécurité et de densité des volailles au voisinage des foyers initiaux. Cependant, certains événements survenus vers la fin des années 1990, et en particulier après 2003, ont complètement changé notre compréhension de l'épidémiologie de l'IA. La propagation des virus IAFP H9N2 et IAHP H5N1 doit faire l'objet d'une attention particulière, relativement aux situations plus conventionnelles.

1.5.1 Situation conventionnelle

1.5.1.1 Introduction primaire chez les volailles

Tous les résultats disponibles suggèrent que, dans la situation conventionnelle, l'introduction primaire des virus IAFP dans une population de volailles proviendrait de

l'activité d'oiseaux sauvages, généralement d'oiseaux Ansériformes. Mais les mouettes et les oiseaux de rivage ont également été incriminés. Ceci ne sous-entend pas forcément un contact direct car les virus peuvent être transportés vers une région par les oiseaux aquatiques infectés mais être ensuite transmis aux volailles par des êtres humains ou par d'autres types d'oiseaux ou d'animaux. Ces derniers ne sont pas nécessairement infectés mais sont susceptibles de transmettre de façon mécanique les virus contenus dans les fèces ou les exsudats infectés provenant d'oiseaux aquatiques. Les eaux de surface destinées à la consommation peuvent également être contaminées par des virus de l'influenza et constituer ainsi une source d'infection. De nombreux constats permettent d'incriminer les oiseaux aquatiques dans la plupart des foyers primaires d'IAFP. Ces constats sont résumés comme suit :

- la prévalence de l'infection des volailles situées sur les voies migratoires des oiseaux aquatiques est bien plus élevée, bien qu'au vu de la variation en excréteurs de virus le long des voies de migration (Pomeroy 1982), ce phénomène semble se manifester plus souvent à certaines étapes du trajet migratoire plutôt qu'à d'autres, comme dans le Minnesota aux États-Unis par comparaison avec les autres États situés sur la voie de migration du Mississippi (Pomeroy 1982), ou en Italie (Terregino *et al.* 2007) ;
- la prévalence de l'infection est supérieure chez les volailles élevées en plein air (notamment les dindes fermières et les canards destinés à l'engraissement). Inversement, sur les sites ayant connu des infections fréquentes d'IAFP et où un changement en faveur d'une politique de confinement a été mis en place, les problèmes d'IAFP ont en grande partie disparu (Lang 1982 ; Pomeroy 1987) ;
- les surveillances de régions où l'IAFP a atteint les volailles ont montré une variation identique des sous-types viraux collectés au cours des épizooties ayant touché les oiseaux aquatiques et les dindes (Senne, 2003). De même en Italie, il a été prouvé que les volailles de basse-cour élevées en plein air portaient les mêmes virus que ceux isolés chez des oiseaux aquatiques durant la même période (Terregino *et al.* 2007) ;
- les épizooties d'influenza aviaire se manifestaient de façon saisonnière dans les régions à haut risque et coïncidaient avec l'activité migratoire (Halvorson *et al.* 1983, 1987).

Dans la plupart des cas d'épizooties spécifiques documentées, le contact éventuel avec les oiseaux aquatiques sur le site initial a été mis en évidence.

L'introduction primaire chez les volailles provenait parfois d'un secteur commercial où le virus IA pouvait être enzootique. Les épizooties d'IAFP H7N2 aux États-Unis en sont un bon exemple (Halvorson 1987). Le virus IAFP appartenant au sous-type H7N2 a probablement été introduit dans les marchés d'oiseaux vivants de l'Est des États-Unis. Il y est, depuis, resté enzootique, malgré les efforts entrepris en vue d'éradiquer ce virus. Senne *et al.* (2006) ont constaté qu'au cours des 10 dernières années, huit épizooties d'IAFP H7N2 chez les volailles commerciales ayant abouti à l'abattage de millions d'oiseaux et à de graves pertes économiques avaient été liées aux marchés d'oiseaux vivants.

1.5.1.2 Transmission secondaire

Le transfert mécanique de matières organiques infectieuses constitue la menace la plus importante de propagation des virus d'IA. À titre d'exemple, les concentrations virales peuvent atteindre des valeurs aussi élevées que 10^7 particules infectieuses/g et les virus peuvent survivre pendant plus de 44 jours dans les fèces (Utterback 1984). Les oiseaux et autres animaux non sensibles à l'infection peuvent être contaminés et répandre le virus de façon mécanique. L'eau ou la nourriture partagée peuvent aussi être contaminées. Il semble, cependant, que l'homme soit la source principale de contamination pour les volailles domestiques. Dans de nombreux rapports spécifiques traitant de l'introduction du virus dans un élevage et de sa diffusion à l'intérieur de celui-ci, des preuves solides ont permis d'incriminer les déplacements des gardiens, des propriétaires et du personnel des élevages, des camions et des chauffeurs procédant au déplacement des oiseaux ou à la livraison de nourriture, ainsi que des équipes d'insémination artificielle (Glass *et al.* 1981 ; Homme *et al.* 1970 ; Wells 1963).

Lors de l'épizootie dévastatrice de H5N2 survenue chez les poulets en Pennsylvanie en 1983-1984, le mode de transmission le plus fortement suspecté a été la propagation par le personnel et par les matières contaminées. La plupart des observateurs en ont conclu que la transmission secondaire était principalement due au déplacement du personnel et des équipements entre les élevages, malgré certains faits prouvant le rôle joué par la propagation aérienne entre les élevages très rapprochés les uns des autres, ainsi que la contamination possible des insectes volants par les fèces infectées (Johnson 1984 ; King 1984 ; Utterback 1984). King (1984) a répertorié six types de matières contaminées susceptibles d'être déplacées d'élevage en élevage et 11 types de personnels susceptibles d'être en contact

avec 2 fermes ou plus. Utterback (1984) a établi des listes encore plus longues. Lors de manifestations plus récentes telles que celles survenues en Italie en 1999-2000, la propagation du virus fut associée à la densité de la population avicole dans les régions contaminées et au contact fréquent entre les élevages, occasionné par les camions de nourriture et d'abattage, ainsi que par d'autres véhicules (Capua *et al.* 2001).

1.5.2 Virus H9N2 chez les volailles

Historiquement, les virus IAFP n'avaient pas fait l'objet de mesures de contrôle ni de notification visant à leur éradication. On ne comprend donc pas pourquoi ces virus n'étaient pas devenus plus ubiquitaires et enzootiques chez les volailles et sur des zones géographiques étendues (comme cela avait été le cas pour d'autres virus tels que les pneumovirus ou les virus des bronchites aviaires infectieuses). Pourtant, c'est exactement ce qui semble s'être produit dans le cas des virus IAFP H9N2. Les infections de volailles, et en particulier de poulets, se sont produites dans de nombreux pays depuis le milieu des années 1990 et ont pris des dimensions panzootiques. Des foyers d'IA H9N2 sont apparus chez les canards domestiques, les poulets et les dindes entre 1995 et 1997, en 1998 et en 2004 en Allemagne, (Werner 1998, 1999), chez les poulets en 1994 et en 1996 en Italie (Fioret-ti *et al.* 1998), chez les faisans en 1997 en Irlande (Campbell 1998), chez les autruches en 1995 en Afrique du Sud (Banks *et al.* 2000), chez les dindes en 1995-1996 aux États-Unis (Halvorson *et al.* 1998) et chez les poulets en 1996 en Corée (Mo *et al.* 1998). Plus récemment, des infections causées par le H9N2 ont été rapportées au Moyen-Orient et en Asie. Elles ont été à l'origine de multiples cas d'infection chez les poulets commerciaux en Iran, en Arabie Saoudite, au Pakistan, en Chine, en Corée, dans les EAU, en Israël, en Jordanie, au Koweït, au Liban, en Libye et en Iraq (Alexander 2002, 2007). Dans bon nombre de ces pays, des vaccins ont été utilisés pour maîtriser la maladie. Les infections causées par le H9N2 sont néanmoins devenues enzootiques chez les volailles commerciales de la plupart de ces pays.

1.5.3 Propagation du virus IAHP H5N1 asiatique

L'émergence du virus IAHP H5N1 dans le Sud-Est asiatique et sa diffusion en Asie et à l'intérieur de

l'Europe et de l'Afrique reste sans précédent dans l'histoire de la virologie. La souche virale, apparemment responsable des épizooties ultérieures d'IAHP H5N1, fut détectée chez des oies commerciales infectées en 1996 dans la province du Guandong, en République populaire de Chine (Xu *et al.* 1999). Selon certains rapports, le virus aurait continué à circuler, principalement chez les canards domestiques du Sud de la Chine, et aurait présenté un certain degré de variation génétique (Sims *et al.* 2005). Cette situation, apparemment bénigne mais probablement enzootique, a complètement changé entre décembre 2003 et février 2004, lorsque huit pays de l'Est et du Sud-Est asiatique ont signalé des foyers d'IAHP causés par le virus H5N1 (Sims *et al.* 2005). Bien que certains pays aient semblé avoir réussi à maîtriser ces foyers, ceux-ci réapparurent pendant une deuxième vague en juillet 2004. Un foyer fut rapporté chez les volailles en août 2004 en Malaisie et ce pays est devenu le neuvième de la région à avoir été atteint (OIE, 2006). Dans la plupart de ces pays, le virus toucha tous les secteurs des populations avicoles, mais sa présence chez les canards domestiques commerciaux, les volailles de village, les marchés d'oiseaux vivants et les coqs de combat semblait revêtir une importance particulière dans la propagation du virus (Sims *et al.* 2005 ; Xu *et al.* 1999 ; Songserm *et al.* 2006).

Dans l'éventualité où le virus IAHP devenait omniprésent chez les volailles et en particulier chez les canards fermiers domestiques, sa diffusion aux populations d'oiseaux sauvages paraissait inévitable. Par le passé, de telles infections s'étaient restreintes aux oiseaux sauvages retrouvés morts à proximité de volailles infectées. Des inquiétudes ont cependant toujours été émises à propos des infections d'oiseaux sauvages chez lesquels le virus IAHP aurait causé des signes cliniques minimes ou inexistantes (en l'occurrence chez les canards) mais qui pourraient propager le virus sur des zones étendues et sur des distances importantes. Des épizooties touchant de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages furent enregistrées en 2002 à Hong Kong dans deux parcs d'oiseaux aquatiques (Ellis *et al.* 2004). D'autres foyers, probablement plus importants, furent cités en 2005 chez les oiseaux sauvages migrateurs, en Chine et en Mongolie. La présence de virus IAHP H5N1 chez des oiseaux migrateurs du lac Qinghai dans l'Ouest de la Chine (Chen *et al.* 2005 ; Liu *et al.* 2005) fut particulièrement inquiétante, notamment du point de vue de la propagation du virus.

En ce qui concerne l'introduction du virus en Russie, l'implication des oiseaux sauvages n'a pas été prouvée.

Cependant, le virus IAHP H5N1 étroitement apparenté aux isolats obtenus au lac Qinghai, a touché les volailles russes au cours de l'été 2005. Ces virus russes peuvent avoir été à l'origine des virus qui se sont répandus vers l'ouest entre fin 2005 et début 2006 (Salzberg *et al.* 2007). L'association entre la diffusion vers l'ouest et les déplacements de volailles ou d'oiseaux sauvages, ou éventuellement des deux, n'a pas été élucidée. Cependant, des virus H5N1 génétiquement très apparentés sont apparus dans de nombreux pays de la région au cours de l'année 2005 et jusqu'au début de l'année 2006. Les dérivés du virus pourraient être classés en trois sous-lignées : EMA1, EMA2 et EMA3 (Salzberg *et al.* 2007).

Les infections causées par le virus IAHP H5N1 ont été constamment citées au cours du premier trimestre de l'année 2006. Au début d'avril 2006, on comptait déjà 31 pays d'Asie, d'Europe et d'Afrique ayant signalé auprès de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) la survenue depuis fin 2003 d'IAHP causées par le virus H5N1.

En 2004 et en 2005, il y eut deux introductions isolées de virus IAHP H5N1 en Europe, illustrant bien l'influence de l'homme dans la propagation potentielle des virus IA. La première fois, des aigles montagnards (*Spizaetus nipalensis*) importés de Thaïlande en contrebande furent confisqués à l'aéroport de Bruxelles en Belgique. Il fut prouvé qu'ils étaient infectés par un virus H5N1 génétiquement semblable aux virus isolés en Thaïlande (Van Borm *et al.* 2005). La deuxième fois, des enquêtes menées sur la mort d'oiseaux de volière maintenus en quarantaine en Angleterre et provenant de toute évidence de Taiwan ont révélé une infection par l'IAHP H5N1 (DEFRA, 2005). Dans ce cas, le virus était génétiquement plus proche des virus isolés en Chine.

Des isolats provenant de cygnes morts furent obtenus en octobre 2005 en Croatie (OIE, 2006). Ces cygnes infectés constituaient un signe avant-coureur de l'importance vraisemblable de ces oiseaux dans la propagation de l'IAHP H5N1. De janvier à avril 2006, des cygnes tuberculés sauvages ou d'autres oiseaux sauvages de l'Azerbaïdjan, de l'Iran, du Kazakhstan, de la Géorgie et de 20 pays européens (autres que la Croatie) furent manifestement contaminés. Il semblait que les cygnes tuberculés sauvages ou les autres oiseaux hivernant sur la mer Morte avaient contracté l'infection à un moment où les conditions météorologiques rendaient la mer Morte inhospitalière, entraînant ainsi la dispersion des oiseaux vers d'autres régions. Toutefois, ceci n'explique pas l'apparition simultanée

d'une souche de virus H5N1, apparemment identique, chez les cygnes et les oiseaux sauvages de la côte baltique.

Des foyers furent continuellement signalés chez les volailles pendant l'hiver 2006-2007 en Asie et en Afrique, mais pas en Europe où les études de surveillance ne détectèrent aucune trace de virus chez les oiseaux sauvages ou les volailles. Cependant, en janvier 2007, des oies furent touchées en Hongrie ainsi qu'un élevage de dindes en Angleterre. Les virus isolés sur les deux sites étaient très apparentés et ressemblaient aux virus isolés chez des oiseaux sauvages en 2006 en Europe (Irvine *et al.* 2007). Néanmoins, les virus responsables de ces foyers semblaient être différenciables des virus responsables des épizooties survenues chez les oiseaux sauvages en Allemagne, en République Tchèque (où des foyers furent également signalés chez les volailles) et en France en juin et juillet 2007.

Après la première introduction de H5N1 en Afrique, qui a eu lieu entre début 2006 et fin 2007, le virus s'est répandu dans dix pays africains (OIE, 2007). Une enquête fut menée au début de l'année 2007 afin d'établir les caractéristiques génétiques des souches contemporaines de virus H5N1 circulant simultanément au Nigeria. Elle révéla que seulement deux des sous-lignées introduites initialement sur le continent (EMA1 et EMA2) circulaient toujours ; et ce malgré le fait qu'un virus réassortant EMA1/EMA2 fût devenu prédominant (Monne *et al.* 2007).

1.6 Épizooties d'IAHP

Les épizooties d'IAHP survenues chez les volailles depuis 1959 (au moment où se produisit la première épizootie d'IAHP causée par un virus appartenant au sous-type H5) sont énumérées dans le tableau 1.1. Si l'on considère que l'ensemble des foyers d'IAHP H5N1 asiatiques ne forment qu'une seule épizootie, il y aurait alors eu 24 épizooties à ce moment là. Le tableau 1.1 résume les informations élémentaires concernant les épizooties d'IAHP et met l'accent sur leur diversité. Onze épizooties ont été recensées au cours des 34 premières années de la période de 47 ans allant de 1959 à 1992 (avec une fréquence de 1 épizootie/3,09 ans). Treize autres ont été observées pendant les 13 années qui suivirent (avec une fréquence de 1 épizootie/an). Durant ces 5 dernières années (2002-2006), 6 épizooties ont été constatées (avec une fréquence d'un épizootie/0,83 an), en comptant la propagation sans précédent de virus

H5N1 asiatique. Le nombre d'oiseaux atteints serait encore plus alarmant que l'augmentation du nombre des épidémies d'IAHP. Les 12 premières épidémies engendrèrent la mort ou l'abattage de plus de 500 000 oiseaux et les morts survenues au cours de 8 des 12 épidémies suivantes dépassèrent les 500 000 oiseaux (Tableau 1.1).

Les raisons de cette augmentation apparente du nombre des épidémies ainsi que de leur impact sont probablement extrêmement complexes. Plusieurs facteurs en seraient responsables : une plus grande sensibilisation des opérateurs et des capacités de diagnostic plus importantes ; des modifications de la production avicole telles que la mise en place de zones de production de forte densité, de systèmes de production intégrés et d'une démarche dans le sens de l'aviculture en plein air ; des rapports et des enquêtes plus ouverts au sujet de la maladie ; et probablement des changements dans les déplacements d'oiseaux suite aux changements climatiques.

1.7 Implications sur la santé humaine

Les infections d'influenza aviaire sont à présent considérées comme étant une menace importante pour la santé publique, en raison des cas récents d'infection chez l'homme par les virus IA et de l'inquiétude quant la génération d'un nouveau virus pandémique à partir du virus H5N1.

On sait à présent que les virus responsables des pandémies humaines de 1957 et 1968 seraient apparus à la suite de réassortiment entre des virus présents dans la population humaine et les virus IA (Gething *et al.* 1980 ; Kawaoka *et al.* 1989 ; Scholtissek *et al.* 1978). Mais, du fait de l'existence de « barrières » apparentes empêchant l'infection des oiseaux par le virus de l'influenza humaine ainsi que l'infection de l'homme par les virus IA, ce serait les porcs qui auraient servi de « creusets » puisqu'ils étaient naturellement infectés par les virus à la fois humains et aviaires. D'un point de vue purement scientifique, les cellules épithéliales de porc comportent des saccharides portant à la fois une extrémité SA-a2,3-Gal et SA-a2,6-Gal, permettant ainsi la multiplication à la fois des virus influenza aviaires et humains. Le réassortiment entre ces virus pourrait donc avoir lieu chez les porcs, avec l'émergence de virus possédant des gènes originaux du virus humain, nécessaires à la multiplication et à la propagation dans la population humaine, mais portant une glycoprotéine de surface hémagglutinine différente d'origine aviaire, de

telle sorte que la population pourrait être considérée comme étant immunologiquement naïve.

Des événements récents ont cependant modifié de façon significative notre compréhension des infections humaines par les virus IA. Le tableau 1.2 présente un résumé des cas rapportés. Il indique notamment que jusqu'en 1996, seulement trois cas d'infections furent cités, notamment à la suite d'un contact non documenté en 1959 et de deux accidents de laboratoires en 1997 et 1981 (avec un isolat provenant de phoque). Ces résultats corroboraient avec les expériences de Beare et Webster (1991) au cours desquelles des volontaires humains avaient développé des infections tout au mieux transitoires, après contact avec des virus IA.

La première observation d'infection d'un être humain ayant été en contact avec des oiseaux a été effectuée en Angleterre chez une femme qui élevait des canards et souffrait de conjonctivite. Un virus aviaire H7N7 fut isolé chez cette femme (Banks *et al.* 1998 ; Kurtz *et al.* 1996). Ce fut le prélude à une série d'isolements réalisés chez des personnes ayant eu des contacts avec les volailles (Tableau 1.2). Les infections humaines qui suivirent eurent un impact plus important sur les questions de santé humaine, en raison du taux de mortalité élevé chez les personnes dont l'infection avait été confirmée. Les décès survenaient généralement à la suite d'une maladie respiratoire grave et malgré la présence d'autres symptômes, il n'y avait généralement pas d'indice révélant que le virus puisse se multiplier en dehors du système respiratoire (Yuen *et al.* 1998). Les infections n'étaient pas comparables aux infections systémiques observées chez les volailles.

La menace la plus importante découlant de la mise en évidence d'infections naturelles directes d'êtres humains par les virus de l'IA est la possibilité de l'émergence de virus pandémique en l'absence d'hôte intermédiaire. Les deux mécanismes susceptibles d'intervenir dans ce phénomène sont le réassortiment génétique et l'adaptation progressive. Le premier cas se manifesterait si une personne était infectée en même temps par un virus IA et un virus de grippe humaine. Dans ce cas, un virus émergerait par réassortiment génétique et serait tout à fait capable de propagation dans la population humaine, mais porterait une hémagglutinine H5, H7 ou H9. Il entraînerait alors une véritable pandémie de grippe. Cependant, lors des épidémies répandues de virus H9N2 survenues depuis le milieu des années 1990 et des épidémies de H5N1 survenues en Asie depuis 1996, il est apparu que beaucoup plus de personnes

Tableau 1.2 Cas d'infections humaines causées par les virus de l'influenza (1959 au 30 septembre 2007).

Année	Pays	Sous-type	Nombre de personnes infectées	Nombre de morts	Symptômes	Référence
1959	États-Unis	H7N7	1	0	Hépatite ?	Campbell <i>et al.</i> (1970)
1977	Australie	H7N7	1	0	Conjonctivite	Taylor et Turner (1977)
1981	États-Unis	H7N7	1	0	Conjonctivite	Webster <i>et al.</i> (1981)
1996	Angleterre	H7N7	1	0	Conjonctivite	Kurtz <i>et al.</i> (1996)
1997	Chine	H5N1	18	6	Maladie ressemblant à la grippe	Chan <i>et al.</i> (2002)
1999	Chine	H9N2	2	0	Maladie ressemblant à la grippe	Peiris <i>et al.</i> (1999)
2002	États-Unis	H7N2	1	0	Confirmation sérologique	Site internet du CDC
	Chine	H5N1	2	1	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet du CDC
		H9N2	1	0	Maladie ressemblant à la grippe	Butt <i>et al.</i> (2005)
2003	Pays-Bas	H7N7	89	1	Conjonctivite	
					Maladie ressemblant à la grippe	Site internet du CDC
	États-Unis	H7N2	1	0	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet du CDC
	Vietnam	H5N1	3	3	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Chine	H5N1	1	1	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Italie	H7N3	7	0	Confirmation sérologique	Puzelli <i>et al.</i> (2005)
2004	Canada	H7N3	2	0	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet du CDC
	Thaïlande	H5N1	17	12	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Vietnam	H5N1	29	20	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
2005	Cambodge	H5N1	4	4	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Chine	H5N1	8	5	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Indonésie	H5N1	20	13	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Thaïlande	H5N1	5	2	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Vietnam	H5N1	61	19	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
2006	Azerbaïdjan	H5N1	8	5	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Cambodge	H5N1	2	2	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Chine	H5N1	13	8	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
2006	Djibouti	H5N1	1	0	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Égypte	H5N1	18	10	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Indonésie	H5N1	55	45	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Iraq	H5N1	3	2	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Thaïlande	H5N1	3	3	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Turquie	H5N1	12	4	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
Septembre 2007	Cambodge	H5N1	1	1	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Chine	H5N1	2	1	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Égypte	H5N1	16	3	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Indonésie	H5N1	6	5	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	République Populaire Démocratique du Laos					Site internet de l'OMS
	République démocratique populaire Laos	H5N1	2	2	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Nigeria	H5N1	1	1	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Vietnam	H5N1	7	4	Maladie ressemblant à la grippe	Site internet de l'OMS
	Nombre total de morts humaines			179		
	Nombre total d'infections humaines			417		

que celles énumérées dans le tableau 1.2 avaient été infectées par ces virus. À titre d'exemple, une étude sérologique réalisée après l'épizootie de 1997 sur des personnes travaillant avec les volailles à Hong Kong permit d'identifier une séroprévalence de 10 % pour les anticorps anti-H5, sans manifestation notoire d'affection clinique (Bridges *et al.* 2002). De nombreux cas de séropositivité furent constatés lors des recherches effectuées sur l'homme au cours de l'épidémie hollandaise de H7N7 survenue en 2003. Cette dernière causa par ailleurs 1 décès et 83 cas confirmés de conjonctivite (Fouchier *et al.* 2004). En dépit de ce fait, il n'y a pas eu d'émergence de virus réassortant. D'autres facteurs inconnus limiteraient donc fort probablement de telles possibilités d'apparition d'un virus pandémique.

Le deuxième processus de génération d'un virus pandémique serait l'adaptation progressive d'un virus d'origine purement aviaire. Des études récentes effectuées sur le génome du virus H1N1 de la grippe espagnole ayant touché l'homme au début du xx^e siècle ont donné naissance aux hypothèses selon lesquelles ce virus était entièrement d'origine aviaire et n'avait pas été engendré par réassortiment (Taubenberger 2005). Un virus dont les huit segments étaient d'origine aviaire avait ainsi pu s'établir dans la population humaine et y provoquer bien plus de décès que la Première Guerre mondiale. Le séquençage des gènes de ce virus, ainsi que celui d'autres virus d'origine aviaire ayant infecté l'homme, a mis en lumière des mutations qui pourraient découler d'une adaptation progressive à l'hôte humain.

Indépendamment du mécanisme selon lequel le nouveau virus pandémique pourrait être engendré, il semble clair que la circulation de virus IA chez les animaux devrait être réduite et que les contacts à haut risque devraient être évités par-dessus tout. Il s'agit bien là du problème le plus complexe auquel doivent faire face les pays en voie de développement. Les cas humains survenus au cours de l'épidémie actuelle de H5N1 se sont généralement développés à la suite de contacts entre les villageois et les poulets de campagne ou les coqs de combat. La nature et l'essence de ces contacts dépendaient des habitudes sociales et comportementales associées à la sécurité alimentaire ou aux loisirs. Les règles élémentaires d'hygiène étaient également rarement respectées. La modification de ces schémas ne semble pas être applicable à court terme. Des efforts devraient être entrepris afin de réduire l'excrétion virale chez les volailles rurales, de telle sorte que la quantité de virus excrété ne soit pas suffisante pour infecter l'homme. On pense que les campagnes de vaccination des volailles rurales sont actuellement le seul moyen d'obtenir une

diminution de la charge virale dans l'environnement rural. Toutefois, si cet effort est entrepris sans la mise en place d'autres mesures importantes, il est improbable que la vaccination seule ait l'effet désiré et la situation pourrait même en être aggravée. De telles mesures comprennent la mise en place de précautions additionnelles permettant de s'assurer que la vaccination et une surveillance appropriée des oiseaux vaccinés sont réalisées correctement, afin que les oiseaux infectés puissent être détectés et que les infections soient éradiquées.

Un renforcement de la sensibilisation à l'IA et aux risques associés à cette maladie est nécessaire à la maîtrise de l'infection chez les volailles rurales. Cette approche suppose une éducation des éleveurs et des personnes travaillant avec les volailles quant aux concepts de base de la biosécurité, de l'hygiène rurale et des procédures de prévention et de notification. Les éleveurs devraient eux-mêmes déclarer les foyers, au lieu d'essayer de contourner les restrictions. Ils devraient également recevoir une formation en matière de gestion des épizooties comprenant l'identification de la maladie ainsi que le tri des oiseaux infectés et la façon correcte de s'en débarrasser. Si une campagne de vaccination est mise en place, il est impératif qu'elle soit effectuée dans des conditions d'hygiène et de gestion/logistique appropriées. Les vaccins doivent être de très bonne qualité et être administrés à chaque groupe d'oiseaux à l'aide de seringues stériles. La chaîne du froid doit être respectée et les flacons de vaccins doivent être agités vigoureusement avant l'usage afin de maintenir la qualité du produit et de garantir son efficacité.

Dans de telles conditions, il peut être relativement difficile d'évaluer l'exposition des troupeaux infectés sur le terrain. Le diagnostic de laboratoire n'est pas effectué de façon systématique lorsqu'il s'agit de volailles rurales. Les oiseaux vaccinés ne montrent parfois aucun signe clinique mais répandent activement le virus, perpétuant ainsi l'infection. La seule technique envisageable de dépistage de l'exposition sur le terrain consisterait à laisser des oiseaux sentinelles non vaccinés dans le troupeau. L'identification des sentinelles dans les établissements ruraux serait rendue possible par l'absence de vaccination des oiseaux mâles d'un troupeau.

1.8 Conclusion

Les changements survenus dans l'écologie et l'épidémiologie des infections d'IA soulignent l'urgence de progresser dans la compréhension des problèmes

liés à l'épidémiologie, à la pathogenèse et à la maîtrise de la maladie.

Les lignées asiatiques de virus H5N1 se sont répandues sur trois continents présentant chacun des contextes totalement différents au niveau agricole, écologique, social et économique. Le virus s'est, par la suite, maintenu dans chaque région grâce à la mise en œuvre de mécanismes variés. La génération de tels cycles est aussi influencée par la diversité et la disponibilité des hôtes dans de tels contextes. Lorsque le virus rencontre de nouveaux hôtes appartenant ou non à la classe *Aves*, il acquiert des mutations pouvant refléter des pouvoirs pathogènes envers une ou plusieurs espèces.

Les conséquences de ces deux forces motrices sur les profils génétique et antigénique nécessitent une surveillance des souches virales et une collaboration étroite entre toutes les parties impliquées dans la gestion de la crise. L'effort entrepris dans le cadre de la surveillance devrait être orienté vers la collecte et la caractérisation des souches dans le but d'identifier les mutations génétiques et les propriétés antigéniques. L'information collectée doit être compilée et mise à la disposition de la communauté scientifique internationale, et en particulier des virologues.

Au moins deux sous-types d'IA, tous deux impliqués dans des zoonoses, sont actuellement apparemment enzootiques dans de grandes parties du monde. Il s'agit du H5N1 et du H9N2. Il est impossible de prédire si l'un ou l'autre servira de souche au prochain virus responsable d'une pandémie humaine. Tous deux sont incontestablement responsables de pertes dans l'industrie avicole ; H5N1 étant également responsable de pertes en vies humaines et d'une diminution des moyens de subsistance des collectivités rurales.

Les communautés scientifiques médicales, vétérinaires et agricoles font face à un virus qui évolue sur un plan tridimensionnel : il se modifie lui-même en fonction de son adaptation à différentes espèces, tout en se réassortissant à d'autres virus influenza aviaires et potentiellement de mammifères et en infectant de nouvelles espèces. Il est indispensable de mener des efforts significatifs en matière de collaboration et de moyens financiers dans un contexte de transparence scientifique afin de produire des données et des idées permettant de contribuer à la démarche d'éradication. Tant que la circulation générale du virus est limitée au réservoir des volailles, l'IA restera un enjeu en matière de sécurité alimentaire et une menace mondiale pour la santé animale et humaine. Cette responsabilité incombe à la communauté vétérinaire puisque celle-ci détient

le savoir et la compréhension nécessaire à la proposition de solutions durables pour la gestion de cette infection.

Références

- Alexander DJ (2000) A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74(1-2):3-13
- Alexander DJ (2001) Ecology of avian influenza in domestic birds. *Proceedings of the International Symposium on Emergence and Control of Zoonotic Ortho- and Paramyxovirus Diseases*. Merieux Foundation, Veyrier du Lac, France 25-34
- Alexander DJ (2002) Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997-2002. *Avian Dis* 47 (3 Suppl):792-797
- Alexander DJ (2008) Avian influenza manual for diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 6th edition. Chapter 2.7.12. World Organisation for Animal Health, Paris, France, http://www.oie.int/eng/normes/mmanu-al/a_00002.htm
- Alexander DJ (2007) Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa and Australasia 2002-2006. *Avian Dis* 51(1 Suppl):161-166
- Alexander DJ, Allan WH, Parsons DG, Parsons G (1978) The pathogenicity of four avian influenza viruses for fowls, turkeys and ducks. *Res Vet Sci* 24(2):242-247
- Alexander DJ, Parsons G, Manvell RJ (1986) Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quails. *Avian Pathol* 15:647-662
- Banks J, Speidel E, Alexander DJ (1998) Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human—is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses? *Arch Virol* 143(4):781-787
- Banks J, Speidel EC, Harris PA, Alexander DJ (2000) Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol* 29:353-360
- Banks J, Speidel EC, McCauley JW, Alexander DJ (2000) Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch Virol* 145(5):1047-1058
- Beare AS, Webster RG (1991) Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 119(1-2):37-42
- Becker WB (1966) The isolation and classification of Tern virus: Influenza A - Tern South Africa - 1961. *J Hyg (Lond)* 64(3):309-320
- Berg M, Englund L, Abusugra IA *et al.* (1990) Close relationship between mink influenza (H10N4) and con-comitantly circulating avian influenza viruses. *Arch Virol* 113(1-2):61-71

- Bridges CB, Lim W, Hu-Primmer J *et al.* (2002) Risk of influenza A (H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *J Infect Dis* 185(8):1005-1010
- Butt KM, Smith GJ, Chen H *et al.* (2005) Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* 43(11):5760-5767
- Callan RJ, Early G, Kida H, Hinshaw VS (1995) The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J Gen Virol* 76(Pt 1): 199-203
- Campbell CH, Webster RG, Breese SS Jr (1970) Fowl plague virus from man. *J Infect Dis* 122(6):513-516
- Campbell G (1998) Report of the Irish national reference laboratory for 1996 and 1997. Proceedings of the Joint Fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union, Brussels, 1997 p13
- Capua I, Alexander DJ, (2004) Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol* 33(4):393-404
- Capua I, Marangon S (2007) The use of vaccination to combat multiple introductions of Notifiable Avian Influenza viruses of the H5 and H7 subtypes between 2000 and 2006 in Italy. *Vaccine* 25(27):4987-4995
- Capua I, Marangon S, Dalla Pozza M *et al.* (2003) Avian influenza in Italy 1997-2001. *Avian Dis* 47(3 Suppl): 839-843
- Capua I, Mutinelli F (2001) An atlas and text on avian influenza. Papi Editore pp 1-236
- Capua I, Mutinelli F, Marangon S, Alexander DJ (2000) H7N1 Avian Influenza in Italy (1999-2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathol* 29:737-743
- Chambers TM, Yamnikova S, Kawaoka Y *et al.* (1989) Anti-genic and molecular characterization of subtype HI 3 hemagglutinin of influenza virus. *Virology* 172(1): 180-188
- Chan PK (2002) Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 34(2 Suppl):58-64
- Chen H, Smith GJ, Zhang SY *et al.* (2005) Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature* 436(7048):191-192
- Choi YK, Nguyen TD, Ozaki H *et al.* (2005) Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J Virol* 79(16):10821-10825
- Davison S, Eckroade RJ, Ziegler AF (2003) A review of the 1996-98 nonpathogenic H7N2 avian influenza outbreak in Pennsylvania. *Avian Dis* 47(3 Suppl): 823-827
- EFSA (2005) Epidemiology report on avian influenza in a quarantine premises in Essex <http://defra.gov.uk/animalh/diseases/notifiable/disease/ai/pdf/ai-epidemrep111105.pdf>
- EFSA (2005) Animal health and welfare aspects of avian influenza. *EFSA J* 266:1-21
- Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA *et al.* (2004) Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol* 33(5):492-505
- Fioretti A, Menna LF, Calabria M (1998) The epidemiological situation of avian influenza in Italy during 1996-1997. Proceedings of the Joint Fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union, Brussels 1997, 17-22
- Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW *et al.* (1980) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(5):1356-1361
- Gething MJ, Bye J, Skehel J, Waterfield M (1980) Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus. *Nature* 287(5780):301-306
- Glass SE, Naqi S A, Grumbles LC (1981) Isolation of avian influenza virus in Texas. *Avian Dis* 25(2):545-549
- Guan Y, Shortridge KF, Krauss S *et al.* (1996) Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J Virol* 70(11):8041-8046
- Guo Y, Wang M, Kawaoka Y *et al.* (1992) Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology* 188(1):245-255
- Halvorson DA, Frame DD, Friendshuh AJ, Shaw DP (1998) Outbreaks of low pathogenicity avian influenza in USA. Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, US Animal Health Association 36-46
- Halvorson DA, Karunakaran D, Senne D *et al.* (1983) Epi-zoology of avian influenza — simultaneous monitoring of sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis* 27(1):77-85
- Halvorson DA, Kelleher CJ, Pomeroy BS *et al.* (1987) Surveillance procedures for avian influenza. Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza, University of Wisconsin, Madison 155-63
- Halvorson DA, Kodillalli S, Laudert E *et al.* (1992) Influenza in turkeys in turkey in the USA, 1987-1991. Proceedings of the 3rd International Symposium on Avian Influenza 33-42
- Hinshaw VS, Bean WJ, Geraci J *et al.* (1986) Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol* 58(2):655-656
- Hinshaw VS, Webster RG, Easterday BC, Bean WJ Jr (1981b) Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun* 34(2):354-361

- Hinshaw VS, Webster RG, Rodriguez RJ (1981a) Influenza A viruses: combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources. *Arch Virol* 67(3):191-201
- Homme PJ, Easterday BC, Anderson DP (1970) Avian influenza virus infections. II. Experimental epizootiology of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus in turkeys. *Avian Dis* 14(2):240-247
- Humberd J, Guan Y, Webster RG (2006) Comparison of the replication of influenza A viruses in Chinese ring-necked pheasants and chukar partridges. *J Virol* 80(5):2151-2161
- Irvine RM, Banks J, Londo BZ *et al.* (2007) An outbreak of a highly pathogenic avian influenza virus, by an Asian lineage H5N1 virus in turkeys in Great Britain in January 2007. *Vet Rec* 161:100-101
- Isoda N, Sakoda Y, Kishida N *et al.* (2006) Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol* 151(7):1267-1279
- Johnson DC (1984) AI task force veterinarian offers practical suggestions. *Broiler Indust* 47:58-59
- Karasin AI, Brown IH, Carman S, Olsen CW (2000) Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *J Virol* 74(19):9322-9327
- Karasin AI, West K, Carman S, Olsen CW (2004) Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. *J Clin Microbiol* 42(9):4349-4354
- Kawaoka Y, Chambers TM, Sladen WL, Webster RG (1988) Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? *Virology* 163(1):247-250
- Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG (1989) Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63(11):4603-4608
- Keawcharoen J, Oraveerakul K, Kuiken T *et al.* (2004) Avian influenza H5N1 in tigers and leopards. *Emerg Infect Dis* 10(12):2189-2191
- Kida H, Ito T, Yasuda J *et al.* (1994) Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 75(Pt 9):2183-2188
- King LJ (1984) How APHIS "war room" mobilized to fight AI. *Broiler Indust* 47:44-51
- Klingeborn B, Englund L, Rott R *et al.* (1985) An avian influenza A virus killing a mammalian species -- the mink. Brief Report. *Arch Virol* 86(3-4):347-351
- Kuiken T, Rimmelzwaan G, van Riel D *et al.* (2004) Avian H5N1 influenza in cats. *Science* 306(5694):241
- Kurtz J, Manvell RJ, Banks J (1996) Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet* 348(9031):901-902
- Lang G (1982) A review of influenza in Canadian domestic and wild birds. *Proceedings of the First International Symposium on Avian influenza*, Carter Composition Corporation, Richmond, USA 21-27
- Lang G, Gagnon A, Geraci JR (1981) Isolation of an influenza A virus from seals. *Arch Virol* 68(3-4): 189-195
- Lei F, Tang S, Zhao D *et al.* (2007) Characterization of H5N1 influenza viruses isolated from migratory birds in Qinghai province of China in 2006. *Avian Dis* 51(2):568-572
- Li SQ, Orlich M, Rott R (1990) Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes. *J Virol* 64(7):3297-3303
- Liu J, Xiao H, Lei F *et al.* (2005) Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science* 309(5738): 1206
- Londo BZ, Banks J, Alexander DJ (2007) Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in in vivo tests. *Avian Pathol* 36(5):347-350
- Lvov D (1978) Circulation of influenza viruses in natural biocoenosis. *Viruses and Environment* 351-380
- Loeffen W, De Boer-Luitze E, Koch G (2003) Infection with avian influenza virus (H7N7) in Dutch pigs. *Proceedings ESVV Congress St Malo France* 50
- Loeffen W, De Boer-Luitze E, Koch G (2004) Transmission of a highly pathogenic avian influenza virus to swine in the Netherlands *Proceedings of the in-between congress of the International Society for Animal Hygiene* 329-330
- Ludwig S, Hausteiner A, Kaleta EF, Scholtissek C (1994) Recent influenza A (H1N1) infections of pigs and turkeys in northern Europe. *Virology* 202(1):281-286
- Makarova NV, Ozaki H, Kida H *et al.* (2003) Replication and transmission of influenza viruses in Japanese quail. *Virology* 310(1):8-15
- Mo IP, Song CS, Kim KS, Rhee JC (1998) An occurrence of non-highly pathogenic avian influenza in Korea. *Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia (1997) *US Animal Health Association* 379-83
- Mohan R, Saif YM, Erickson GA *et al.* (1981) Serologic and epidemiologic evidence of infection in turkeys with an agent related to the swine influenza virus. *Avian Dis* 25:11-16
- Monne I, Joannis TM, Fusaro A *et al.* (2008) Reassortant avian influenza virus (H5N1) in poultry, Nigeria, 2007. *Emerg Infect Dis* 14(4):637-640. Available from <http://www.cdc.gov/EID/content/14/4/637.htm>
- Narayan O, Lang G, Rouse BT (1969) A new influenza A virus infection in turkeys. V Pathology of the experimental disease by strain turkey-Ontario 7732-66. *Arch Gesamte Virusforsch* 26(1):166-182

- OIE (2006) Update on avian influenza in animals (type H5), April 07 2006, http://www.oie.int/downld/avian%20influenza/A_AI-Asia.htm
- OIE (2007) Update on avian influenza in animals (type H5), September 15 2007, http://www.oie.int/downld/avian%20influenza/A_AI-Asia.htm
- Okazaki K, Yanagawa R, Kida H (1983) Contact infection of mink with 5 subtypes of avian influenza virus. Brief report. *Arch Virol* 77(2-4):265-269
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A *et al.* (2006) Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science* 312(5772):384-388
- Pasick J, Handel K, Robinson J, Copps J *et al.* (2005) Inter-segmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J Gen Virol* 86(Pt 3):727-731
- Peiris JS, Guan Y, Markwell D *et al.* (2001) Cocirculation of avian H9N2 and contemporary «human» H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *J Virol* 75(20):9679-9686
- Peiris M, Yuen KY, Leung CW *et al.* (1999) Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 354(9182):916-917
- Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J *et al.* (1981) Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull World Health Org* 59(1):75-78
- Perdue ML, Crawford JM, Garcia M *et al.* (1998) Occurrence and possible mechanisms of cleavage site insertions in the avian influenza hemagglutinin gene. *Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Influenza*, Athens, Georgia. US Animal Health Association, 182-193
- Perez DR, Webby RJ, Hoffmann E, Webster RG (2003) Land-based birds as potential disseminators of avian mammalian reassortant influenza A viruses. *Avian Dis* 47(3 Suppl):1114-1117
- Pomeroy BS (1982) Avian influenza in the United States (1964-1980). *Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza* 13-17
- Pomeroy BS (1987) Avian influenza - Avian influenza in turkeys in the USA. *Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza*, University of Wisconsin, Madison. 14-21
- Puzelli S, Di Trani L, Fabiani C *et al.* (2005) Serological analysis of serum samples from humans exposed to avian H7 influenza viruses in Italy between 1999 and 2003. *J Infect Dis* 192(8):1318-1322
- Röhm C, Horimoto T, Kawaoka Y *et al.* (1995) Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? *Virology* 209(2):664-670
- Salzberg SL, Kingsford C, Cattoli G *et al.* (2007) Genome analysis linking recent European and African influenza (H5N1) viruses. *Emerg Infect Dis* 13(5):713-718
- Scholtissek C, Koennecke I, Rott R (1978) Host range recombinants of fowl plague (influenza A) virus. *Virology* 91(1):79-85
- Senne DA (2007) Avian influenza in North and South America, 2002-2005. *Avian Dis* 51(1 Suppl):167-173
- Senne DA (2003) Avian influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis* 47(3 Suppl):798-805
- Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE *et al.* (1996) Survey of the haemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis* 40(2):425-437
- Senne DA, Suarez DL, Stallnecht DE, Pedersen JC *et al.* (2006) Ecology and epidemiology of avian influenza in North and South America. *Dev Biol* 124:37-44
- Sharp GB, Kawaoka Y, Wright SM *et al.* (1993) Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes. *Epidemiol Infect* 110(1):161-176
- Shortridge KF, Zhou NN, Guan Y *et al.* (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* 252(2):331-342
- Sims LD, Domenech J, Benigno C *et al.* (2005) Origin and evolution of highly pathogenic H5N1 avian influenza in Asia. *Vet Rec* 157(6):159-164
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R *et al.* (2006) Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis* 12(11):1744-1747
- Songserm T, Amonsin A, Jam-on R *et al.* (2006) Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. *Emerg Infect Dis* 12(4):681-683
- Songserm T, Jam-on R, Sae-Heng N *et al.* (2006) Domestic ducks and H5N1 influenza epidemic, Thailand. *Emerg Inf Dis* 12(4):575-581
- Stallknecht DE (1998) Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild birds populations. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza*, 61-69
- Stallknecht DE, Shane SM (1988) Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun* 12(2-3): 125-141
- Stieneke-Gröber A, Vey M, Angliker H, Shaw E *et al.* (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11(7):2407-2414
- Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH *et al.* (2004) Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis* 10(4):693-699
- Swayne DE, Alexander DJ (1994) Confirmation of nephrotropism and nephropathogenicity of three low-pathogenic chicken-origin influenza viruses for chickens. *Avian Pathol* 23(2):345-352

- Taubenberger JK (2005) The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma. *Arch Virol Suppl* (19):101-115
- Taylor HR, Turner AJ (1977) A case report of fowl plague keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 61(2):86-88
- Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R *et al.* (2005) Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerg Infect Dis* 11(5):699-701
- Tsukamoto K, Imada T, Tanimura N *et al.* (2007) Impact of different husbandry conditions on contact and air-borne transmission of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus to chickens. *Avian Dis* 51(1):129-132
- Tûmová B (1980) Equine influenza: a segment in influenza virus ecology. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 3(1-2):45-59
- Utterback W (1984a) Update on avian influenza through February 21, 1984 in Pennsylvania and Virginia. *Proceedings of the 33rd Western Poultry Disease Conference*, 4-7
- Van Borm S, Thomas I, Hanquet G *et al.* (2005) Highly Pathogenic H5N1 influenza virus in smuggled Thai eagles, Belgium. *Emerg Infect Dis* 11(5):702-705
- Van Reeth K (2007) Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res* 38(2):243-260
- Vey M, Orlich M, Adler S *et al.* (1992) Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 188(1):408-413
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT *et al.* (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56(1):152-179
- Webster RG, Hinshaw VS, Bean WJ *et al.* (1981) Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology* 113(2):712-724
- Wells RJH (1963) An outbreak of fowl plague in turkeys. *Vet Rec* 75:783-786
- Werner O (1998) Avian influenza - Situation in Germany 1995-1997. *Proceedings of the Joint Fourth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, Brussels, 1997, 9-10
- Werner O (1999) Avian influenza - Situation in Germany 1997/1998. *Proceedings of the Joint Fifth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union*, Vienna, 1998, 10-11
- Westbury HA, Turner AJ, Amon C (1981) Transmissibility of two avian influenza A viruses (H7N7) between chicks. *Avian Pathol* 10:481-487
- Westbury HA, Turner AJ, Kovesdy L (1979) The pathogenicity of three Australian fowl plague viruses for chickens, turkeys and ducks. *Vet Microbiol* 4:223-234
- Wood GW, Banks J, Brown IH *et al.* (1997) The nucleotide sequence of the HA1 of the haemagglutinin of an HI avian influenza virus isolate from turkeys in Germany provides additional evidence suggesting recent transmission from pigs. *Avian Pathol* 26(2):347-355
- Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ (1993) Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch Virol* 130(1-2):209-217
- Wright SM, Kawaoka Y, Sharp GB *et al.* (1992) Interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs and turkeys in the United States. *Am J Epidemiol* 136(4):488-497
- Xu X, Subbarao K, Cox, NJ, Guo Y (1999) Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guan-dong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. *Virology* 261(1):15-19
- Yingst SL, Saad MD, Felt SA (2006) Qinghai-like H5N1 from domestic cats, northern Iraq. *Emerg Infect Dis* 12(8):1295-1297
- Yuen KY, Chan PK, Peiris M *et al.* (1998) Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 351(9101):467-471

Dennis J. Alexander

2.1 Introduction

Les premières épizooties de la maladie sévissant chez les volailles, connue en tant que maladie de Newcastle (ND), sont apparues en 1926 à Java, en Indonésie (Kraneveld 1926) et à Newcastle, en Angleterre (Doyle 1927). L'appellation « maladie de Newcastle » fut temporairement attribuée par Doyle, afin d'éviter une dénomination descriptive qui aurait pu être source de confusion avec d'autres maladies (Doyle 1935). Cependant l'utilisation de ce terme s'est perpétuée, bien que l'on emploie à présent couramment le synonyme « paramyxovirus aviaire de type 1 » (APMV-1) pour se référer au virus ND (NDV). APMV-1 a parfois été utilisé pour décrire les souches de NDV de faible virulence afin d'éviter l'emploi de l'expression NDV. En effet, dans les définitions utilisées par l'Organisation mondiale de la santé animale (Alexander 2008) ainsi que par d'autres agences internationales, le terme NDV est réservé aux virus virulents.

L'éventualité selon laquelle les épizooties de 1926 auraient marqué l'émergence de la ND a fait l'objet de discussions, puisque des épizooties similaires de la maladie avaient été signalées en Europe Centrale avant cette date (Halasz 1912). En passant en revue toutes les mortalités de poulets survenues dans les îles de l'Ouest de l'Écosse en 1896, Macpherson (1956) considéra qu'il était probable qu'elles eussent été causées par la ND. Il est donc possible que la ND soit apparue chez les volailles avant 1926. Cependant, la reconnaissance de la ND en tant que maladie spécifiquement définie comme étant d'étiologie virale, date des épizooties de cette année-là, à Newcastle.

Par la suite, il est apparu clairement que d'autres infections moins sévères avaient été causées par des virus presque identiques au virus initial. Aux États-Unis, une maladie respiratoire assez bénigne

et présentant souvent des signes neurologiques a d'abord été rapportée dans les années 1930. Elle fut ensuite appelée « pneumoencéphalite » (Beach 1942). Il fut démontré que cette maladie avait été causée par un virus ne pouvant être différencié du NDV par des tests sérologiques (Beach 1944). Depuis, de nombreux virus produisant une forme très bénigne de la maladie, voire aucun signe de maladie chez les poulets, ont été isolés à travers le monde. Il est à présent admis que des réservoirs de tels virus se perpétuent chez les oiseaux aquatiques et chez d'autres oiseaux sauvages.

2.2 Étiologie

L'ordre des Mononégavirales (c'est-à-dire les virus à ARN de polarité négative non segmentés et présentant une capsid de symétrie hélicoïdale) est formé par les familles des *Paramyxoviridae*, des *Filoviridae* et des *Rhabdoviridae*. La famille des *Paramyxoviridae* est composée de deux sous-familles : les *Paramyxovirinae* et les *Pneumovirinae* (Lamb *et al.* 2005). La sous-famille des *Paramyxovirinae* comporte cinq genres : les *Rubulavirus*, comprenant les virus des oreillons et les para-influenza 2 et 4 des mammifères ; les *Respirovirus*, comprenant les para-influenza 1 et 3 des mammifères ; les *Morbillivirus*, la rougeole, la maladie de Carré et la peste bovine ; les *Henipavirus*, constitués des virus Nipah et Hendra et les *Avulavirus*, constitués du NDV et d'autres paramyxovirus aviaires (Lamb *et al.* 2005).

Neuf sérotypes de Paramyxovirus aviaires ont été identifiés : APMV-1 à APMV-9 (Alexander 1988a). Parmi ceux-ci, le NDV (APMV-1) reste le plus important pathogène de la volaille, alors que APMV-2, APMV-3, APMV-6 et APMV-7 sont reconnus comme étant responsables de maladies chez la volaille. La nomenclature utilisée pour les isolats de virus influenza A a été adoptée pour les

paramyxovirus aviaires, de telle sorte qu'un isolat soit nommé selon : (1) le sérotype ; (2) l'espèce ou le type d'oiseau à partir duquel il a été isolé ; (3) le lieu géographique de l'isolement ; (4) le numéro de référence ou le nom ; et (5) l'année de l'isolement.

La variation antigénique des NDV (APMV-1), détectable par les tests conventionnels d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), a été rapportée. De telles communications sont cependant rares et font référence à des variations relativement mineures (Arias-Ibarrondo *et al.* 1978 ; Hannoun 1977 ; Alexander *et al.* 1984). L'une des variations les plus connues de ce type est le virus responsable de la panzootie chez les pigeons voyageurs. Lors des tests d'inhibition de l'hémagglutination, il a été démontré que ce NDV, généralement appelé APMV-1 (ou PPMV-1) du pigeon, était différent des souches standard, mais pas suffisamment différent sur le plan antigénique pour annuler l'effet protecteur des vaccins ND conventionnels (Alexander et Parsons 1986). Les variations antigéniques existant entre les souches de NDV ont été détectées à l'aide d'anticorps monoclonaux (mAbs). Ces variations ont été utilisées comme outil épidémiologique (Alexander *et al.* 1997). L'utilisation d'éventails d'anticorps mAb a montré que les virus regroupés selon leur capacité à réagir avec les mêmes mAb possèdent les mêmes propriétés biologiques et épidémiologiques. Cette approche de la compréhension de l'épidémiologie de la ND a toutefois été largement remplacée par l'analyse phylogénétique.

Les techniques génétiques sont à présent bien établies pour ce qui est du diagnostic de la ND ainsi que pour servir d'outil épidémiologique permettant de différencier les souches de virus (Aldous et Alexander 2001). Suite à des analyses phylogénétiques d'isolats de NDV, Herczeg *et al.* (1999, 2001) et Lomniczi *et al.* (1998) ont conclu qu'il existait 8 lignées génétiques (I-VIII) ainsi que plusieurs sous-lignées. Aldous *et al.* (2003) étudièrent 338 isolats de NDV représentant une gamme de virus issus d'hôtes différents et ayant des origines temporelle et géographique différentes. Ils en conclurent que les isolats pouvaient être répartis en six groupes très distincts (lignées 1-6). Les lignées 3 et 4 se subdivisaient en quatre sous-lignées (a-d) et la lignée 5 en cinq sous-lignées (a-e). Les lignées 1, 2, 4 et 5 correspondent principalement aux lignées I, II, III et IV définies précédemment, avec des sous-lignées comparables, mais les regroupements génomiques III, IV, V et VIII correspondent aux sous-lignées 3a à 3d. La lignée 6 représente un nouveau génotype.

Les isolats de NDV répertoriés dans les groupes de gènes 1-5 (ou I-VIII) sont génétiquement proches. Cependant, les virus répertoriés par Aldous *et al.* (2003)

dans le génotype 6, puis placés dans la classe I par Czeglédi *et al.* (2006), sont très différents de tous les autres isolats de NDV, notamment des virus de classe II (Czeglédi *et al.* 2006). Ceci a entraîné des problèmes de diagnostic moléculaire, en particulier dus au fait que la détection par RT-PCR nécessitait des amorces différentes.

2.3 Gamme d'hôtes

Après avoir effectué une revue de la littérature disponible, Kaleta et Baldauf (1998) ont conclu qu'outre les espèces aviaires domestiques, l'infection naturelle ou expérimentale par le NDV avait été démontrée chez au moins 241 espèces appartenant à 27 des 50 ordres d'oiseaux. Il est fort probable que toutes les espèces d'oiseaux soient sensibles à l'infection. Mais la conséquence de l'infection en termes de maladie varie considérablement selon les espèces.

2.3.1 Oiseaux de basse-cour

Les souches virulentes de NDV ont été isolées à partir de tous les types de volailles commerciales, allant des pigeons aux autruches. Chez diverses volailles infectées par le NDV virulent, les signes observés dans la maladie peuvent présenter des variations considérables. Par exemple, les canards peuvent ne pas présenter de signes cliniques, tandis que chez d'autres espèces, la maladie peut être plus bénigne que chez les poulets et rendre difficile le diagnostic initial ; c'est le cas par exemple chez les faisans (Aldous *et al.* 2007). Les autruches peuvent aussi poser problème quant à la suspicion initiale de la ND. En effet, bien que des signes neurologiques typiques aient été rapportés, il existe certaines différences dans la sévérité de la maladie, entre les oiseaux jeunes et les oiseaux adultes (Alexander 2000).

Les volailles issues de l'agriculture marginale peuvent également jouer un rôle dans l'épidémiologie de la ND. Par exemple, les coqs de combat furent impliqués, en plusieurs occasions, dans les épizooties de la ND aux États-Unis. L'épizootie la plus importante se produisit en Californie en 2002-2003 (Kinde *et al.* 2003). La présence répandue de ND chez les coqs de combat, ainsi que la mobilité et la valeur de tels oiseaux, ont non seulement posé des problèmes considérables de contrôle, mais ont également entraîné une contamination de 21 fermes commerciales d'œufs de consommation ainsi que

l'abattage de 3 millions d'oiseaux. Les facteurs de risques les plus élevés pour les volailles commerciales infectées étaient les employés de fermes et la proximité d'oiseaux de basse-cour infectés.

2.3.2 Oiseaux sauvages

Les isolats de NDV ont souvent été obtenus à partir d'oiseaux sauvages, en particulier des oiseaux d'eau migrateurs sauvages et d'autres oiseaux aquatiques. La plupart de ces isolats étaient de faible virulence pour les poulets et partageaient les caractéristiques des virus lentogènes à tropisme intestinal.

Des virus virulents ont parfois été détectés chez les oiseaux sauvages, mais il s'agissait d'oiseaux retrouvés morts à proximité de volailles infectées. Les épizooties les plus importantes de NDV chez les oiseaux sauvages ont été rapportées en Amérique du Nord dans les années 1990, chez les cormorans à double crête (*Phalacrocorax auritus*).

Ces épizooties débutèrent en 1990 au Canada, en particulier en Alberta, au Saskatchewan et au Manitoba (Wobeser *et al.* 1993). La maladie réapparut en 1992 chez les cormorans, dans le Midwest canadien aux alentours des Grands Lacs, ainsi que dans le Nord du Midwest des États-Unis, où elle se répandit aux dindes domestiques (Mixson et Pearson 1992 ; Hekert 1993). La maladie fut de nouveau observée chez les cormorans à double crête, en 1995 au Canada et en 1997 en Californie. Dans les deux cas, le NDV fut isolé à partir d'oiseaux morts (Kuiken 1998).

Les analyses antigéniques et génétiques des virus isolés à partir des cormorans ont suggéré que ces virus étaient très étroitement liés, malgré l'éloignement géographique des hôtes. Puisque ces épizooties touchaient des oiseaux qui suivaient des voies migratoires différentes, il est fort probable que l'infection ait eu lieu sur un site d'hivernation commun, situé dans le Sud des États-Unis ou en Amérique centrale. Allison *et al.* (2005) sont parvenus à isoler des NDV virulents similaires, à partir de cormorans à double crête en hivernation dans les Keys de Floride.

La ND avait été précédemment signalée chez les cormorans et les espèces apparentées, vers la fin des années 1940 en Écosse (Blaxland 1951) et en 1975 au Québec (Cleary 1977). Par conséquent, il est possible que les cormorans constituent un réservoir occasionnel ou même permanent de NDV virulent.

Il est intéressant de noter que les oiseaux sauvages ont été impliqués dans l'introduction de NDV virulent chez la volaille, lors de nombreuses épizooties

ayant eu lieu durant ces 10 dernières années. On en conclut, par exemple, que le virus responsable des épizooties de ND au Royaume-Uni en 1997 (Alexander *et al.* 1999) avait été très probablement introduit par les oiseaux sauvages migrateurs. Le virus responsable des épizooties de 1996 au Danemark chez des faisans en liberté était très apparenté au NDV, de même que les isolats provenant d'un harle bièvre en Finlande en 1996 et, peut-être de manière significative, d'un cormoran du Danemark en 2001 (Jørgensen *et al.* 1999 ; Alexander *et al.* 1999 ; P. Jørgensen, communication personnelle). En 2005, la réémergence chez les faisans d'un virus génétiquement très proche, en Grande Bretagne et en France, ainsi que la présence d'un lac à proximité immédiate de l'élevage français (Loire-Atlantique), ont donné naissance aux spéculations selon lesquelles ce virus pourrait s'être installé en Europe, chez certaines espèces d'oiseaux sauvages (Aldous *et al.* 2007).

2.3.3 Oiseaux de volière et de compagnie

Les isolats de NDV virulent ont souvent été obtenus à partir d'oiseaux de volière (Senne *et al.* 1983). Selon Kaleta et Baldauf (1998), il était improbable que les infections des oiseaux d'ornement récemment importés puissent avoir résulté d'infections enzootiques des oiseaux sauvages des pays d'origine. Ils ont considéré que les infections provenaient plus probablement des stations de quarantaine précédant l'exportation et résultaient de la présence du NDV enzootique dans ces stations ou d'une propagation à partir des volailles avoisinantes, telles les élevages de poulet en plein air. Panigrahy *et al.* (1993) ont décrit des épizooties sévères de ND survenues chez les oiseaux de compagnie en 1991, dans six états des États-Unis. Les introductions de virus avaient été attribuées aux importations illégales.

Dans le cas des psittacidés, la preuve que les oiseaux infectés excrètent le NDV virulent par intermittence, pendant des périodes extrêmement longues et parfois pendant plus d'un an, a été une avancée importante (Erickson *et al.* 1977), mettant ainsi l'accent sur le rôle que ces oiseaux pourraient avoir dans l'introduction du NDV dans un pays ou dans une région.

2.3.4 Pigeons voyageurs et pigeons d'ornement

À la fin des années 1970, une souche de NDV apparut chez les pigeons. Elle présentait certaines

différences antigéniques par rapport aux souches classiques. Cette souche, dite PPMV-1, apparut probablement au Moyen-Orient. En Europe, elle fut signalée pour la première la fois en Italie en 1981 (Biancifiori et Fioroni 1983). Elle engendra par la suite une véritable panzootie, se répandant à travers le monde entier, chez les pigeons voyageurs ainsi que les pigeons d'ornement (Aldous *et al.* 2004). La maladie est reconnue chez les pigeons depuis plus de 25 ans, mais semble encore demeurer enzootique chez les pigeons voyageurs de nombreux pays, tout en se propageant couramment aux pigeons sauvages et aux colombes et menaçant constamment la volaille.

2.4 Bases moléculaires de la virulence virale

Grâce à la compréhension des bases moléculaires contrôlant la virulence des souches de NDV (Rott et Klenk 1988), il est désormais possible d'évaluer, à l'aide des techniques de séquençage nucléotidique, si un isolat possède ou non la constitution génétique lui conférant une pathogénicité élevée envers la volaille (Collins *et al.* 1993). La protéine virale F provoque la fusion des membranes virales et cellulaires, permettant au génome viral de pénétrer dans la cellule et d'initier la multiplication. La protéine F est donc essentielle pour la multiplication.

Toutefois, au cours de la multiplication, les particules du NDV sont produites en association avec une glycoprotéine précurseur F0. Afin que les particules virales soient infectieuses, F0 doit être clivée en polypeptides F1 et F2, reliés par des ponts disulfures. Ce clivage post-traductionnel est facilité par les protéases cellulaires de l'hôte.

Il a été démontré que la clivabilité de la molécule F0 est directement liée à la virulence des virus *in vivo*. De nombreuses études ont confirmé la présence d'acides aminés basiques multiples, présents au site de clivage F0 des virus virulents. Chez les virus virulents, la séquence est généralement 113RQK/RR*F117. Mais la plupart des virus ont également un acide aminé basique en position 112. Par opposition, les virus de faible virulence possèdent généralement la séquence 113K/RQG/ER*L117. Il semblerait donc que la condition requise pour que le virus soit virulent chez les poulets soit caractérisée par la présence d'un acide aminé basique au niveau du résidu 113, d'une paire d'acides aminés basiques en 115 et 116, ainsi que d'une phénylalanine en 117.

La présence de ces acides aminés dans de telles positions signifie que le clivage peut être effectué par une ou plusieurs protéases, présentes dans une large gamme de tissus ou d'organes hôtes. Chez les virus lentogènes, le clivage ne peut cependant se produire qu'en présence de protéases reconnaissant une arginine isolée. Il s'agit en l'occurrence d'enzymes semblables à la trypsine. La multiplication des virus lentogènes dans les cellules hôtes est donc restreinte aux organes contenant des enzymes semblables à la trypsine, tels que les appareils respiratoires et intestinaux, alors que les virus virulents peuvent se multiplier et causer des dégâts dans toute une gamme de tissus et d'organes, et provoquer une infection systémique fatale.

Le phénomène selon lequel la virulence des souches de NDV est gouvernée par le site de clivage F0 est un fait généralement admis. Il a donc été introduit dans la définition de la ND, adoptée par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) :

« La maladie de Newcastle est une maladie infectieuse des oiseaux, due à un paramyxovirus aviaire de sérotype 1 (APMV-1) présentant l'un des critères de virulence ci-après :

a) Le virus possède un indice de pathogénicité intracérébrale (ICPI) d'au moins 0,7 pour les poussins (*Gallus gallus*) d'un jour.

ou

b) Il a été démontré (directement ou par déduction) que le virus possède de multiples acides aminés basiques dans la fraction C-terminale de la protéine F2, et une phénylalanine au niveau du résidu 117, c'est-à-dire de la fraction N-terminale de la protéine F1. Le terme « multiples acides aminés basiques » se réfère à la présence d'au moins trois acides aminés correspondant à l'arginine ou à la lysine entre les résidus 113 et 116. En l'absence de démonstration des multiples acides aminés basiques caractéristiques décrits ci-dessus, il convient de caractériser le virus isolé en déterminant son indice de pathogénicité cérébrale. »

Dans cette définition, les résidus d'acides aminés sont numérotés à partir de l'extrémité N terminale de la séquence d'acides aminés, déduite de la séquence nucléotidique du gène F0 ; 113-116 correspondant aux résidus -4 à -1 à partir du site de clivage. » (Alexander 2008).

Afin d'identifier précisément le motif minimal d'acides aminés présent au site de clivage F0 et conférant la virulence, diverses études ont été entreprises à l'aide des clones d'ADNc du NDV ainsi que des techniques génétiques (Peeters *et al.*

1999). De Leeuw *et al.* (2003) ont créé une gamme de virus dont les acides aminés du site de clivage F0 avaient été échangés. Ils en ont conclu que la virulence nécessitait F en position 117, R en 116, K ou R en 115 et R et non pas K en 113. Il est intéressant de constater que tous les mutants sont revenus aux motifs virulents 112RRQRR*F117 ou 112RRQKR*F117 après un passage unique chez les poussins.

Bien qu'il semble que la séquence d'acides aminés du site de clivage de la protéine F0 ait une influence primordiale sur la virulence réelle ou potentielle des NDV, il faut garder à l'esprit que d'autres facteurs associés à d'autres gènes et protéines viraux peuvent entraîner des variations de la virulence. Par exemple, il a été démontré à l'aide de techniques de génétique inverse, que la protéine HN pouvait influencer la virulence (Huang *et al.* 2004 ; Römer-Oberdörfer *et al.* 2006). De la même façon, il a été prouvé que la protéine V inhibe l'apoptose dans les cellules infectées et que son absence peut également influencer la virulence (Mebatsion *et al.* 2001).

2.5 Transmission

Dans le cas des NDV, il est raisonnable de conclure que l'infection peut se faire par inhalation du virus, par ingestion (Alexander 1988b) ou par contact avec les muqueuses, en particulier la conjonctive. La propagation d'un oiseau à l'autre dépend donc de la disponibilité du virus sous forme infectieuse, chez l'oiseau infecté. L'excrétion de virus dépend des organes dans lesquels celui-ci se multiplie. Selon l'argumentaire précédent, elle peut varier en fonction du pathotype viral. Les oiseaux présentant une affection respiratoire dispersent vraisemblablement les virus dans des aérosols de mucus. Les oiseaux réceptifs peuvent être exposés à ces virus et les inhaler. Les virus se limitant principalement à une multiplication intestinale peuvent être transmis par ingestion de matières fécales contaminées, soit directement, soit par de la nourriture ou de l'eau contaminée. Ils peuvent également être transmis par le biais de petites particules contaminantes produites à partir des matières fécales sèches ; ces particules peuvent être inhalées et affecter les muqueuses.

Le mode de transmission du virus dépend vraisemblablement de nombreux facteurs environnementaux qui peuvent influencer radicalement la vitesse de propagation. Au sein d'une communauté d'oiseaux maintenus à une forte densité telle que dans un élevage intensif, les virus transmis par voie

respiratoire peuvent se répandre à une vitesse alarmante. Les virus excrétés dans les matières fécales, et transmis principalement par voie orale ou fécale, peuvent se répandre extrêmement lentement, surtout si les oiseaux ne sont pas en contact direct les uns avec les autres, par exemple chez les poules pondeuses en cage.

L'importance de la transmission verticale des NDV n'est pas claire ; notamment celle des virus virulents provoquant généralement l'arrêt de la ponte chez les oiseaux sensibles à la maladie. Certaines sources rapportent avoir isolé un virus vaccinal à partir d'œufs pondus par des oiseaux infectés (e.g. Pospisil *et al.* 1991). Dans une communication significative, Capua *et al.* (1993) furent en mesure d'isoler du NDV virulent à partir de frottis cloacaux prélevés sur des oiseaux présentant des titres élevés d'anticorps anti-NDV, ainsi que sur les œufs pondus par ces oiseaux et sur leurs progénitures.

2.6 Propagation

Plusieurs revues ont abordé la façon dont le NDV pourrait être introduit dans un pays ou une région, puis se répandre d'élevage à élevage (Lancaster 1966 ; Lancaster et Alexander 1975 ; Alexander 1988b).

Selon l'argumentaire précédent, les réservoirs de NDV – généralement de faible virulence pour les poulets – sont maintenus chez les populations d'oiseaux sauvages. L'introduction initiale chez les populations de volaille domestique pourrait survenir par contact direct ou indirect avec les oiseaux sauvages. On dispose de preuves solides, obtenues à partir d'analyses de virus isolés en Irlande en 1990 et lors des épizooties de ND ayant débuté en 1998 en Australie, selon lesquelles les virus peuvent parfois muter et acquérir une virulence élevée (Alexander 2001 ; Westbury 2001). Du NDV virulent a également été généré par voie expérimentale, à partir de virus de faible virulence après passage chez le poulet (Shengqing *et al.* 2002). De plus, selon l'argumentaire précédent, le NDV virulent pourrait être présent chez les oiseaux sauvages et dans d'autres secteurs ; l'introduction initiale pourrait donc provenir d'un contact avec ces derniers.

Après l'introduction dans un élevage avicole, la propagation secondaire se ferait selon différents modes, tels que : (1) le déplacement des oiseaux vivants, (2) le contact avec d'autres animaux, (3) la circulation des personnes et des équipements, (4) la circulation des produits avicoles, (5) la propagation dans l'air, (6) la

contamination des aliments pour volaille, (7) la contamination de l'eau et (8) les vaccins (Dans ce cas précis, il s'agit de l'équipe de vaccination qui est intervenu et qui n'a pas assez pris ses précautions : exemple, non changement de vêtement, n'a pas attendu les 3 jours recommandés avant de passer à un autre élevage,...).

Certains de ces modes de propagation vont de soi, alors que d'autres nécessitent un examen plus approfondi ou sont moins évidents. Par exemple, il est clair que les oiseaux susceptibles d'avoir été infectés pourraient être déplacés et, par conséquent, propager la ND pendant la phase d'incubation de la maladie. Un phénomène de plus grande importance serait l'excrétion démontrée de virus virulent par les oiseaux vaccinés et cliniquement normaux, suite à un stress (Alexander *et al.* 1999 ; Guittet *et al.* 1993 ; Parede et Young 1990). Ceci représenterait alors une menace grave, en termes de maladie avérée, pour les oiseaux non vaccinés qui pourraient se trouver en contact avec ces oiseaux ; soit directement, par exemple par les échanges d'oiseaux notamment pour les élevages de poulet en plein air, soit de manière indirecte.

Le rôle de la propagation aérienne de NDV requiert également une attention particulière. Auparavant, la propagation du virus dans l'air avait été considérée comme étant un mode de transmission important dans certaines épizooties (Dawson 1973), mais sans aucune importance dans d'autres (Utterback et Schwartz 1973), même lorsqu'il s'agissait du même virus. Hugh-Jones *et al.* (1973) ont tenté d'évaluer la survie du virus dans l'air. Ils ont été en mesure de détecter le virus aux environs d'un site d'infection, à 64 m sous le vent (quoiqu'en concentrations très faibles dans de très grandes quantités d'air échantillonné) mais pas à 165 m sous le vent. Ces auteurs ont mis l'accent sur l'importance des conditions environnementales, notamment l'humidité relative, dans l'éventualité d'une propagation dans l'air. Ces dernières années, la propagation dans l'air n'a pas fait l'objet de préoccupations lors des épizooties signalées. Il y a en effet presque toujours eu une autre raison, plus probable, en particulier le déplacement des volailles et l'intervention humaine.

2.7 Distribution

L'utilisation répandue à travers le monde de vaccins de NDV chez les volailles commercialisées rend difficile l'évaluation de la véritable distribution géographique de la ND. Il est généralement admis que le NDV virulent est enzootique ou est la cause

d'épizooties régulières de la volaille dans la majeure partie de l'Afrique, de l'Asie, de l'Amérique centrale et dans certaines régions d'Amérique du Sud. Dans des régions plus développées, telles que l'Ouest de l'Europe, des épizooties sporadiques surgissent de façon régulière, malgré l'usage répandu de la vaccination. L'OIE (2007) répertorie seulement cinq pays dans lesquels la maladie n'est jamais survenue (la Guyane française, la Guyane, la Nouvelle Calédonie, Samoa et Vanuatu), 58 pays ayant présenté une « atteinte clinique démontrée » entre juillet 2005 et juin 2007, ainsi que 14 autres pays présentant des « cas non résolus de la maladie ».

2.8 Santé humaine

La première communication décrivant le NDV comme un pathogène humain, fut celle de Burnet publiée en 1943. Dans une revue de la littérature sur la maladie de Newcastle en tant que zoonose, Chang (1981) a répertorié 35 articles, traitant des infections par le NDV chez l'homme, publiés entre 1948 et 1971. Le nombre de publications faites depuis est faible, ce qui reflète probablement l'absence d'effets graves et durables résultant de telles infections, ainsi que leur caractère courant.

Les symptômes les plus fréquemment rapportés et les mieux démontrés chez l'homme sont les infections oculaires. Celles-ci consistent généralement en une rougeur unilatérale ou bilatérale, un larmoiement excessif, un œdème des paupières, une conjonctivite et une hémorragie sous-conjonctivale (Chang 1981). Bien que l'atteinte oculaire soit assez sévère, les infections sont généralement passagères et leur durée n'excède pas un jour ou deux. La cornée n'est pas touchée. Les communications décrivant d'autres symptômes chez l'homme infecté par le NDV sont moins bien documentées. Cependant, une infection plus généralisée, provoquant des frissons, des céphalées et de la fièvre, avec ou sans conjonctivite, a parfois été rapportée (Chang 1981).

Les infections humaines par le NDV ont généralement résulté d'un contact direct avec le virus ou avec des oiseaux infectés ou avec des carcasses d'oiseaux morts. La propagation entre humains n'a pas été rapportée. Les catégories de personnes connues pour avoir été infectées par le NDV comprennent : les employés de laboratoires (il s'agit généralement de la conséquence d'éclaboussure accidentelle de matériel infectieux dans l'œil), les vétérinaires travaillant dans les laboratoires d'analyse diagnostique

(vraisemblablement le résultat de contact avec du matériel infectieux lors d'examen post-mortem), les ouvriers des exploitations avicoles, ainsi que les équipes de vaccination, surtout lorsque les vaccins vivants sont administrés sous forme d'aérosols ou de poussière fine. Chez les personnes ayant des liens reconnus avec la volaille, une quantité significativement supérieure des titres d'anticorps anti-NDV a été rapportée par Pedersen *et al.* (1990).

2.9 Conclusion

La maladie de Newcastle demeure enzootique dans de nombreuses régions du monde, chez les volailles ou dans d'autres secteurs aviaires tels que celui des pigeons voyageurs. Elle représente donc une menace constante pour la plupart des oiseaux d'élevage. Tout groupe de volailles commerciales est en quelque sorte concerné par les mesures de contrôle de la ND et de la propagation du virus. Une grande majorité de pays pratiquant l'élevage commercial de volaille dépend de la vaccination pour la maîtrise de la ND. Dans de nombreux pays, la maladie représente néanmoins un facteur majeur limitant l'expansion de la production de volaille.

L'impact le plus important de la ND pourrait bien être celui d'affecter la production de volailles de village ou de basse-cour. Dans les pays en voie de développement, à travers l'Asie, l'Afrique, l'Amérique centrale et certaines parties de l'Amérique du Sud, le poulet de village représente un atout considérable puisqu'il constitue une source importante de protéine sous forme d'œufs et de viande. Toutefois, la ND est souvent responsable de pertes dévastatrices en volailles de village. Dans les pays en voie de développement, les contraintes sociales et financières rendent extrêmement difficile, voire impossible, la maîtrise de la ND chez les poulets de village. Cette situation entrave le développement de la production de volaille commerciale, ainsi que l'établissement de relations commerciales.

Références

- Aldous EW, Alexander DJ (2001) Technical review: detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol* 30:117–128
- Aldous EW, Fuller CM, Mynn JK, Alexander DJ (2004) A molecular epidemiological investigation of isolates of the variant avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) responsible for the 1978 to present panzootic in pigeons. *Avian Pathol* 33(2):258–269
- Aldous EW, Manvell RJ, Cox WJ *et al.* (2007) Outbreak of Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in south-east England in July 2005. *Vet Rec* 160(14):482–484
- Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ (2003) A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol* 32(3):239–356
- Alexander DJ (ed) Newcastle disease Virus—An avian paramyxovirus. In: DJ Alexander (ed) *Newcastle Disease* Kluwer Academic, Boston, MA, pp11–22
- Alexander DJ (1988b) Newcastle disease: Methods of spread. In: DJ Alexander (ed) *Newcastle disease*. Kluwer Academic, Boston, MA, pp 256–272
- Alexander DJ (2008) Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*)—A review. *Avian Pathol* 29:95–100
- Alexander DJ (2001) Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. *Br Poult Sci* 42(1):5–22
- Alexander DJ (2008) Newcastle disease World Organisation for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 6th ed. Chapter 2.3.14. OIE, Paris, pp 576–589
- Alexander DJ, Banks J, Collins MS *et al.* (1999) Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Vet Rec* 145(15):417–421
- Alexander DJ, Manvell RJ, Banks J *et al.* (1999) Experimental assessment of the pathogenicity of the Newcastle disease viruses from outbreaks in Great Britain in 1997 for chickens and turkeys and the protection afforded by vaccination. *Avian Pathol* 28:501–512
- Alexander DJ, Manvell RJ, Lowings JP *et al.* (1997) Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol* 26(2):399–418
- Alexander DJ, Parsons G (1986) Protection of chickens against challenge with the variant virus responsible for Newcastle disease in 1984 by conventional vaccination. *Vet Rec* 118(7):176–177
- Alexander DJ, Russell PH, Collins MS (1984) Paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 1 characterisation of isolated viruses. *Vet Rec* 114(18):444–446
- Allan WH, Lancaster JE, Toth B (1978) Newcastle disease vaccines—their production and use FAO Animal Production Series No 10 FAO, Rome, 163pp
- Allison AB, Gottdenker NL, Stallknecht DE (2005) Wintering of neurotropic velogenic Newcastle disease

- virus and West Nile virus in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*) from the Florida Keys. *Avian Dis* 49(2):292-297
- Arias-Ibarrodo J, Mikami T, Yamamoto H *et al.* (1978) Studies on a paramyxovirus isolated from Japanese sparrowhawks (*Accipiter virgatus gularis*). I. Isolation and characterization of the virus. *Nippon Juigaku Zasshi* 40:315-323
- Beach JR (1942) Avian pneumoencephalitis. Proceedings of the Annual Meeting of the US Livestock Sanitary Association 46:203-223
- Beach JR (1944) The neutralization in vitro of avian pneumoencephalitis virus by Newcastle disease immune serum. *Science* 100(2599):361-362
- Beard CW, Hanson RP (1984) Newcastle disease. In: Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW *et al.* (eds) *Diseases of poultry* 8th ed. Iowa State University Press, Ames, pp 452-470
- Biancifiore F, Fioroni A (1983) An occurrence of Newcastle disease in pigeons: virological and serological studies on the isolates. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 6(3):247-252
- Blaxland JD (1951) Newcastle disease in shags and cormorants and its significance as a factor in the spread of this disease among domestic poultry. *Vet Rec* 63:731-733
- Burnet FM (1943) Human infection with the virus of Newcastle disease of fowl. *Med J Aust* 2:313-314
- Capua I, Scacchia M, Toscani T, Caporale V (1993) Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs. *Zentralbl Veterinarmed B* 40(9-10):609-612
- Chang PW (1981) Newcastle disease. In: Beran GW (ed) *CRC handbook series in zoonoses section B: Viral zoonoses, volume II*. CRC, Baton Raton pp261-274
- Cleary L (1977) Succès de reproduction du cormoran à aigrettes, *Phalacrocorax auritus auritus*, sur trois Îles du St Laurent, en 1975 et 1976. MSc Thesis, L'Université Laval, pp 1-68
- Collins MS, Bashiruddin JB, Alexander DJ (1993) Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. *Arch Virol* 128(3-4):363-370
- Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E *et al.* (2006) Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res* 120(1-2):36-48
- Dawson, PS (1973) Epidemiological aspects of Newcastle disease. *Bull OIE* 79, 27-34
- Doyle TM (1927) A hitherto unrecorded disease of fowls due to a filter-passing virus. *J Comp Pathol Therapeut* 40:144-169
- Doyle TM (1935) Newcastle disease of fowls. *J Comp Pathol Therapeut* 48:1-20
- Erickson GA, Maré CJ, Gustafson GA *et al.* (1977) Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle disease virus and pet birds of six species. I. Clinical and serologic responses, and viral excretion. *Avian Dis* 21(4):642-654
- Guittet M, Le Coq H, Morin M *et al.* (1993) Proceedings of the Tenth World Veterinary Poultry Association Congress, Sydney, p 179
- Halasz F (1912) Contributions to the knowledge of fowlpest. Veterinary Doctoral Dissertation, Communications of the Hungarian Royal Veterinary School, Patria, Budapest pp 1-36
- Hannoun C (1977) Isolation from birds of influenza viruses with human neuraminidase. *Dev Biol Stand* 39:469-472
- Heckert RA (1993) Ontario. Newcastle disease in cormorants. *Can Vet J* 34(3):184
- Herczeg J, Pascucci S, Massi P *et al.* (2001) A longitudinal study of velogenic Newcastle disease virus genotypes isolated in Italy between 1960 and 2000. *Avian Pathol* 30:163-168
- Herczeg J, Wehmann E, Bragg RR *et al.* (1999) Two novel genetic groups (VIIb and VIII) responsible for recent Newcastle disease outbreaks in Southern Africa, one (VIIb) of which reached Southern Europe. *Arch Virol*, 144(11):2087-2099
- Huang Z, Panda A, Elankumaran S *et al.* (2004) The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol* 78(8):4176-4184
- Hugh-Jones M, Allan WH, Dark FA, Harper GJ (1973) The evidence for the airborne spread of Newcastle disease. *J Hyg* 71(2):325-339
- Jørgensen PH, Handberg KJ, Ahrens P *et al.* (1999) An outbreak of Newcastle disease in free-living pheasants (*Phasianus colchicus*). *Zentralbl Veterinarmed B* 46(6):381-387
- Kaleta EF, Baldauf C (1988) Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander DJ (ed) *Newcastle disease*. Kluwer Academic, Boston, pp 197-246
- Kinde H, Uzal F, Hietala S *et al.* (2003) The diagnosis of exotic Newcastle disease in southern California: 2002-2003. Proceedings of the 46th Annual Conference of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians San Diego, CA, October 11-13 2003
- Kraneveld FC (1926) A poultry disease in the Dutch East Indies. *Nederlands-Indische Bladen voor Diergeneeskunde* 38:448-450
- Kuiken T (1998) Newcastle disease and other causes of mortality in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). PhD Thesis University of Saskatchewan, 174 p
- Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D *et al.* (2005) Family Paramyxoviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J *et al.* (eds) *Virus taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, pp 655-668

- Lancaster JE (1966) Newcastle disease - a review 1926-1964. Monograph no 3, Canada Department of Agriculture, Ottawa
- Lancaster JE, Alexander DJ (1975) Newcastle disease: virus and spread. Monograph no 11, Canada Department of Agriculture, Ottawa
- de Leeuw OS, Hartog L, Koch G, Peeters BP (2003) Effect of fusion protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. *J Gen Virol* 84(Pt 2):475-484
- Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J *et al.* (1998) Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). *Arch Virol* 143(1):49-64
- Macpherson LW (1956) Some observations on the epizootiology of Newcastle disease. *Can J Comp Med* 20(5):155-168
- McFerran JB, McCracken RM (1988) Newcastle disease. In: Alexander DJ (ed) *Newcastle Disease*, Kluwer Academic, Boston, pp 161-183
- Mebatsion T, Verstegen S, De Vaan LT *et al.* (2001) A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J Virol* 75(1):420-428
- Mixson MA, Pearson JE (1992) Velogenic neurotropic Newcastle disease (VNND) in cormorants and commercial turkeys FY 1992. In: *Proceedings of the 96th Annual Meeting of the United States Animal Health Association*, Louisville, Kentucky, 1992, pp 357-360
- OIE (2007) List of countries by disease situation http://www.woeint/wahid-prod/publicphp?page=disease_status_lists accessed 20th September 2007
- Panigrahy B, Senne DA, Pearson JE *et al.* (1993) Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds in 1991. *Avian Dis* 37(1):254-258
- Parede L, Young PL (1990) The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. *Avian Dis* 34(4):803-808
- Pedersen KA, Sadasiv EC, Chang PW, Yates VJ (1990) Detection of antibody to avian viruses in human populations. *Epidemiol Infect* 104:519-525
- Peeters BP, de Leeuw OS, Koch G, Gielkens AL (1999) Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* 73(6):5001-5009
- Pospisil Z, Zendulkova D, Smid B (1991) Unexpected emergence of Newcastle disease virus in very young chicks. *Acta Vet Brno* 60:263-270
- Römer-Oberdorfer A, Veits J, Werner O, Mettenleiter TC (2006) Enhancement of pathogenicity of Newcastle disease virus by alteration of specific amino acid residues in the surface glycoproteins F and HN. *Avian Dis* 50(2):259-263
- Rott R, Klenk HD (1988) Molecular basis of infectivity and pathogenicity of Newcastle disease virus. In: Alexander, DJ (ed) *Newcastle disease*, Kluwer Academic, Boston, pp 98-112
- Senne DA, Pearson JE, Miller LD, Gustafson GA (1983) Virus isolations from pet birds submitted for importation into the United States. *Avian Dis* 27(3):731-744
- Shengqing Y, Kishida N, Ito H *et al.* (2002) Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a non pathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology* 301(2):206-211
- Utterback WW, Schwartz JH (1973) Epizootiology of velogenic viscerotropic Newcastle disease in southern California, 1971-1973. *J Am Vet Med Assoc* 163(9):1080-1088
- Westbury H (2001) Commentary Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Pathol* 30:5-11
- Wobeser G, Leighton FA, Norman R *et al.* (1993) Newcastle disease in wild water birds in western Canada. *Can Vet J* 34(6):353-359

Notification de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE)

3

Antonio Petrini et Bernard Vallat

3.1 L'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et sa mission

L'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) est une organisation intergouvernementale créée en 1924 par un accord international. En mai 2007, elle comptait 169 pays membres. L'OIE établit des normes à destination des pays membres afin qu'ils puissent se protéger en prévenant l'introduction de maladies sans pour autant instaurer de barrières sanitaires injustifiées. Ces normes sont élaborées sur des bases scientifiques par des commissions de spécialistes élus, ainsi que par des groupes de travail constitués d'experts scientifiques mondialement reconnus dans leurs domaines d'expertise. La plupart de ces experts appartiennent au réseau international de l'OIE composé en 2007 de 190 centres collaborateurs et laboratoires de référence. Les normes sont adoptées par l'assemblée générale des pays membres lors de leurs sessions annuelles, en mai, à Paris. Les normes de l'OIE sont reconnues par l'Organisation mondiale du commerce (OMC) en tant que références sanitaires internationales. L'une des principales missions de l'OIE est de garantir la transparence de la situation des maladies animales dans le monde. Chacun des pays membres s'engage à déclarer les maladies animales détectées sur son territoire. L'OIE diffuse alors l'information à tous les autres pays afin qu'ils puissent prendre les mesures préventives nécessaires. Les maladies transmissibles à l'homme et l'introduction intentionnelle de pathogènes sont également signalées. L'information est diffusée immédiatement ou périodiquement, en fonction de la gravité de la maladie. Cette démarche s'applique aussi bien aux maladies se manifestant naturellement qu'à celles qui sont provoquées de façon intentionnelle. Afin de mener à bien sa mission, l'OIE administre le système d'information WAHIS (World Animal Health Information System). L'accès

à ce logiciel est restreint et permet aux utilisateurs des pays membres, en particulier aux délégués et à leurs représentants de soumettre à l'OIE par voie électronique, des rapports normalisés de notification (notifications immédiates, rapports de suivi, rapports semestriels et rapports annuels). Non seulement ce système met à la disposition des pays une méthode plus simple et plus rapide d'expédier des notifications et des rapports zoonitaires, mais il leur permet aussi de bénéficier des nouvelles capacités d'analyse mises en place afin de produire immédiatement des informations essentielles et utiles. L'interface de la base de données du système mondial d'information sanitaire (WAHID) permet au public d'accéder à toutes les informations contenues dans WAHIS.

3.2 Liste unique de maladies animales de l'OIE

En 2001, l'OIE fut chargée d'établir une liste unique de maladies animales qui remplaça les listes A et B. En 2004, les pays membres définirent et approuvèrent des critères, établis sur des bases scientifiques, permettant de répertorier une maladie dans cette liste (OIE 2007c) (Tableau 3.1). L'objectif était de développer des critères acceptables pour tous les pays membres et de s'assurer que toute maladie serait répertoriée, si elle était jugée très importante. Le critère prépondérant pour qu'une maladie soit répertoriée sur la liste est le risque potentiel de propagation internationale. D'autres critères sont aussi pris en considération tels que le risque potentiel de zoonose ou encore le risque potentiel de propagation significative dans les populations naïves. Chaque critère comporte des paramètres mesurables. Une maladie est ajoutée à la liste de l'OIE dès lors qu'elle comporte au moins un de ces paramètres et satisfait à un ou plusieurs critères, en plus de son risque potentiel de propagation internationale.

Tableau 3.1 Critères de classification d'une maladie dans la liste de l'OIE

Critère de base (tenant toujours compte du scénario catastrophe)	Paramètres (au moins une réponse « oui » signifie que le critère a été satisfait)
Propagation internationale	Une propagation internationale a-t-elle été prouvée en trois occasions ou plus ? OU Y a-t-il au moins trois pays ayant des populations d'animaux sens- sibles exempts de maladie ou proches de cet état (selon les provi- sions du code et notamment l'An- nexe 3.8.1) ? OU Les rapports annuels de l'OIE indiquent-ils qu'un nombre impor- tant de pays ayant des populations sensibles ont signalé l'absence de maladie pendant plusieurs années consécutives ?
Potentiel zoonotique	La transmission aux êtres humains a-t-elle été prouvée ? (à l'excepti- on de circonstances artificielles) ET L'infection humaine a-t-elle eu des conséquences graves ? (mort ou maladie prolongée)
Propagation importante dans les populations naïves	La maladie présente-t-elle une mor- bidité importante au niveau d'un pays ou d'un compartiment ? ET/ OU La maladie présente-t-elle une morbidity importante au niveau d'un pays ?
Maladies émergentes (pathogène nouvellement reconnu ou pathogène connu se comportant différem- ment) ou compartiment	Y a-t-il propagation rapide accom- pagnée de morbidité/mortalité et/ou propriétés zoonotiques apparentes ?

Une maladie émergente sera inscrite sur la liste de l'OIE si elle a un impact zoonotique ou un impact significatif sur la morbidité ou la mortalité dans une population naïve. En traitant les maladies émergentes de cette façon, il est possible d'éviter leur propagation au-delà des frontières vers d'autres zones ou d'autres régions. Cette possibilité d'inclusion de nouvelles maladies émergentes permettra, à l'avenir, d'aborder ces maladies de manière plus efficace, puisque l'on sait que leur nombre augmentera certainement du fait de la mondialisation de l'urbanisation, des changements climatiques, etc.

L'influenza aviaire hautement pathogène chez les oiseaux (IAHP) et l'influenza aviaire faiblement pathogène à déclaration obligatoire chez les volailles (IAFPD) (tels que définies au chapitre 2.7.12 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres*) de même que la maladie de Newcastle (MN) sont inscrites sur la liste de l'OIE sous l'intitulé « Maladies des volailles. »

3.3 Notification et information épidémiologique

3.3.1 Notification immédiate et suivi

Selon le système de notification de l'OIE, non seulement les maladies mais aussi les infections sans signes cliniques et les autres événements épidémiologiques importants doivent être notifiés d'urgence, dans les 24 heures, par le pays membre. Les événements épidémiologiques importants doivent être notifiés immédiatement à l'OIE, conformément aux dispositions de l'article 1.1.2.3 du chapitre 1.1.2 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* (OIE 2007b), intitulé « Notification et information épidémiologique ».

- Les événements épidémiologiques importants nécessitant une notification immédiate par les pays membres sont les suivants :
- la première identification d'une maladie ou d'une infection figurant sur la liste de l'OIE dans un pays, une zone ou un compartiment ;
- la réémergence d'une maladie ou d'une infection inscrite sur la liste dans un pays, une zone ou un compartiment faisant suite à un rapport du membre signalant que le(s) précédent(s) foyer(s) avait (avaient) été résorbé(s) ;
- la première apparition d'une nouvelle souche d'agent pathogène d'une maladie figurant sur la liste dans un pays, une zone ou un compartiment ;
- une augmentation, soudaine et inattendue, de la morbidité ou de la mortalité engendrée par une maladie existante inscrite sur la liste ;
- l'apparition de toute maladie émergente présentant un taux de morbidité ou de mortalité ou un potentiel zoonotique élevés ;
- la preuve d'une évolution de l'épidémiologie d'une maladie inscrite sur la liste (en matière, par exemple, de diversité des hôtes, de pouvoir pathogène, de souche de l'agent causal), particulièrement s'il existe un impact zoonotique.

La plupart des conditions relevaient précédemment des maladies de la liste A. Avec la mise en place de la liste unique, lesdites conditions ont été

reportées à une liste plus longue de maladies. De plus, les nouvelles obligations des pays membres prennent clairement en considération la notion d'infection ne comportant pas de manifestation clinique de la maladie. Les nouvelles obligations des pays membres s'adaptent mieux aux maladies émergentes, y compris les maladies de nature zoonotique. Elles vont même plus loin en y incluant un concept nouveau, c'est-à-dire la notification d'un événement émergent même si l'agent étiologique en cause est inconnu ou n'a pas encore été identifié.

3.4 Influenza aviaire

La définition de « l'influenza aviaire soumise à déclaration » (IAD) décrite au chapitre 2.7.12 du *Code sanitaire pour les animaux terrestres* (OIE 2007d) et adoptée par le Comité international de l'OIE lors de la 75^e assemblée générale, est la suivante :

« À des fins d'échanges internationaux, l'influenza aviaire sous sa forme dite 'à déclaration obligatoire' (IAD) est définie comme une infection des volailles causée par tout virus influenza de type A appartenant aux sous-types H5 et H7 ou par tout virus influenza d'origine aviaire dont l'indice de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) est supérieur à 1,2 (ou bien entraînant une mortalité d'au moins 75 %), comme décrit ci-dessous. Les virus de l'IAD peuvent être classés en deux catégories : les virus de l'influenza aviaire à déclaration obligatoire hautement pathogènes (IAHPD) et les virus de l'influenza aviaire à déclaration obligatoire faiblement pathogènes (IAFPD) :

- a) les virus IAHPD ont un IPIV supérieur à 1,2 chez les poulets âgés de six semaines, ou bien entraînent une mortalité d'au moins 75 % chez des poulets de quatre à huit semaines infectés par voie intraveineuse. Les virus de sous-types H5 et H7 dont l'IPIV n'est pas supérieur à 1,2 ou qui entraînent une mortalité inférieure à 75 % lors d'un test de létalité par voie intraveineuse, doivent être séquencés pour déterminer si de multiples acides aminés basiques sont présents sur le site de clivage de la molécule d'hémagglutinine HA0 ; si la séquence d'acides aminés est similaire à celle observée chez d'autres virus IAHPD isolés précédemment, il doit être considéré qu'il s'agit du virus responsable de la forme hautement pathogène de la maladie IAHPD ;
- b) les virus IAFPD comprennent tous les virus influenza de type A appartenant aux sous-types H5 et H7, qui ne sont pas des virus IAHPD. »

Dans le même chapitre, les « volailles » sont décrites comme étant :

« ... tous les oiseaux domestiqués (y compris les volailles de basse-cour) qui sont utilisés pour la production de viande ou d'œufs de consommation, la production d'autres produits commerciaux, la fourniture de gibier de repeuplement ou pour la reproduction de toutes ces catégories d'oiseaux, ainsi que les coqs de combat quelles que soient les finalités pour lesquelles ils sont utilisés. Ne sont pas considérés comme des volailles les oiseaux détenus en captivité pour des motifs distincts de ceux exposés au paragraphe précédent (à titre d'exemple, les oiseaux détenus à des fins d'exposition, de courses, de démonstrations publiques et de compétition ou à des fins de reproduction ou de vente de toutes ces catégories d'oiseaux, ainsi que les oiseaux de compagnie ».

Le chapitre ne traite pas seulement de la manifestation de signes cliniques causés par le virus IAD, mais aussi de la présence d'infection par le virus IAD en l'absence de signes cliniques.

La présence du virus IA chez les oiseaux sauvages constitue un problème particulier. Aucun pays ne peut, par essence, se déclarer exempt d'IA porté par les oiseaux sauvages. Cependant, la définition de l'IAD fait référence uniquement aux infections de volailles et stipule « qu'à des fins d'échanges internationaux, un pays ne devrait pas imposer de sanctions commerciales immédiates en réponse à une notification d'infection par les virus IAHPD et IAFP chez les oiseaux autres que les volailles ».

Concernant la présence d'anticorps : « Les anticorps dirigés contre les sous-types H5 ou H7 des virus IAD ayant été détectés chez les volailles et ne provenant pas de la vaccination, doivent faire l'objet d'une investigation plus approfondie. » Si l'on obtient des résultats sérologiques positifs isolés, l'infection par l'IAD peut être écartée sur la base d'une recherche épidémiologique minutieuse ne dévoilant pas d'autres preuves d'infection par l'IAD.

La présence d'infection par l'IAD est avérée :

- a) lorsque le virus IAHPD a été isolé et identifié en tant que tel ou lorsque l'ARN viral spécifique de l'IAHPD a été détecté chez les volailles ou dans un produit issu de l'aviculture ; ou
- b) lorsque le virus IAFP a été isolé et identifié en tant que tel ou lorsque l'ARN viral spécifique de l'IAFP a été détecté chez les volailles ou dans un produit issu de l'aviculture.

Les normes pour les épreuves diagnostiques (incluant les tests de pathogénicité) sont décrites dans le *Manuel terrestre* (OIE 2004b). Tout vaccin utilisé doit satisfaire aux normes décrites dans le manuel (OIE 2004c).

Le statut de l'IAD dans un pays, une zone ou un compartiment peut être déterminé en se basant sur les critères suivants :

- le résultat d'une appréciation du risque identifiant tous les facteurs potentiels de manifestation de l'IAD, ainsi que l'historique de chacun d'entre eux ;
- la notification de l'IAD à l'ensemble du pays à travers un programme continu de sensibilisation à l'IAD et toutes les manifestations suspectes et notifiées d'IAD font l'objet d'investigations sur le terrain et, s'il y a lieu, en laboratoire ;
- la mise en place d'un dispositif de surveillance adéquat afin de démontrer la présence d'infection en l'absence de signes cliniques chez les volailles et de déterminer le danger que représentent les oiseaux autres que les volailles. Cela peut être réalisé grâce à un programme de surveillance de l'IAD conformément aux dispositions de l'Annexe 3.8.9 du *Code terrestre* (OIE 2007a).

3.5 Maladie de Newcastle

Il est probable que la grande majorité des oiseaux seraient sensibles à l'infection par les virus MN à la fois de forte et de faible virulence pour les poulets ; et ce, bien que les signes cliniques observés chez les oiseaux infectés par le virus MN varient énormément et dépendent de facteurs tels que le virus, l'espèce hôte, l'âge de l'hôte, l'infection par d'autres organismes, les pressions liées à l'environnement et le statut immunitaire. Dans certains cas, l'infection par des virus extrêmement virulents peut entraîner une mortalité élevée soudaine, malgré des signes cliniques relativement peu nombreux.

Les virus MN présentent une large gamme de virulence, même chez les hôtes sensibles tels que les poulets. En général, la variation est composée de groupes se situant autour des deux extrêmes, comme le démontrent les tests utilisés pour évaluer la virulence. Cependant, certains virus peuvent présenter une virulence intermédiaire, pour diverses raisons.

La variation considérable de la virulence et des signes cliniques indique qu'il est nécessaire de définir avec précaution ce qui constitue la MN, notamment dans le cadre d'échanges commerciaux, de mesures de contrôle et de politiques sanitaires. La définition de l'OIE (OIE 2004c) pour la notification d'un foyer de MN est indiquée au chapitre 2.

Le virus de la maladie de Newcastle présente un risque élevé de propagation à partir des laboratoires. Par conséquent, une appréciation du risque doit être réalisée afin de déterminer le niveau de biosécurité

nécessaire au diagnostic et à la caractérisation du virus. Les pays n'ayant pas accès à de tels laboratoires nationaux ou régionaux spécialisés doivent expédier les échantillons à un laboratoire de référence de l'OIE.

Selon les dispositions du chapitre du *Code terrestre* (OIE 2007e) traitant de la maladie de Newcastle, un pays peut être considéré comme indemne de la MN lorsqu'il a été démontré que la MN n'y existe pas depuis trois ans au moins. Ce délai est ramené à six mois après l'abattage du dernier animal infecté, pour les pays dans lesquels une politique d'éradication est pratiquée, associée ou pas à la vaccination contre la MN.

Les services d'administration vétérinaires des pays exempts de MN peuvent interdire l'importation ou le transit sur leur territoire de marchandises en provenance des pays considérés comme infectés par la MN :

- tout oiseau domestique et sauvage ;
- des oiseaux âgés d'un jour ;
- des œufs à couver ;
- de la semence d'oiseaux domestiques et sauvages ;
- des viandes fraîches d'oiseaux domestiques et sauvages ;
- des produits carnés d'oiseaux domestiques et sauvages et n'ayant pas été traités dans le but d'assurer la destruction du virus MN ;
- des produits d'origine animale (provenant d'oiseaux) et destinés à l'alimentation animale ou à l'agriculture ou à l'industrie.

Références

- Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2004a) Chapter 1.1.7 Principles of veterinary vaccine production. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, http://www.oie.int/eng/normes/manual/A_00018.htm
- Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2004b) Chapter 2.7.12 Avian Influenza. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm
- Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2004c) Chapter 2.7.15 Avian Influenza. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00038.htm
- Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2007a) Appendix 3.8.9 Guidelines for the surveillance of avian influenza. In: Terrestrial animal health code, 16th edn. OIE, Paris

Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2007b) Chapter 1.1.2 Notification and epidemiological information. In: Terrestrial animal health code, 16th edn. OIE, Paris

Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2007c) Chapter 2.1.1 Criteria for listing diseases. In: Terrestrial animal health code, 16th edn. OIE, Paris

Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2007d) Chapter 2.7.12 Avian Influenza. In: Terrestrial animal health code, 16th edn. OIE, Paris
Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2007e) Chapter 2.7.13 Newcastle disease. In: Terrestrial animal health code, 16th edn. OIE, Paris

Interventions d'urgence en cas de suspicion d'une épizootie d'influenza aviaire ou de maladie de Newcastle

Manuela Dalla Pozza et Stefano Marangon

4.1 Introduction

La gestion d'urgence des maladies animales est essentielle lors d'apparition de foyers de maladies contagieuses dans un pays ou une zone indemne d'infection. Dans de telles circonstances, les maladies animales peuvent entraîner des conséquences socioéconomiques graves dans un pays ou une zone donnés. Ces maladies peuvent également se propager facilement et atteindre des dimensions épizootiques, ce qui nécessite alors l'intervention commune et coordonnée de plusieurs pays.

Une des conditions préalables à la gestion appropriée de telles situations d'urgence est l'identification rapide de toute maladie infectieuse. Cette identification n'est cependant utile qu'à condition que l'infrastructure en place puisse répondre rapidement et de façon adéquate à la situation d'urgence, afin que les mesures nécessaires au contrôle et à l'élimination progressive de l'infection puissent être mises en place.

Par conséquent, l'éradication rapide des maladies animales hautement contagieuses dépend du niveau de préparation en réponse à leur introduction dans une zone indemne de maladies, ainsi qu'à la façon dont cette réponse est mise en place à partir du moment de la suspicion. L'influenza aviaire (IA) et la maladie de Newcastle (MN) comptent parmi les principales préoccupations des organisations d'élevage, en raison des pertes économiques que ces maladies imposent à l'industrie avicole. Ces pertes se traduisent en termes de morbidité et de mortalité chez les animaux sensibles, de perturbations du système des échanges commerciaux suite à la mise en place des politiques de restriction, ainsi que d'implications potentielles sur la santé humaine, dans le cas de l'IA.

La façon de gérer un cas index suspecté d'IA ou de MN hautement pathogène est primordiale dans la mise en place ultérieure d'actions visant au contrôle de la propagation de l'infection suivie de l'éradication rapide du

virus. Elle inclut des actions menées aussi bien au niveau des services vétérinaires locaux qu'au niveau des exploitations. Ces actions doivent faire l'objet d'une coordination centrale afin d'assurer la circulation de l'information essentielle à un processus décisionnel bien éclairé. Le succès de toute stratégie d'intervention d'urgence repose sur le niveau de préparation (y compris les plans d'action et les ressources en main d'œuvre et en équipements), ainsi que sur la communication et la coordination entre les parties concernées. L'amélioration des stratégies d'intervention mondiales repose sur la disponibilité de l'information relative aux succès et aux échecs rencontrés dans la gestion des épizooties sur le terrain.

4.2 Préparation à la gestion d'une épizootie d'IA

Dans l'éventualité d'une épizootie, une stratégie de contrôle de la maladie doit être adoptée conformément aux obligations internationales. L'objectif de tout pays s'efforçant de maîtriser la propagation de toute maladie est de rétablir aussi vite que possible une situation indemne de maladie. Un plan d'urgence, indiquant les mesures devant être mises en place au niveau national en cas d'épizootie, devrait être disponible. Le plan d'urgence est un outil important de la gestion d'une situation de crise causée par une maladie. Il doit comporter deux documents principaux : un plan de ressources et un manuel d'opérations tenu à jour. Ce dernier devrait décrire en détails et de façon exhaustive et pratique toutes les actions, les procédures, les instructions et les mesures de contrôle devant être mises en place pour appréhender une épizootie d'IA ou de MN. Ces directives doivent être mises à la disposition des éleveurs et des vétérinaires travaillant sur les exploitations (en leur fournissant les informations relatives à la biosécurité et à la prise de conscience de

la maladie), des autorités vétérinaires compétentes (en leur fournissant des informations sur le personnel, les ressources, les équipements et installations, les instructions relatives à la notification, l'abattage et l'élimination des oiseaux, la compensation, la désinfection, la vaccination d'urgence, ainsi que tout autre secteur d'activité en rapport) ainsi qu'aux laboratoires de diagnostic (en leur fournissant l'information relative aux équipements nécessaires, à la manipulation des échantillons et aux procédures de diagnostic). Le manuel d'opérations fournit une feuille de route claire permettant d'organiser les activités à différents niveaux (exploitation, laboratoire, unité de crise), dès la notification d'une suspicion clinique d'animaux, d'équipements et de véhicules à partir des locaux suspects. Une évaluation initiale de la situation à l'exploitation doit aussi être effectuée. Cette première évaluation du foyer suspect a pour objectif l'identification rapide des espèces animales et du nombre d'oiseaux, de leur répartition sur l'exploitation, de l'historique de la maladie et des déplacements récents à partir du foyer suspect et vers celui-ci.

4.3 Action menée au moment de la suspicion

Dès le moment où la suspicion d'IA ou de MN est rapportée aux autorités appropriées, le vétérinaire officiel (VO) identifie la personne ayant signalé cette suspicion. Si cette dernière est un éleveur, le VO prend note des informations concernant :

- a) l'emplacement, les caractéristiques et le nombre d'oiseaux et d'autres animaux se trouvant sur l'exploitation ;
- b) la présence de personnel et de véhicules ;
- c) les récents déplacements de personnes, d'équipements, de véhicules et d'animaux.

4.3.1 Signaler la suspicion

Le vétérinaire privé ou de l'exploitation a pour obligation de seconder le VO dans la collecte d'informations. Si un retard est prévu entre l'arrivée du VO et le moment de la suspicion, le vétérinaire de l'exploitation et/ou le vétérinaire privé se doivent de faire tout ce qui est en leur pouvoir pour empêcher la propagation de l'infection. Le VO doit informer l'autorité vétérinaire locale ou régionale, le centre d'épidémiologie local ou régional et le laboratoire officiel de la suspicion d'IA. Par ailleurs, le

VO localise l'unité de désinfection mobile la plus proche, lui indique la suspicion d'IA et se munit lui-même d'un kit d'échantillonnage spécialisé.

4.3.2 Visite de l'exploitation

Lors de la visite de l'exploitation, toutes les précautions doivent être prises pour éviter une propagation plus importante de l'infection. Le véhicule du VO et celui du vétérinaire de l'exploitation/privé doivent être laissés en dehors des locaux contaminés, à une distance sûre de l'entrée de l'exploitation. Le VO doit utiliser des équipements appropriés à la visite de l'exploitation (vêtements de protection, matériel d'échantillonnage, etc. ; voir liste en Annexe 1). Le VO coordonne les mesures prises au niveau de l'exploitation afin d'éviter les déplacements de personnes, d'animaux, d'équipements et de véhicules à partir des locaux suspects. Une évaluation initiale de la situation à l'exploitation doit aussi être effectuée. Cette première évaluation du foyer suspect a pour objectif l'identification rapide des espèces animales et du nombre d'oiseaux, de leur répartition sur l'exploitation, de l'historique de la maladie et des déplacements récents à partir du foyer suspect et vers celui-ci.

4.3.3 Bilan clinique et collecte d'échantillons

Cette évaluation initiale doit être suivie d'un examen clinique précis des oiseaux atteints, afin de déterminer l'état clinique des animaux sensibles, tant les malades que les suspects. L'investigation clinique doit être réalisée sur toutes les espèces sensibles du site et doit commencer par les unités n'ayant pas été cliniquement touchées. Une attention particulière doit être portée à l'historique des vaccinations de l'exploitation. Toutes ces informations doivent être rapportées dans l'enquête épidémiologique.

Tous les oiseaux présents doivent être identifiés *selon l'espèce* et chaque espèce identifiée doit faire l'objet d'un rapport d'épizootie comportant :

- le nombre d'oiseaux et leur emplacement dans les divers enclos et compartiments de l'exploitation ;
- la date d'apparition des signes cliniques ;
- une description des signes cliniques ;
- le pourcentage de mortalité rapporté.

Un examen *post-mortem* des animaux morts (ou des animaux euthanasiés moribonds) doit être effectué après le recueil des données préliminaires.

Des prélèvements doivent ensuite être effectués sur les organes présentant des lésions pathologiques. Les organes appartenant à des systèmes différents ne doivent pas être regroupés et il faut éviter, autant que possible, d'utiliser une paire de ciseaux ou une pince unique, à cause du risque de contamination croisée lors de l'exérèse d'organes. Les échantillons recueillis doivent ensuite être correctement conditionnés (dans des récipients étanches emballés dans au moins deux sacs en plastique), afin d'éviter la dissémination de l'agent infectieux. Ils doivent enfin être transportés au laboratoire sous réfrigération. Les animaux éliminés peuvent être transportés dans un sac en plastic autoclavable scellé, glissé dans un sac identique, également scellé. Tous les échantillons doivent être transportés au laboratoire dans une boîte en polystyrène contenant des sacs réfrigérants. L'extérieur de la boîte en polystyrène doit être convenablement désinfecté avant que celle-ci ne quitte les locaux. Les échantillons doivent être accompagnés d'un formulaire comportant les informations principales relatives au foyer suspect.

4.3.4 Enquête épidémiologique

Une enquête épidémiologique précise doit être menée en vue de la collecte de données et d'informations utiles à la mise en place d'actions ultérieures dans les locaux contaminés et dans les élevages qui sont à proximité de ces derniers (voir Annexe 2). Le but ultime de l'enquête épidémiologique est de déterminer :

- l'origine et la date de l'infection ;
- les moyens par lesquels l'infection aurait pu se répandre aux autres élevages (déplacements d'animaux, de véhicules et de personnel ; élevages infectés situés à proximité rapprochée du foyer suspect) ;
- les élevages à risque d'infection.

La collecte de données fiables et exhaustives peut être facilitée par l'utilisation d'un questionnaire standardisé. Celui-ci devrait être préparé pendant les périodes sans maladies et inclure toutes les informations pertinentes relatives aux caractéristiques des élevages, ainsi qu'aux facteurs de risques d'introduction et de propagation de l'IA : type d'exploitation et de gestion, type et nombre d'oiseaux, présence de facteurs de risques d'IA, anamnèse et constatations anatomopathologiques et cliniques.

Les données concernant les facteurs de risque relatifs à l'introduction et à la propagation de l'IA doivent être rassemblées ; elles doivent couvrir la période de risque d'introduction de virus (PVI) et la

période de risque de dissémination du virus à partir de l'exploitation (PVS) et être transcrites sur le formulaire d'enquête épidémiologique. La date critique est définie comme étant l'instant le plus précoce où le virus pourrait avoir pénétré dans les locaux infectés. Elle devrait concorder avec la période d'incubation maximale définie par le code de l'OIE. La PVI devrait être identifiée dans la période de 21 jours précédant l'apparition des premiers signes cliniques. Théoriquement, la PVS peut coïncider avec la PVI. En pratique, la période la plus dangereuse en termes de dissémination virale se situe entre une semaine avant l'apparition des signes cliniques et la date à laquelle l'exploitation a été placée en quarantaine. Le VO et le vétérinaire de l'exploitation doivent remplir le formulaire d'enquête épidémiologique avec soin, notamment en rassemblant les informations relatives aux facteurs de risques présents lors des PVI et PVS mentionnées précédemment. En ce qui concerne l'enquête épidémiologique, il est essentiel que les déplacements d'animaux, de personnes et de véhicules accédant à l'exploitation soient signalés et retracés. L'information obtenue lors du traçage des itinéraires aidera à déterminer l'étendue de la zone à risque et à identifier tout autre local suspect ou contaminé. Il est nécessaire de récolter les informations suivantes :

- les déplacements en direction de et à partir des locaux contaminés et suspects, sur une période minimale de 21 jours précédant le premier rapport de morbidité ou de mortalité inhabituelle. L'obtention de cette information est une priorité absolue ;
- les déplacements d'oiseaux, d'œufs, de produits avicoles, de nourriture, de litière, de déchets, d'équipements, de personnes et éventuellement d'autres espèces animales ;
- les déplacements de camions (tous les véhicules, indépendamment de leurs contacts avec les animaux) ;
- après interrogatoire des personnes impliquées dans la livraison de nourriture, les équipes de vaccination ou de ramassage de poulets, les commerçants, le personnel de l'exploitation, les vétérinaires et la famille, compilation d'une liste de tous les contacts possibles ayant eu lieu après la visite des locaux contaminés (pendant les trois jours qui suivent cette visite, dans le cas de l'IA et les sept jours dans le cas de la MN).

Dès son aboutissement, l'enquête épidémiologique doit être expédiée (éventuellement télécopiée) aux autorités compétentes. L'équipe chargée de l'épidémiologie a la responsabilité d'analyser les données provenant des foyers sur le terrain et d'élaborer une

feuille de route destinée au VO et comprenant :

- la mention de la zone à haut risque dans laquelle des programmes intensifs de surveillance devraient être mis en place ;
- une liste des élevages ayant été en contact et classés selon le niveau de risque.

Ces unités doivent être placées sous surveillance vétérinaire stricte et visitées au moins une fois par jour. La fiabilité de l'exercice de traçage d'itinéraire dépend de la coopération des éleveurs et de l'efficacité des méthodes utilisées pour répertorier les animaux ainsi que les allées et venues aux alentours des foyers.

4.3.5 Action supplémentaire aux endroits suspectés

Le VO doit également revoir les dispositifs de sécurité et veiller à l'application des mesures de restriction. Il est recommandé de présenter aux éleveurs des consignes écrites ainsi qu'une liste de règles à respecter afin d'éviter une propagation plus importante de l'infection. À titre d'exemple :

- les animaux ne doivent pas être déplacés de leur enclos ;
- les animaux ne doivent pas entrer ou sortir de l'exploitation ;
- les visiteurs ne sont pas autorisés sur le site, sauf pour les services essentiels ;
- tous les visiteurs doivent être préparés à changer complètement de tenue vestimentaire, de bottes, etc. ;
- les visiteurs doivent se plier aux protocoles de désinfection lorsqu'ils quittent les locaux.

Le groupe de travail doit également identifier tous les accès aux locaux et s'assurer de leur contrôle afin de limiter l'accès des personnes et des véhicules. Les voies d'accès doivent aussi être équipées de points de désinfection (pédiluves et rotoluves, unités mobiles de désinfection, pulvérisateurs, etc.). Par ailleurs, il est utile d'effectuer, pendant cette phase, une évaluation préliminaire des procédures d'abattage et d'élimination applicables dans ces circonstances (voir Chapitre 12).

4.3.6 Action au niveau des services vétérinaires locaux

Le foyer suspect doit être notifié aux autorités locale et centrale et le plan d'urgence local doit être mis en place. En attendant les résultats des investigations de

laboratoire, il est essentiel de prévoir un centre de gestion de crise et d'identifier toutes les ressources nécessaires qui devront être consacrées à la gestion de la crise. De plus, il est indispensable d'identifier par avance les zones de restriction, afin que les mesures de contrôle devant être mises en place puissent être soutenues par un processus décisionnel bien documenté. Il est également primordial d'évaluer les besoins en personnel dans la mise en place des procédures de contrôle. En effet l'issue des stratégies d'intervention dépend de la disponibilité des ressources en main d'œuvre qualifiée, en particulier lorsque des campagnes d'éradication sont menées dans des zones avicoles densément peuplées.

Les méthodes de tri et d'élimination (incinération, enfouissement et traitement dans des usines d'équarrissage) doivent être revues afin de choisir la méthode la plus « appropriée », tout en tenant compte des facteurs suivants :

- le nombre d'oiseaux présents sur le site ;
- les effets de l'élimination sur l'environnement ;
- la région où se situe le terrain utilisé pour l'évacuation des carcasses (caractéristiques hydrogéologiques) ;
- la disponibilité d'une main d'œuvre qualifiée et d'équipements appropriés ;
- la capacité des usines d'équarrissage et la disponibilité de camions de transport appropriés ;
- les frais encourus et le temps nécessaire à l'aboutissement des procédures d'éradication.

Après avoir sélectionné les méthodes d'élimination des carcasses, il faut évaluer la main d'œuvre et les équipements nécessaires à l'achèvement des procédures d'éradication, de nettoyage et de désinfection et avertir le personnel (les abatteurs, les entrepreneurs, etc.).

4.3.7 Départ de l'exploitation

Après la visite clinique et la collecte des échantillons, le VO et le vétérinaire de l'exploitation désinfectent leurs tenues de protection dans le vestiaire désigné à cet effet et rassemblent tous les équipements stérilisables dans un sac autoclavable. Ce dernier est scellé et introduit dans un deuxième sac dont l'extérieur est désinfecté. Tout le matériel à usage unique, les feuilles de papier, les tenues jetables et les protections de chaussures est mis dans un sac en plastique qui est laissé sur le site.

5.1 Examen *post-mortem*

5.1.1 Introduction

Le prélèvement d'échantillons destinés aux examens virologiques nécessite plusieurs paires de ciseaux et de pinces, en particulier si l'on entreprend l'isolement de virus à partir d'un seul type d'organe. Effectuer des prélèvements d'organes d'appareils anatomiques différents avec les mêmes instruments peut entraîner une contamination croisée des échantillons. Cette règle s'applique également au cas où des oiseaux appartenant à des espèces différentes (ou provenant de locaux différents) seraient examinés en même temps. Les manipulateurs doivent respecter les directives de biosécurité indiquées en Annexe 3.

5.1.2 Méthode

Il est fortement recommandé de mouiller le plumage à l'aide d'une solution désinfectante, afin de limiter la dispersion de poussière et de plumes contaminées. L'oiseau doit être placé sur le dos, les pattes dirigées vers l'opérateur (Fig. 5.1). Après déboîtement des articulations coxofémorales, la peau de l'abdomen est incisée et rabattue (Fig. 5.2). L'examen des muscles pectoraux superficiels permet de rechercher la présence d'une diminution de la masse musculaire, d'une pâleur (anémie), d'hémorragies, de congestion ou de meurtrissures.

Les muscles abdominaux, les côtes et l'os coracoïde sont découpés à l'aide de ciseaux robustes (ciseaux à volaille) (Fig. 5.3) et écartés afin d'exposer les organes internes et la cavité de la poitrine (Fig. 5.4, 5.5). Le foie, les poumons, le cœur et les sacs aériens peuvent alors être examinés. Les poumons ainsi que la trachée doivent être retirés de la cage thoracique avec précaution (Fig. 5.6).

Une incision longitudinale du larynx, de la trachée et du syrinx facilitera l'examen minutieux de la muqueuse



Fig. 5.1 Positionnement initial en vue de l'examen *post-mortem*. L'oiseau est placé sur le dos, les pattes dirigées vers l'opérateur.

(Fig. 5.7) et le prélèvement d'échantillons par écouvillonnage (Fig. 5.8).

Le tractus gastro-intestinal peut être sectionné entre l'œsophage et le proventricule (Fig. 5.9a) et près du cloaque, à proximité du rectum (Fig. 5.9b). Le proventricule, le gésier et l'intestin peuvent alors être enlevés, ainsi que le pancréas, le foie et la rate. La rate est un petit organe rond et rouge, situé à la jonction entre le proventricule et le gésier. Le proventricule et le gésier doivent être incisés et ouverts à la recherche de nourriture (indiquant



Fig. 5.2 La peau du bréchet, de l'abdomen et des pattes est rabattue puis les pattes sont tirées et pivotées afin de séparer les surfaces articulaires de la tête du fémur et de l'acétabulum.

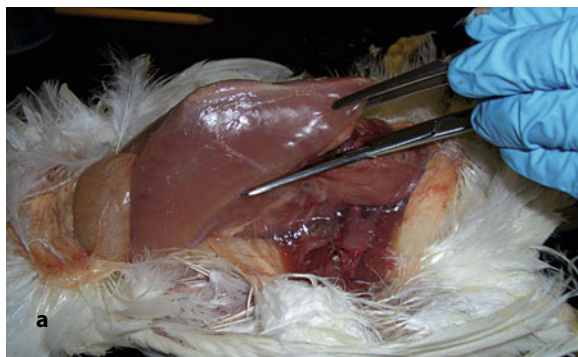


Fig. 5.3 a, b Le sternum est incisé le long du bord ventral du muscle pectoral, jusqu'aux côtes. Une incision similaire est effectuée de l'autre côté de la poitrine (voir planche b).



Fig. 5.4 Vue des organes internes une fois le bréchet récliné.



Fig. 5.5 Vue de la cavité interne après avoir récliné le bréchet et positionné latéralement les organes.

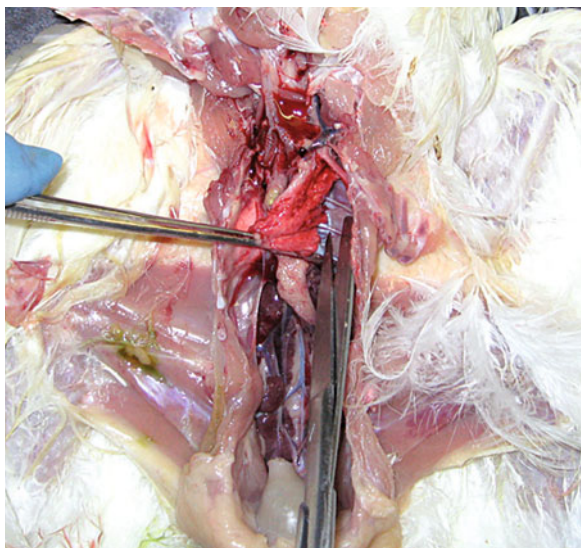


Fig. 5.6 Extraction des poumons à partir des côtes.



Fig. 5.7 Examen de la muqueuse trachéale.



Fig. 5.8 Prélèvement d'un écouvillonnage trachéal.

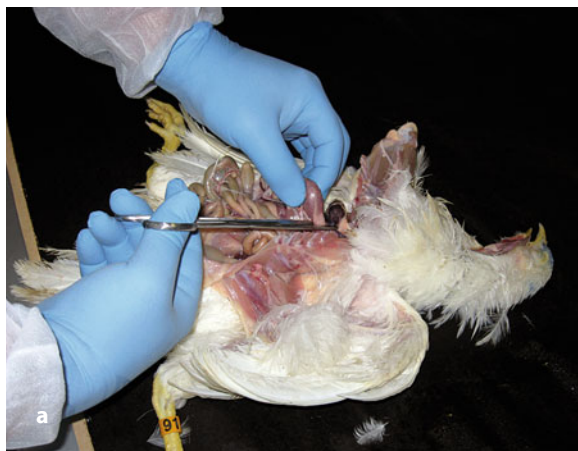


Fig. 5.9 a,b Les viscères sont prélevées par résection au niveau de la zone jonction entre l'œsophage et le proventricule (voir planche **a**) et par résection de la partie terminale du rectum, à proximité du cloaque (voir planche **b**).



Fig. 5.10 Lumière du proventricule et du gésier.



Fig 5.11 Vue des organes internes après avoir enlevé le cœur, l'appareil digestif, le foie et la rate. *P* poumons, *O* ovaire, *K* reins et *C* cloaque.



Fig. 5.12 Examen de la lumière du jabot.



Fig. 5.13 Examen de la lumière duodénale.

que l'oiseau a/n'a pas souffert d'anorexie), ainsi que d'hémorragies sous-muqueuses (Fig. 5.10). Viennent ensuite l'observation des reins (organes allongés et lobés, moulés dans la cavité pelvienne) (Fig. 5.11) et celle de l'ovaire et de l'oviducte ou des deux testicules, situés au-dessus des reins. L'autopsie se termine par l'examen et le prélèvement d'échantillons de la muqueuse de l'œsophage, du jabot (Fig. 5.12) et de l'intestin (Fig. 5.13). Une attention particulière doit être portée aux organes

lymphatiques tels que les plaques de Peyer et les amygdales cæcales, qui peuvent paraître élargies et hémorragiques (Fig. 5.14).

Le prélèvement du cerveau s'effectue en désarticulant la tête au niveau de l'articulation atlanto-occipitale et en soulevant la peau afin d'exposer le crâne. Tout en maintenant la peau d'une main, tirer vers le bec (Fig. 5.15) puis inciser le crâne vers l'avant à partir du foramen occipital, par deux incisions tangentielles vers les orbites, les incisions se rejoignant



Fig. 5.14 Observation de la partie terminale du gros intestin (rectum et cæcum). La flèche indique une amygdale cæcale.



Fig. 5.16 Vue du cerveau après ablation de la voûte crânienne.



Fig. 5.15 Ablation de la voûte crânienne par incision autour du périmètre crânien.

à l'avant. La voûte crânienne peut être ôtée, révélant ainsi les deux hémisphères cérébraux, les lobes optiques et le cervelet (Fig. 5.16). Pour extraire le cerveau, introduire délicatement le bras d'une paire de pinces chirurgicales sous la partie antérieure de la boîte crânienne et soulever doucement.

Une schéma de l'anatomie du poulet est représenté sur la Figure. 5.17.

5.2 Prélèvements à partir d'animaux vivants et de carcasses

En cas de suspicion de foyers d'influenza aviaire ou de maladie de Newcastle, il est indispensable de bien choisir les prélèvements appropriés pour effectuer les enquêtes de laboratoire. Les carcasses en décomposition sont de peu de valeur dans les tentatives d'isolement et de détection de virus. Idéalement, les oiseaux malades ainsi que les oiseaux morts peu de temps auparavant devraient tous être envoyés au laboratoire en vue de prélèvements sanguins, d'une autopsie et d'un examen diagnostique. Les écouvillonnages trachéaux/oropharyngés et cloacaux permettent de prélever un grand nombre d'échantillons sur le terrain, à la fois à partir d'oiseaux vivants et d'oiseaux morts, afin d'effectuer des examens de laboratoire.

Lorsqu'un foyer est suspecté, 20 écouvillonnages cloacaux et 20 écouvillonnages oropharyngés doivent être prélevés dans chaque unité épidémiologique (ou sur tous les oiseaux, si le troupeau en compte moins que 20). Ces prélèvements doivent être réalisés de préférence sur des oiseaux présentant des signes de maladie. Il est important que les écouvillonnages soient recouverts de fèces (quantité optimale : 1 g). Si, pour une raison quelconque, il est impossible de réaliser des écouvillonnages cloacaux sur des oiseaux vivants, des échantillons frais de fèces peuvent servir d'alternative.

Un minimum de cinq oiseaux doit être collecté en vue d'un examen *post-mortem*, notamment les oiseaux présentant des signes cliniques patents.

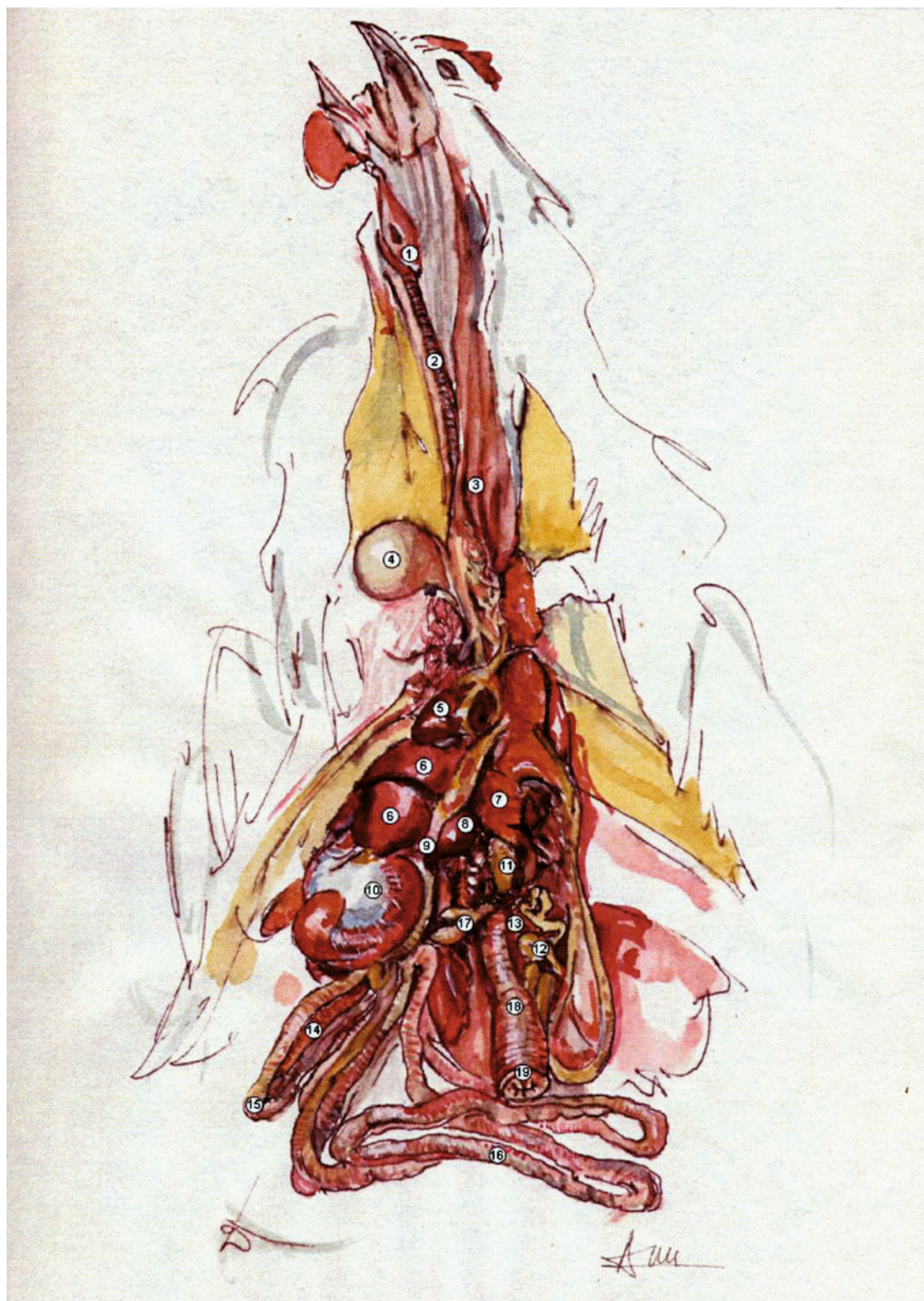


Fig. 5.17 Schéma de l'anatomie du poulet. 1 Larynx ; 2 Trachée ; 3 Œsophage ; 4 Jabot ; 5 Cœur ; 6 Foie ; 7 Poumons ; 8 Rate ; 9 Proventricule ; 10 Gésier ; 11 Ovaire ; 12 Oviducte ; 13 Rein ; 14 Pancréas ; 15 Duodénum ; 16 Intestin grêle ; 17 Cæcum ; 18 Gros intestin ; 19 Cloaque (avec l'aimable autorisation d'Amelio Meini).

Vingt échantillons de sang doivent être prélevés dans chaque unité épidémiologique (des prélèvements doivent être réalisés sur tous les oiseaux si le troupeau en compte moins de 20). Les oiseaux malades ou apparemment guéris doivent aussi faire l'objet de prélèvements sanguins.

Ce programme d'échantillonnage a été développé afin de garantir une probabilité de 99 % de détection d'au moins une séropositivité dans un troupeau dans lequel au moins 25 % de la population est testée positive, indépendamment de la taille du troupeau.

5.2.1 Sang

L'utilisation d'anticoagulants n'est pas nécessaire à l'obtention de sérum destiné aux analyses d'influenza aviaire ou de maladie de Newcastle. Le sang doit pouvoir coaguler. Dans le cas de l'influenza aviaire, l'IA hautement pathogène étant une maladie aiguë et mortelle pour la plupart des espèces, la détection d'anticorps n'est utile que si l'on suspecte une IA de faible pathogénicité.

Matériels

- Tubes à essais
- Seringues de 2,5 mL
- Aiguilles de 25 gauges pour petits oiseaux (caille, perdrix, perroquets)
- Aiguilles de 23 gauges pour des oiseaux plus gros (poulet, dinde)
- Coton
- Alcool à 70 %

Prélever le sang sur la veine brachiale (la veine la plus large située sous l'aile) (Fig. 5.18, 5.19) de la façon suivante :

1. Placer l'oiseau sur la table, en position allongée sur le côté.
2. Soulever l'aile à l'aide d'une main et séparer les plumes le long de l'aile. De l'eau ou de l'alcool dénaturé peuvent être utilisés pour aider à maintenir les plumes séparées.
3. Placer l'aiguille légèrement inclinée, le biseau dirigé vers le haut, contre la veine située sous l'aile (le biseau est le côté taillé de l'aiguille portant l'orifice). Engager l'aiguille dans la veine et aspirer lentement le sang.
4. Retirer l'aiguille et exercer une pression sur la veine pendant quelques secondes, afin de minimiser



Fig. 5.18 Poulet : veine brachiale (veine de l'aile). Les plumes ont été enlevées de la surface ventrale.



Fig. 5.19 Poulet indemne de pathogène : obtention d'un échantillon de sang à partir de la veine brachiale.

la formation de gros hématomes qui surviennent couramment chez les volailles.

5. 1-2 mL de sang doivent être prélevés. Vider la seringue dans un tube de prélèvement approprié, tube sous vide ou ordinaire. Si l'on utilise des tubes de prélèvement ordinaires, l'aiguille doit être enlevée de la seringue et le sang fraîchement prélevé doit être recueilli lentement dans le tube, à partir de l'extrémité de la seringue. S'il s'agit de tubes à prélèvement sous vides, insérer l'aiguille de la seringue contenant le sang dans le bouchon en caoutchouc et laisser le sang être aspiré par le vide. Éviter de forcer le passage du sang à travers l'aiguille car cela pourrait entraîner une hémolyse. Les tubes de prélèvement doivent être maintenus en position horizontale et à température ambiante pendant 30 à 60 minutes, afin de permettre au sang de coaguler. Le sérum doit être séparé du caillot de sang et conservé à +4 °C ou à -20 °C, avant d'être analysé.

Si l'on ne dispose pas de seringues, la procédure suivante peut être utilisée :

1. Arracher quelques plumes du coude de l'aile afin d'exposer la veine médiane.
2. À l'aide d'une lame de scalpel stérile, inciser la veine afin d'obtenir un échantillon de sang.
3. Placer l'échantillon de sang dans un tube (2 mL suffisent).
4. Pour obtenir le sérum, placer le tube de sang sur une surface inclinée pendant 10 à 15 minutes afin de permettre la coagulation. Les échantillons de sérum peuvent alors être centrifugés.
5. Laisser reposer l'échantillon sanguin pendant 4 à 12 heures, à température ambiante.

Les tubes contenant les échantillons sanguins doivent être réfrigérés et envoyés dès que possible à un laboratoire de diagnostic.

5.2.2 Écouvillonnages trachéaux et oropharyngés

Matériels

- Les écouvillons synthétiques (rayon ou dacron) sont préférés aux écouvillons en coton, qui peuvent contenir des substances toxiques ou inhibant les virus
- Tubes stériles de 5 à 15 mL
- Portoirs pour tubes à essais
- Milieu de transport viral (MTV)
- Solution PBS antibiotique

Les milieux à base de protéines tels que l'infusion cœur-cerveille (ICC), le bouillon tryptose tamponné au Tris ou d'autres milieux de transport viral commercialisés, confèrent une stabilité accrue au virus, en particulier pendant le transport. Les antibiotiques utilisés et leur concentration peuvent être modifiés en fonction des conditions locales et des disponibilités. Des quantités très importantes d'antibiotiques peuvent être nécessaires pour les échantillons fécaux. Les quantités adéquates sont les suivantes : 10 000 UI/mL de pénicilline, 10 mg/mL de streptomycine, 0,25 mg/mL de gentamycine et 5 000 UI/mL de nystatine. Ces quantités peuvent être jusqu'à cinq fois moins élevées pour les tissus et les écouvillons trachéaux. L'infusion cœur-cerveille doit être préparée dans de l'eau et contenir 15 % p/v de poudre ICC, avant stérilisation (à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes). Après stérilisation, les antibiotiques doivent être ajoutés comme suit : 10 000 UI/mL de pénicilline G, 20 µg d'amphotéricine B et 1 000 µg/mL de

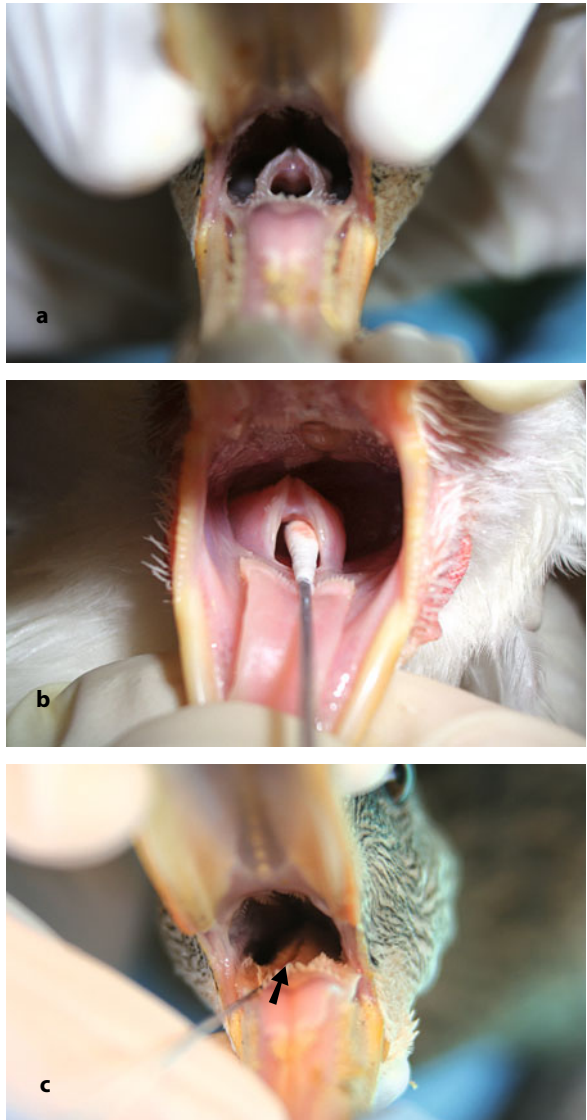


Fig. 5.20 a-c **a** Canard colvert (*Anas platyrhynchos*) : larynx. **b** Poulet exempt de pathogène spécifique (EOPS) : insertion d'un écouvillon dans le larynx. **c** Canard colvert (*Anas platyrhynchos*) : écouvillon dans la trachée. L'ouverture laryngée est refermée (flèche noire).

gentamycine. Les milieux peuvent être conservés à 4 °C pendant deux mois au maximum.

Des écouvillonnages peuvent être réalisés sur des oiseaux malades ou morts. Utiliser des écouvillons secs pour le prélèvement d'échantillons à partir d'oiseaux morts. Les écouvillons trempés dans du milieu de transport viral doivent être utilisés pour les échantillons obtenus à partir d'oiseaux vivants. Insérer l'écouvillon et frotter la muqueuse (Fig. 5.20 a-c). Utiliser un écouvillon par oiseau.



Fig. 5.21 Écouvillon cloacal (à gauche) et trachéal (à droite) dans des tubes contenant du milieu de transport viral.



Fig. 5.22 a, b **a** Canard colvert (*Anas platyrhynchos*) : orifice cloacal. **b** Canard colvert (*Anas platyrhynchos*) : insertion d'un écouvillon dans l'orifice cloacal.

Placer les écouvillons dans des tubes contenant assez de MTV pour les humecter et immerger les écouvillons dans un maximum de 2 mL de MTV.

Les écouvillonnages réalisés à partir d'oiseaux différents peuvent être groupés. Placer un maximum de cinq écouvillons dans un tube et les immerger dans 4 à 5 mL de MTV.

Noter l'information nécessaire sur le tube et pas sur le couvercle (nom de l'élevage, nombre d'échantillons, date).

5.2.3 Écouvillonnages cloacaux

Réaliser d'abord des écouvillonnages sur tous les oiseaux morts ou malades, puis sur les autres oiseaux. Utiliser des écouvillons secs pour le prélèvement d'échantillons sur des oiseaux morts ; pour le prélèvement d'échantillons à partir d'oiseaux vivants, utiliser des écouvillons trempés dans du milieu de transport viral.

Insérer l'extrémité entière de l'écouvillon dans le cloaque (Fig. 5.22 a, b). En exerçant une pression légère, faire pivoter l'écouvillon deux ou trois fois à l'intérieur du cloaque. Secouer l'écouvillon pour faire tomber les gros fragments de fèces. Insérer ensuite l'écouvillon dans un tube. Immerger les écouvillons dans du MTV (2 mL au maximum).

Les écouvillons doivent être placés sur de la glace ou des blocs réfrigérants et envoyés au laboratoire le plus rapidement possible. Si l'on ne peut garantir une expédition rapide vers le laboratoire dans les 48 h, les échantillons doivent être congelés immédiatement et conservés, puis transportés sur de la glace carbonique. Les écouvillonnages réalisés sur des oiseaux différents peuvent être groupés. Placer un maximum de cinq écouvillons dans un tube et les immerger dans 4 à 5 mL de MTV.

Les écouvillons destinés aux analyses de PCR peuvent être expédiés à l'état sec, à condition qu'ils soient envoyés rapidement au laboratoire et transportés dans des conditions adéquates.

5.2.4 Oiseaux destinés à l'examen post-mortem

Pour chaque unité épidémiologique, des carcasses d'au moins cinq oiseaux, morts peu de temps auparavant ou qui étaient gravement malades ou moribonds et ont été tués humainement, doivent être collectés. Placer les carcasses dans des sacs en plastiques résistants et doublés et les transporter dans des conteneurs résistants au lavage.

Pour les tentatives d'isolement viral, les organes suivants peuvent être collectés dans des conteneurs stériles en plastique rigide :

- système respiratoire (trachée, poumons) ;
- intestins (duodénum et pancréas, amygdales caecales) ;

- foie (IAHP) ;
- reins (IAHP) ;
- rate (IAHP-MN) ;
- cerveau (IAHP-MN).

Tous les échantillons destinés aux tentatives d'isolement viral doivent être maintenus à une température d'environ 4 °C. Si les échantillons doivent être expédiés vers un laboratoire spécialisé, il est indispensable que les spécimens soient envoyés immédiatement, sur de la glace et par les services d'un transporteur approprié. Si l'on s'attend à des délais de plus de deux jours, les échantillons doivent être congelés, théoriquement à -80 °C, avant d'être expédiés.

Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des infections à virus influenza aviaire ; directives pour la visite des exploitations et diagnostic différentiel

6

Ilaria Capua et Calogero Terregino

6.1 Introduction

Les virus influenza de type A ont été regroupés en deux pathotypes distincts, en fonction de la sévérité de la maladie qu'ils provoquent chez les poulets sensibles. Les virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) sont responsables de maladies graves chez les poulets et autres gallinacés. Les virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) provoquent une maladie clinique beaucoup plus bénigne. L'IAHP n'a été associée qu'à certaines souches de virus influenza H5 et H7 (et éventuellement H10). L'infection provoque une maladie mortelle chez la plupart des oiseaux, et surtout chez les galliformes (poulets et dindes). Elle est caractérisée par une mortalité très élevée des troupeaux.

Certains oiseaux tels que les autruches et les oiseaux aquatiques sauvages et domestiques peuvent présenter une résistance clinique à la maladie tout en étant porteurs du virus et en tolérant la multiplication virale.

L'IAFP est provoquée par les 16 sous-types viraux d'hémagglutinine (H1-H16). Les souches faiblement pathogènes sont habituellement responsables de maladies bénignes ou inapparentes. La multiplication virale est limitée aux tractus respiratoire, digestif et urogénital.

Le tableau clinique de l'infection se résume donc à des signes cliniques respiratoires, des troubles gastro-intestinaux et une baisse de la production d'œufs. La gravité des signes cliniques dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge, l'espèce et l'état de santé de l'oiseau, les infections secondaires, les méthodes d'élevage et la souche virale provoquant l'infection. Dans la nature, les virus IAFP sont maintenus chez les populations d'oiseaux sauvages, notamment les oiseaux aquatiques et les oiseaux de rivage.

6.2 Influenza aviaire faiblement pathogène chez les volailles

6.2.1 Dindes (*Meleagris gallopavo*)

6.2.1.1 Signes cliniques

Les dindes sont extrêmement sensibles à l'IA. Les signes cliniques révèlent des lésions importantes sur les organes respiratoire, digestif, urinaire et reproducteur. Au fil des années, aussi bien dans l'hémisphère occidental qu'oriental, les dindes ont été affectées par divers sous-types, principalement les sous-types H1, H5, H7, H6 et H9.

Chez les dindes de chair, la gravité des constatations cliniques et *post-mortem* peut varier de manière significative, avec une mortalité pouvant atteindre plus de 90 %. Cette variabilité peut être liée à l'âge des oiseaux atteints et aux facteurs environnementaux tels que les conditions d'hygiène de l'exploitation, la qualité de l'air et de la ventilation, la température ambiante et la présence d'autres agents infectieux. L'état clinique et la mortalité semblent être aggravés lorsque le troupeau est simultanément infecté par *Mycoplasma* spp. ou lorsque des bactéries telles que *Riemerella anatipestifer*, *Pasteurella multocida* ou *Escherichia coli* sont responsables d'infections secondaires. De la même façon, le taux de mortalité peut être augmenté par la présence d'infections secondaires ou contemporaines provoquées par des pathogènes tels que le virus de l'entérite hémorragique (HEV), le paramyxovirus aviaire de type 2 (APMV2), les virus vaccinaux de la maladie de Newcastle (MN), les adénovirus, les pneumovirus aviaires et les réovirus.

La gravité des signes cliniques ainsi que la capacité de récupération sont toutes deux liées à l'âge. En général, les signes cliniques sévères régressent



Fig. 6.1 Dindes âgées de 28 jours, infectées naturellement par le virus influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) H7N1 et se trouvant en phase aiguë de la maladie. Les oiseaux atteints sont abattus et présentent un plumage ébouriffé et une conjonctivite.



Fig. 6.2 Dindonneau âgé de 28 jours, infecté naturellement par IAFP H7N1 et présentant une conjonctivite sévère et un gonflement des sinus sous-orbitaires.



Fig. 6.3 Dinde infectée expérimentalement par IAFP H7N3 et présentant une conjonctivite et un gonflement des sinus sous-orbitaires.



Fig. 6.4 Dindonneaux âgés de 28 jours, infectés naturellement par IAFP H7N1 et présentant une attitude prostrée. L'emphysème sous-cutané se manifeste par une peau ballonnée au niveau de la tête.

chez les oiseaux de plus de 40 jours et la plupart des oiseaux atteints guérissent en l'espace d'une semaine, à compter du début de la maladie. Chez les oiseaux de moins de 40 jours, l'état clinique évolue souvent en un syndrome respiratoire plus grave et peut être associé à une mortalité supérieure à 20 %. Dans certains cas, les oiseaux survivants peuvent demeurer émaciés et n'atteignent pas un poids optimal.

L'apparition des signes cliniques est généralement associée à une dépression, un plumage ébouriffé (Fig. 6.1), une apathie et une absence de glougloutonnements à l'intérieur de la batterie d'élevage. Les oiseaux sont immobiles et les plus jeunes se regroupent sous les lampes de chauffage.

La consommation de nourriture décroît rapidement et des signes cliniques respiratoires apparaissent

peu après. Ces signes cliniques commencent par une détresse respiratoire caractérisée tout d'abord par des râles et des crépitements et qui se transforme ensuite en dyspnée sévère accompagnée de gonflement des sinus sous-orbitaires (Fig. 6.2) et de conjonctivite (Fig. 6.3). Dans certains cas, l'atteinte respiratoire peut s'aggraver au point d'entraîner une rupture des sacs aériens et un emphysème cutané (Fig. 6.4).

Chez les jeunes oiseaux, une diarrhée verdâtre ou jaunâtre peut apparaître avec présence d'aliments non digérés dans les matières fécales. Cet état est généralement associé à une mortalité plus élevée, une récupération plus difficile et une prise de poids médiocre.

Les dindes reproductrices sexuellement matures présentent souvent des formes plus bénignes du syndrome

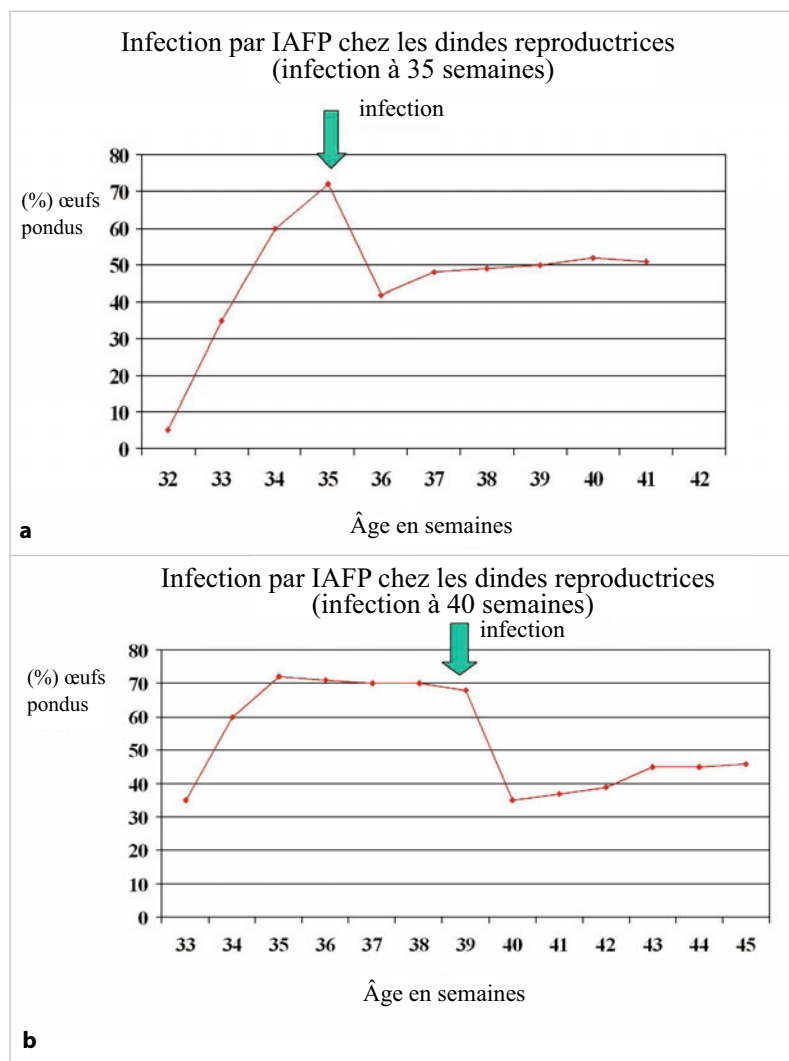


Fig. 6.5 a, b Courbe de ponte d'une dinde reproductrice à 36 et 40 semaines, après infection par IAFP.

respiratoire. D'un point de vue clinique, celles-ci sont caractérisées par des râles, de la toux, un œdème facial et un gonflement des sinus sous-orbitaires. L'affection respiratoire est habituellement accompagnée d'abattement, d'apathie et d'un état fébrile associé à une perte d'appétit. Dans la plupart des cas, la multiplication virale compromet gravement le système reproducteur. En phase aiguë, les pertes en production d'œufs peuvent être importantes. La qualité des œufs peut aussi en être affectée. Les œufs sont malformés, fragiles et blanchâtres lorsqu'ils sont pondus au cours de la phase de chute de ponte (Fig. 6.5 a, b).

6.2.1.2 Lésions macroscopiques

La lésion *post-mortem* usuelle, observée à la fois chez les dindes adultes et chez les jeunes dindes,

consiste en un caillot caséux survenant dans les sinus (Fig. 6.6) et la trachée et pouvant causer la mort par suffocation. La trachée et les poumons sont œdémateux, congestionnés et parfois hémorragiques (Fig. 6.7). Chez les oiseaux adultes, des infections bactériennes secondaires peuvent entraîner une aéro-sacculite fibrineuse touchant les sacs aériens thoraciques et abdominaux, ainsi que le péricarde (Fig. 6.8). La rate est souvent congestionnée et augmentée de volume (Fig. 6.9).

Le pancréas est généralement atteint, à la fois chez les adultes et chez les jeunes oiseaux. Mais les changements sont souvent plus graves chez les jeunes oiseaux, chez qui le pancréas peut être hypertrophié et durci, avec une surface comportant des zones hémorragiques et nécrotiques (Fig. 6.10). Chez les oiseaux adultes, le pancréas apparaît congestionné



Fig. 6.6 Dindonneau âgé de 28 jours, infecté naturellement par IAFP H7N1 et présentant des caillots fibrineux au niveau des sinus sous-orbitaires.



Fig. 6.7 Dinde infectée expérimentalement par IAFP H7N1 et présentant une pneumonie œdémateuse.

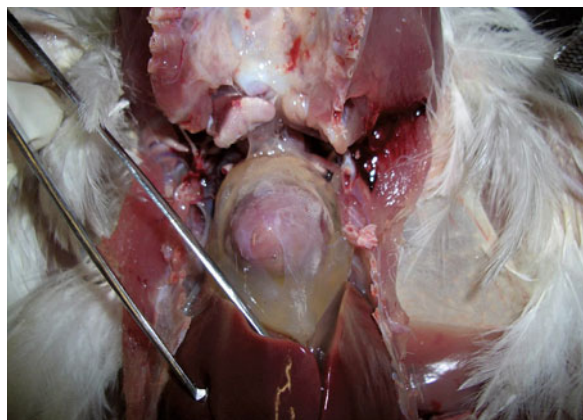


Fig. 6.8 Dinde infectée expérimentalement par IAFP H7N1 et présentant une péricardite sévère accompagnée d'exsudats séreux abondants.

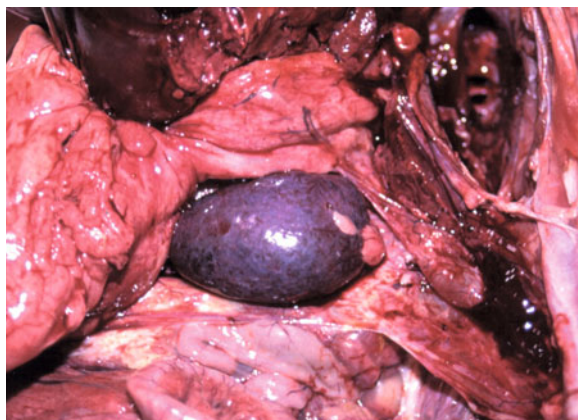


Fig. 6.9 Dinde de chair adulte infectée naturellement par IAFP H7N1 et présentant une splénomégalie.



Fig. 6.10 Dindonneaux âgés de 28 jours, infectés naturellement par IAFP H7N1 et présentant une pancréatite et une distension duodénale.



Fig. 6.11 Dinde infectée expérimentalement par IAFP H7N3 et présentant une pancréatite et une distension duodénale.

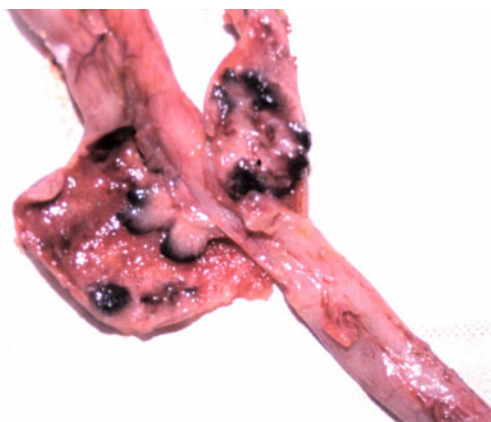


Fig. 6.12 Dinde de chair adulte infectée naturellement par IAFP H7N1 et dont les amygdales cæcales présentent des hémorragies.

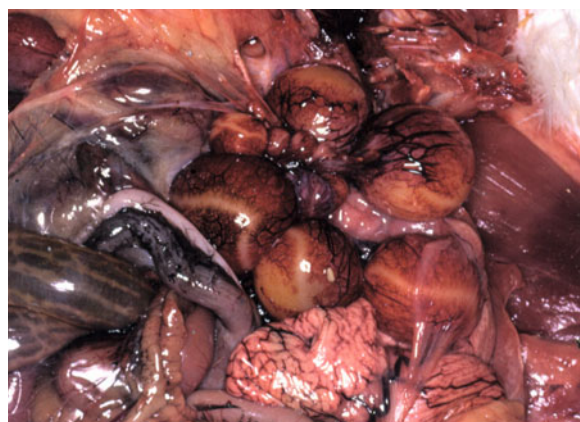


Fig. 6.13 Dinde reproductrice infectée naturellement par IAFP H7N1 et présentant une congestion de l'ovaire et une péritonite du vitellus.

et recouvert d'hémorragies punctiformes ; les lésions précitées sont parfois accompagnées d'une congestion de l'anse duodénale (Fig. 6.11). Chez les oiseaux convalescents, le pancréas est atrophie et de taille réduite. Des pétéchies peuvent être observées sur l'épicaire et les amygdales cæcales (Fig. 6.12).

L'examen *post-mortem* des dindes reproductrices montre des lésions principalement sur les appareils respiratoire et reproducteur. Une congestion des poumons et de la trachée, une sinusite et une conjonctivite associée à une péritonite avec ponts abdominaux sont couramment constatées lors de cet examen. La péritonite découle d'une congestion de l'ovaire et d'hémorragies des follicules ovariens ainsi que d'une congestion et d'un œdème de l'oviducte contenant généralement un exsudat catarrhal et caséux. Du vitellus libre peut aussi être présent dans la cavité abdominale (Fig. 6.13).

à une conjonctivite. Cependant, il a été constaté que certains virus IAFP causent de graves problèmes sanitaires chez les poulets de chair. Il s'agit particulièrement des virus H9N2, isolés à partir d'infections associées à une mortalité significative (atteignant parfois les 50 %) au Moyen-Orient. Dans certains de

6.2.2 Poulets (*Gallus gallus*)

6.2.2.1 Signes cliniques

Du point de vue clinique, les poulets sont moins sensibles que les dindes. Chez les poulets de chair, les infections par IAFP sont souvent non apparentes et peuvent être confondues avec d'autres maladies. Les signes d'infection cliniquement visibles sont une anorexie et une détresse respiratoire modérée, avec une mortalité du troupeau de l'ordre de 2 à 3 %. Parmi les signes cliniques, on peut observer des râles, des étternuements et une toux légère, rarement associés



Fig. 6.14 a, b Poulet de chair reproducteur infecté naturellement par IAFP H9N2 et présentant un œdème périorbitaire sévère. (Avec l'aimable autorisation de Nadim Mukhles Amarin.)

Infection par IAFP H9N2 chez des poulets reproducteurs (filière chair) (infection à 28 semaines)

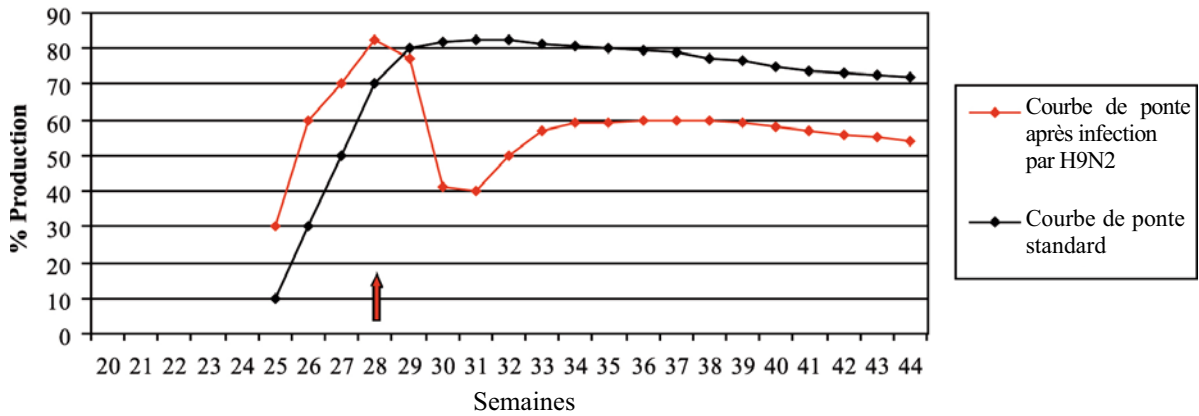


Fig. 6.15 Courbe de ponte de poulets reproducteurs (filière chair) après infection naturelle par le virus IAFP H9N2 (*ligne rouge*). (Avec l'aimable autorisation de Nadim Mukhles Amarin.)

ces cas, des preuves d'une infection bactérienne ou virale sous-jacente ont été établies sur le terrain et en laboratoire. Les signes cliniques constatés dans les foyers de H9N2 comprennent un gonflement des tissus périorbitaires et sinusaux, des écoulements respiratoires et une détresse respiratoire importante (Fig. 6.14 a, b).

Les poulets reproducteurs (filière chair) sexuellement matures peuvent présenter un état fébrile accompagné de dépression, de somnolence et de perte d'appétit, parfois suivi d'une baisse de la production d'œufs (Fig. 6.15). À ce stade, une cyanose de la crête et des caroncules, accompagnée de signes cliniques respiratoires modérés, peut être observée chez un nombre limité d'oiseaux. En phase aiguë de la maladie, il peut y avoir ponte d'œufs malformés et/ou décolorés.

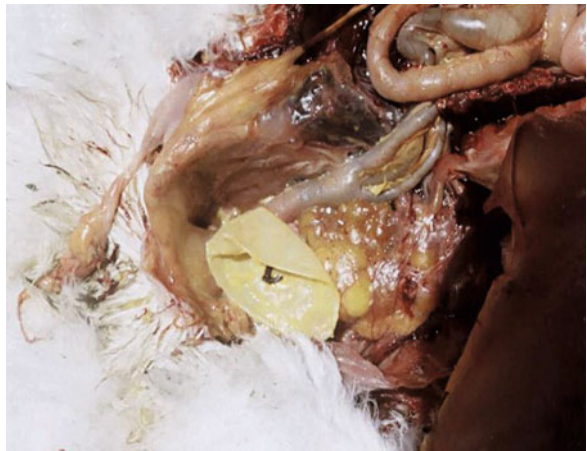


Fig. 6.16 Poulet reproducteur (filière chair) infecté naturellement par IAFP H9N2 et présentant une péritonite du vitellus. (Avec l'aimable autorisation de Nadim Mukhles Amarin.)

6.2.2.2 Lésions macroscopiques

Les poulets de chair et les jeunes reproducteurs ne présentent généralement pas de lésions *post-mortem* importantes. Il peut y avoir une congestion pulmonaire et trachéale légère et restreinte ainsi qu'une trachéite catarrhale.

Lors des épizooties de H9N2, les lésions macroscopiques observées comprenaient une hyperémie importante de l'appareil respiratoire, suivie d'exsudation et de formation de bouchons muqueux depuis la ramification des bronches jusqu'aux bronches secondaires.

Chez les poulets de chair reproducteurs, les constatations pathologiques sont principalement limitées

à l'ovaire et à l'oviducte. Les follicules ovariens apparaissent souvent hémorragiques, œdémateux et se rompent. L'oviducte peut avoir un aspect œdémateux, avec péritonite catarrhale ou fibrineuse et ponte abdominale (Fig. 6.16). La seule autre lésion constante est une congestion des poumons et de la trachée, qui est parfois associée à un œdème pulmonaire. Des hémorragies punctiformes sont parfois observées sur l'épicarde, le foie et la séreuse intestinale.

Chez les pondeuses, les lésions macroscopiques touchent les organes reproducteurs : l'ovaire et

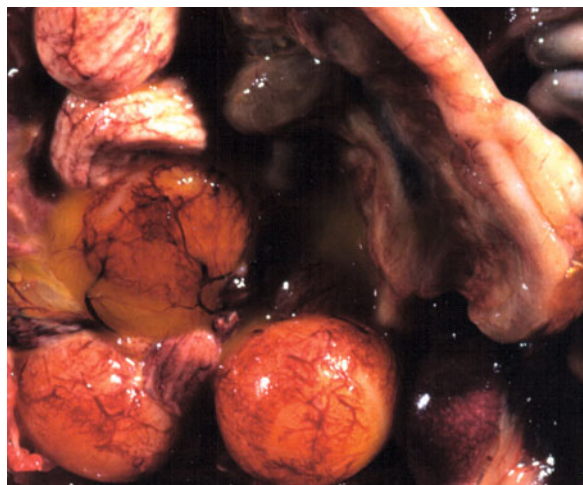


Fig. 6.17 Pondeuses commerciales infectées naturellement par IAFP H7N1 et présentant une congestion ovarienne et une péritonite avec pontes abdominales.

l'oviducte apparaissent œdémateux et hémorragiques et l'oviducte peut contenir un exsudat catarrhal et des caillots caséux souvent associés à une péritonite avec pontes abdominales (Fig. 6.17). Les poumons et la trachée sont parfois congestionnés. Une pancréatite modérée est parfois observée.

6.2.3 Autruches (*Struthio camelus*)

Les premiers foyers d'IAFP constatés chez les ratites avaient été causés par le virus appartenant au sous-type H7N1. Cette épizootie sud-africaine atteignit les autruches en 1991 et une mortalité élevée fut observée chez les jeunes oiseaux.

6.2.3.1 Signes cliniques

Chez les autruches, les signes cliniques de l'IAFP sont plus apparents chez les jeunes oiseaux (âgés de moins de 8 mois). Ces signes incluent une prostration, une réticence à s'alimenter et à boire et des signes cliniques entériques caractérisés par des selles de couleur blanc verdâtre. Les autres signes cliniques incluent des écoulements oculaires et une détresse respiratoire.

Divers facteurs liés à la gestion et à l'environnement contribuent à aggraver la maladie. Il s'agit notamment d'une mauvaise hygiène, d'une modification de la composition de la nourriture, du froid et de la présence de pathogènes. Deux à trois jours

après le début des signes cliniques, les oiseaux atteints meurent ou peuvent guérir progressivement. Dans certains cas, la mortalité peut atteindre 30 %.

Lorsqu'elles sont cliniquement atteintes, les autruches de plus de 14 mois développent une forme très bénigne de la maladie, qui s'accompagne d'une légère baisse d'activité, d'une diminution de la consommation de nourriture et d'une coloration verte des urines. Les adultes peuvent ne présenter aucun signe clinique.

6.2.3.2 Lésions macroscopiques

Les lésions *post-mortem* sont de nature et d'intensité différentes, probablement à cause d'infections simultanées et de facteurs de complication externes. Les lésions les plus remarquables sont observées sur le foie. Ce dernier peut avoir un aspect marbré (dû à la présence de foyers nécrotiques multiples) et apparaît hypertrophié, congestionné et friable. Des lésions entériques telles qu'une congestion de la partie antérieure de l'intestin grêle et une entérite catarrhale peuvent être présentes chez les jeunes autruches, de même qu'une aéro-sacculite fibrineuse et une sinusite mucoïde. Des foyers nécrotiques et hémorragiques peuvent être observés sur le pancréas. Les lésions provoquées par des infections bactériennes secondaires sont très courantes (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*).

6.2.4 Pintade commune (*Numida meleagris*)

6.2.4.1 Signes cliniques

L'IAFP a été rarement constatée chez les pintades communes. Chez les pintades reproductrices, elle est similaire à l'affection clinique décrite précédemment chez les dindes reproductrices. La dépression et la détresse respiratoire, caractérisées par des râles et des éternuements, sont précédées d'une baisse de la production d'œufs. La conjonctivite semble être un signe clinique constant et sévère, souvent compliqué par des infections bactériennes secondaires.

Chez les pintades de chair, l'infection par IAFP provoque les mêmes signes cliniques respiratoires que ceux observés chez les dindes de chair, la caractéristique dominante étant un œdème facial.

6.2.4.2 Lésions macroscopiques

Chez les pintades reproductrices, l'examen *post-mortem* révèle une congestion des organes internes et une péritonite du vitellus. Une pancréatite, une duodénite et une aéro-sacculite ont été décrites à la fois chez les pintades reproductrices et chez les pintades de chair.

6.2.5 Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*)

Chez cette espèce, l'IAFP provoque des signes cliniques respiratoires modérés comprenant une conjonctivite, des éternuements et un écoulement nasal clair. Ces signes cliniques peuvent être accompagnés d'une perte totale d'appétit.

En général, à l'examen *post-mortem* on ne retrouve qu'une congestion du tractus respiratoire et du pancréas.

6.2.6 Canards et oies

Les canards et les oies sont considérés comme étant des réservoirs naturels de virus IAFP et ils ne

présentent pas, en apparence, de lésions cliniques ou pathologiques en cas d'infection.

6.3 Influenza aviaire hautement pathogène chez les volailles

6.3.1 Dindes (*Meleagris gallopavo*)

6.3.1.1 Signes cliniques

Les signes cliniques sont le reflet de la multiplication virale et de l'atteinte de nombreux viscères ainsi que des systèmes nerveux et cardiovasculaire. Dans la plupart des cas, la maladie est fulminante et certains oiseaux sont retrouvés morts avant qu'aucun signe clinique n'ait pu être noté.

Chez les dindes de chair et les dindes reproductrices, une mortalité de 100 % peut être observée 48 à 72 heures après l'apparition des premiers signes cliniques (Fig. 6.18 a). La consommation de nourriture diminue généralement de manière soudaine et drastique, accompagnée d'abattement et de



Fig. 6.18 a–c Dindes reproductrices infectées naturellement par IAFP H7N1 provoquant une mortalité très importante, 72 heures après la survenue des premiers signes cliniques (a). La paralysie des ailes et la prostration (b) sont manifestes. Les oiseaux sont souvent retrouvés morts, gisant sur le dos, en raison des signes cliniques neurologiques et des contractions spasmodiques qui précèdent la mort (c).



Fig. 6.19 Dinde de chair infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une pancréatite hémorragique et une distension duodénale.



Fig. 6.20 Dinde reproductrice infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une distension gazeuse du cæcum et des hémorragies des séreuses.



Fig. 6.21 Dinde de chair adulte infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une congestion et une nécrose de la rate.



Fig. 6.22 Poulets reproducteurs (filère chair) infectés naturellement par IAHP appartenant au sous-type H5N1. L'infection entraîne l'apparition soudaine d'une mortalité élevée, les oiseaux étant retrouvés morts dans les nids. (Avec l'aimable autorisation d'Ahmed Abd El Karim.)

somnolence (Fig. 6.18 b) et suivie de signes cliniques neurologiques, principalement des tremblements et une incoordination. Les oiseaux présentent un balancement de la tête, une paralysie des ailes, une démarche anormale et sont souvent incapables de se maintenir en position debout. Ils peuvent perdre l'équilibre et se retrouver en position couchée agitant les pattes dans un mouvement de pédalage. On observe également une contraction spasmodique des ailes, accompagnée de battements d'ailes et d'opisthotonos. Les signes cliniques neurologiques surviennent de façon brutale et sévère et les oiseaux atteints peuvent être retrouvés morts, gisant sur le dos (Fig. 6.18 c).

6.3.1.2 Lésions macroscopiques

Lors de l'examen *post-mortem*, on observe souvent une congestion des organes internes. Cependant, la maladie étant suraiguë, certains oiseaux ne présentent aucune lésion *post-mortem*.

Une pancréatite (Fig. 6.19) est généralement observée, ainsi que des hémorragies des muqueuses et des séreuses et des foyers nécrotiques dans le parenchyme des viscères. Ces hémorragies sont surtout présentes sur les muqueuses du proventricule, du ventricule et des amygdales caecales (Fig. 6.20). La rate est parfois hypertrophiée et congestionnée (Fig. 6.21) et l'épicaire présente des hémorragies punctiformes. Dans de rares cas, il y a également congestion des reins et présence de calculs d'urate.



Fig. 6.23 Poulets de chair reproducteurs après infection naturelle par l'IAHP H5N1. Une mortalité importante survient quelques jours après l'apparition des signes cliniques. (Avec l'aimable autorisation d'Ahmed Abd El Karim.)



Fig. 6.24 Poulets de chair reproducteurs après infection naturelle par IAHP H5N1 et présentant des signes cliniques neurologiques. (Avec l'aimable autorisation d'Ahmed Abd El Karim.)



Fig. 6.25 Pondeuses en cage infectées naturellement par IAHP H7N1 et présentant une prostration et une apathie, en phase préagronique.



Fig. 6.26 Poulets de chair reproducteurs infectés naturellement par IAHP H7N1 et présentant une congestion et une cyanose de la crête et des caroncules.



Fig. 6.27 Poulets de chair reproducteurs infectés naturellement par IAHP H5N1 et présentant une congestion sévère et un œdème de la crête et des caroncules. (Avec l'aimable autorisation de Walid Hamdy.)



Fig. 6.28 Poulets de basse-cour infectés naturellement par IAHP H5N1 et présentant une nécrose de la crête et des caroncules et une congestion de la zone de peau dépourvue de plumes, au niveau de la tête. (Avec l'aimable autorisation de Vladimir Savic.)



Fig. 6.29 Poulets de chair reproducteurs infectés naturellement par IAHP H7N1 et présentant des hémorragies au niveau des pattes.



Fig. 6.30 Poulet exempt d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et présentant un œdème périorbitaire.



Fig. 6.31 Poulet de chair reproducteur infecté naturellement par IAHP H7N1 et présentant une congestion de la crête et des tissus sous-cutanés de la face, en phase de récupération.



Fig. 6.32 Pondeuses en cage infectées naturellement par IAHP H7N1. Remarquer l'aspect du poulailler après l'apparition des signes cliniques.

6.3.2 Poulets (*Gallus gallus*)

6.3.2.1 Signes cliniques

Les poulets sont également très sensibles à l'infection et à la maladie clinique. Les modes de gestion peuvent d'ailleurs influencer les dynamiques de transmission au sein du lot et, jusqu'à un certain degré, les manifestations cliniques.

Chez les poulets élevés sur litière, la maladie se transmet très rapidement et la mortalité du troupeau peut atteindre 100 % en trois à quatre jours, à compter de l'apparition des premiers signes cliniques

(Fig. 6.22, 6.23). L'anorexie, l'abattement et l'arrêt de la ponte chez les reproductrices sont suivis de signes cliniques neurologiques caractérisés par une prostration, une apathie totale, des tremblements de la tête, une paralysie des ailes et une incoordination des mouvements des pattes lorsque les oiseaux sont incités à se déplacer (Fig. 6.24, 6.25). Les lésions typiques incluent une cyanose de la crête et des caroncules (Fig. 6.26-6.28) et des pétéchies au niveau des pattes (Fig. 6.29). Toutefois, dans certains foyers, de tels signes cliniques n'ont affecté qu'un nombre limité d'oiseaux. La mort subite en position allongée est précédée de mouvements de pédalage et de suffocation.



Fig. 6.33 Pondeuses en cage infectées naturellement par IAHP H7N1 et présentant une dépression sévère en phase aiguë. Remarquer les crêtes pâles et flasques.

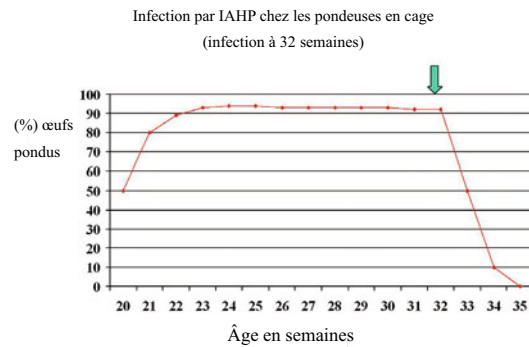


Fig. 6.34 Courbe de ponte chez des pondeuses âgées de 32 semaines et infectées naturellement par IAHP H7N1.



Fig. 6.35 Poulets infectés naturellement par IAHP H5N1 et présentant un œdème sous-cutané sérofibrineux abondant des tissus situés autour du cou. (Avec l'aimable autorisation de Thierry Van den Berg.)



Fig. 6.36 Poulet infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une congestion des tissus sous-cutanés de la tête. (Avec l'aimable autorisation de Thierry Van den Berg.)

Les oiseaux survivant plus longtemps peuvent présenter des troubles neurologiques tels que des tremblements de la tête et du cou, une incapacité à se tenir debout, un torticolis, de l'opisthotonos et une démarche anormale. On observe chez ces oiseaux une congestion importante de la crête, une conjonctivite, un œdème périorbitaire (Fig. 6.30, 6.31), un plumage ébouriffé et de la prostration. La guérison survient rarement.

Chez les poules pondeuses en cage, les manifestations cliniques peuvent sembler n'affecter au départ que des oiseaux isolés et ne se répandre que très lentement au reste du troupeau. Les signes précoces incluent une dépression sévère ou la mort d'un seul oiseau par cage, dans une zone délimitée de la batterie d'élevage

(Fig. 6.32). La propagation aux cages voisines a lieu ultérieurement et affecte l'ensemble de la batterie d'élevage en l'espace de 10 à 14 jours. Cette différence de propagation entre poules en cage et poulets élevés sur litière est probablement liée aux contacts réduits entre oiseaux appartenant à des cages différentes et à l'absence de contacts entre oiseaux sensibles et animaux infectés. De plus, la quantité de matières fécales infectées qui se trouve en contact direct avec les oiseaux est inférieure chez les oiseaux élevés en cage par rapport aux oiseaux élevés sur litière. Lors de l'épizootie italienne d'IAHP H7N1 survenue en 2000, la période d'incubation chez un troupeau de pondeuses en cage avait été estimée à 18 jours.

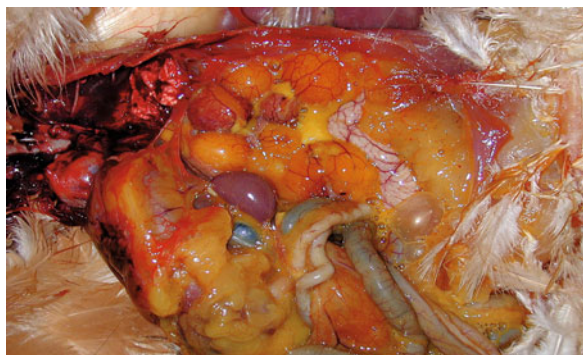


Fig. 6.37 Pondeuses infectées naturellement par IAHP H7N1 et présentant une péritonite avec jaune d'oeuf.

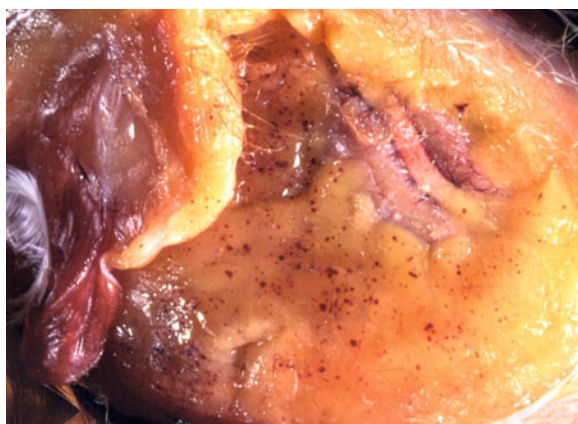
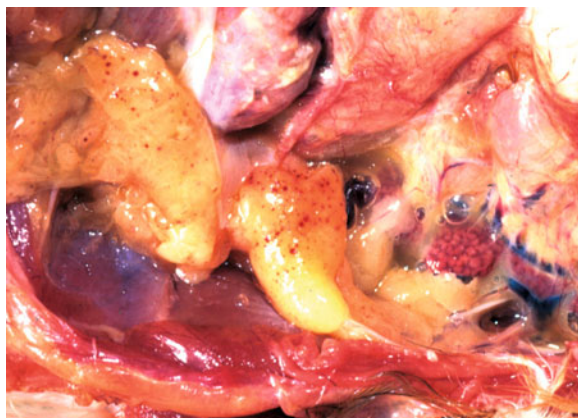


Fig. 6.38 a, b Pondeuses en cage infectées naturellement par IAHP H7N1 et présentant des hémorragies au niveau de la graisse abdominale.



Fig. 6.39 Poulet infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant des pétéchies sur la séreuse du jabot. (Avec l'aimable autorisation de Thierry Van den Berg.).

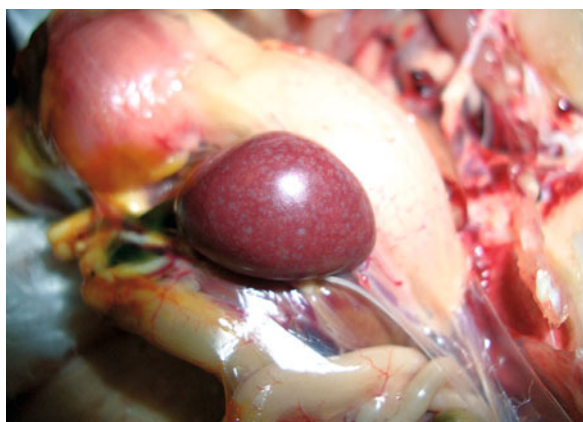


Fig. 6.40 Poulet EOPS infecté expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant une hyperplasie et une nécrose de la rate.

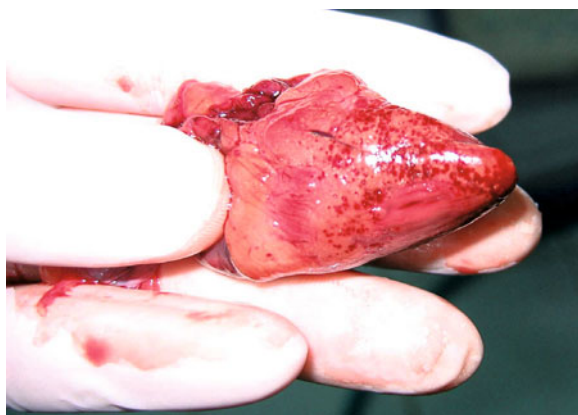


Fig. 6.41 Poulet infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant des pétéchies sur l'épicarde. (Avec l'aimable autorisation de Thierry Van den Berg.).

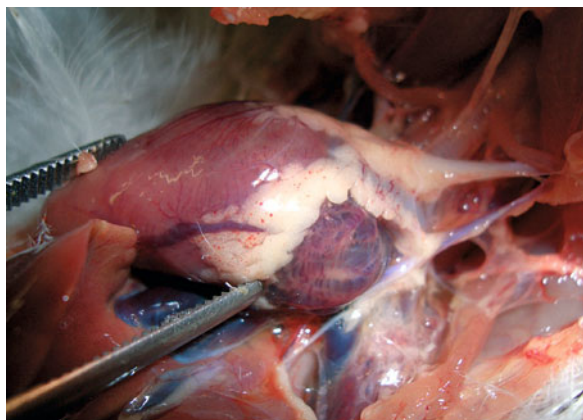


Fig. 6.42 Poulet EOPS infecté expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant une péricardite accompagnée d'un exsudat clair et de pétéchiies au niveau de la graisse péricardique.

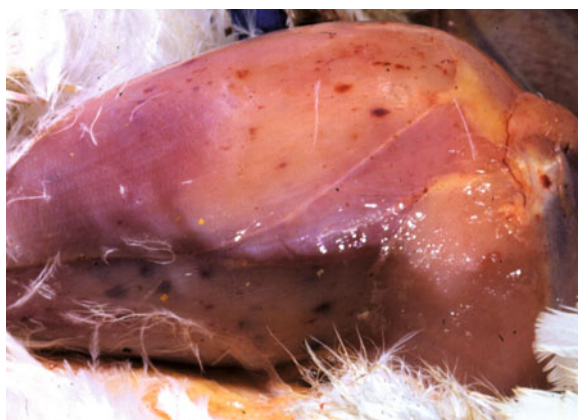


Fig. 6.43 Poulet infecté naturellement par IAHP H7N1 et présentant des pétéchiies au niveau des muscles des pattes.



Fig. 6.44 Poulet EOPS infecté naturellement par IAHP H7N1 et présentant des hémorragies striées au niveau des muscles du bréchet et des pattes.



Fig. 6.45 Poulet infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant des hémorragies sur la séreuse du proventricule. (Avec l'aimable autorisation de Thierry Van den Berg.)

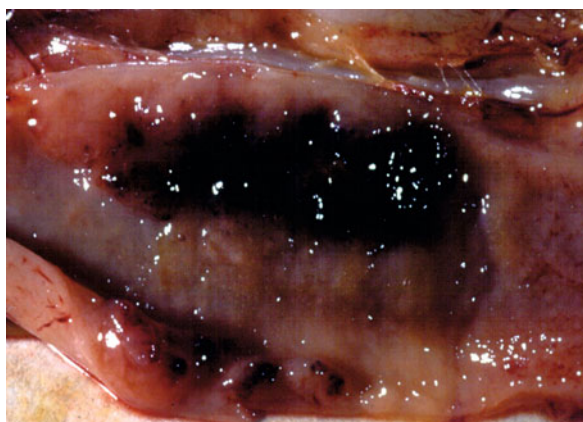


Fig. 6.46 Poulets de chair reproducteurs infectés naturellement par IAHP H7N1 et dont les amygdales cœcales présentent des hémorragies.



Fig. 6.47 Poulet infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pancréatite hémorragique. (Avec l'aimable autorisation de Corrie Brown.)

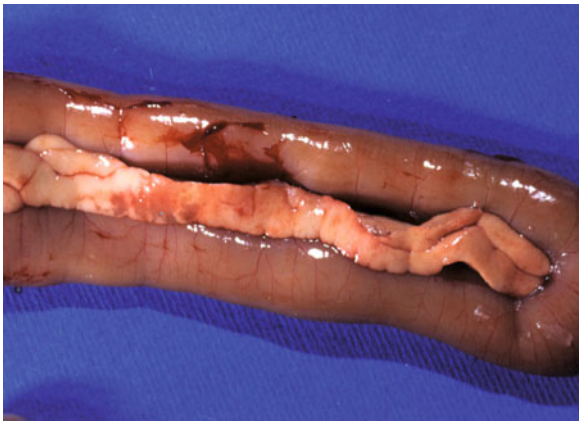


Fig. 6.48 Poulet de chair reproducteur infecté naturellement par IAHP H7N1 et présentant une pancréatite.

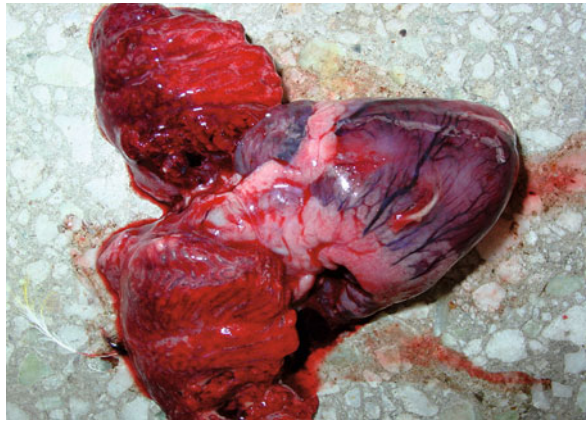


Fig. 6.49 Poulet infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pneumonie bilatérale accompagnée d'œdème. (Avec l'aimable autorisation de Corrie Brown.)



Fig. 6.50 Urine vert brillant contenant des calculs d'urate et provenant d'une autruche infectée naturellement par IAHP H7N1.

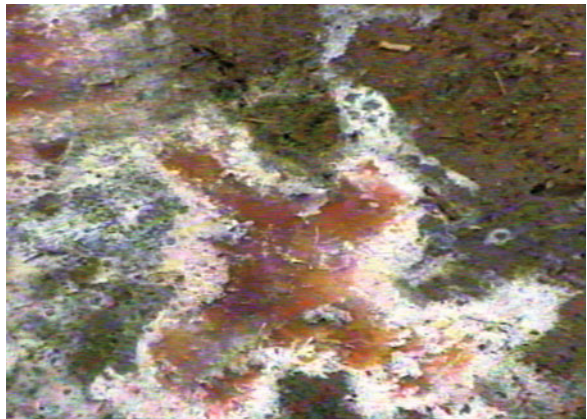


Fig. 6.51 Matières fécales hémorragiques produites par une autruche atteinte d'IAHP H7N1.

Chez les poules pondeuses, les signes cliniques consistent en une prostration, une somnolence et un arrêt de la ponte et de la consommation de nourriture. Les crêtes apparaissent cyanosées et parfois pâles et flasques (Fig. 6.33). On peut aussi observer des hémorragies au niveau des pattes, une suffocation, accompagnée de tremblements de la tête ainsi qu'une prostration. Les oiseaux libérés de leurs cages sont immobiles et un liquide séreux jaune verdâtre s'écoule de la cavité buccale. La qualité de la coquille est également affectée (œufs blanchâtres et fragiles), probablement en raison de la perte totale d'appétit de l'oiseau. Le nombre d'œufs produits diminue très rapidement en raison de la mortalité élevée (Fig. 6.34).

6.3.2.2 Lésions macroscopiques

Le gonflement de la tête et de la partie haute du cou survient fréquemment suite à l'œdème sous-cutané et peut être accompagné de pétéchies ou d'ecchymoses (Fig. 6.35, 6.36.). Une conjonctivite et un œdème périorbitaire sont souvent retrouvés. Des hémorragies et une cyanose de la peau se manifestent fréquemment, surtout au niveau des caroncules, de la crête et des pattes. Les lésions des viscères sont représentées par des hémorragies apparaissant sur les séreuses et les muqueuses et au niveau de la graisse abdominale (Fig. 6.37, 6.38a, 6.38b, 6.39), ainsi que par des foyers nécrotiques (Fig. 6.40) à l'intérieur du parenchyme. Des hémorragies sont couramment présentes au niveau de l'épicarde (Fig. 6.41), du péricarde (Fig. 6.42), des muscles des pectoraux et des pattes



Fig. 6.52 Autruche juvénile atteinte d'IAHP H7N1 et présentant un écoulement nasal séreux verdâtre.



Fig. 6.53 Autruche juvénile atteinte d'IAHP H7N1 et présentant une entérite hémorragique nécrotique.



Fig. 6.54 Autruche juvénile atteinte d'IAHP H7N1 et présentant des hémorragies punctiformes sur la séreuse intestinale.

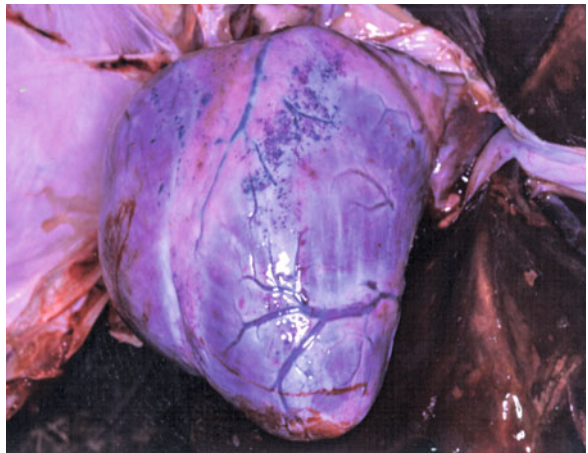


Fig. 6.55 Autruche juvénile atteinte d'IAHP H7N1 et présentant des hémorragies punctiformes sur l'épicarde.

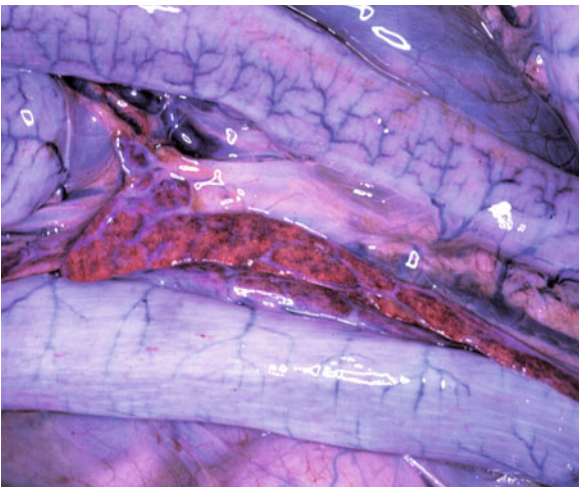


Fig. 6.56 Autruche juvénile atteinte d'IAHP H7N1 et présentant une pancréatite hémorragique nécrotique.

(Fig. 6.43, 6.44), de la muqueuse et de la séreuse du proventricule (Fig. 6.45), du ventricule et des amygdales caécals (Fig. 6.46). Le pancréas est l'organe qui semble être le plus atteint par la multiplication virale (Fig. 6.47, 6.48). Il présente une nécrose focale à diffuse des cellules acineuses. On observe parfois un œdème interstitiel du pancréas associé à une péritonite fibrineuse. Les poumons et la trachée sont congestionnés (Fig. 6.49) ; la trachée présente des hémorragies au niveau de la sous-muqueuse.

6.3.3 Autruches (*Struthio camelus*)

6.3.3.1 Signes cliniques et lésions macroscopiques

Les signes cliniques et les lésions observées sur les viscères des autruches infectées par des virus IAHP



Fig. 6.57 Autruche juvénile infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant de nombreux foyers nécrotiques isolés à coalescents à la surface du foie.

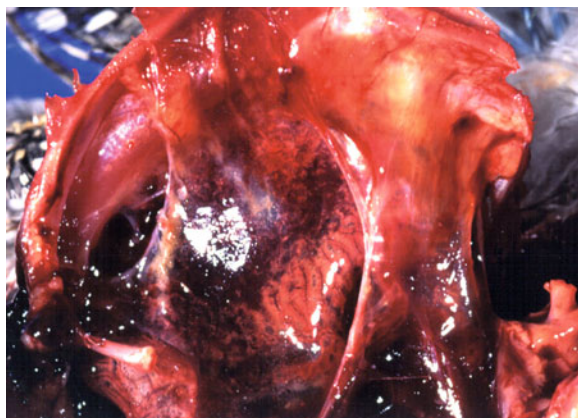


Fig. 6.58 Pintade infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une congestion pulmonaire et un œdème.

varient selon la souche virale, mais se manifestent plus constamment chez les oiseaux jeunes ou juvéniles. Les signes précoces se traduisent par une diminution de l'activité et une perte d'appétit qui précèdent l'apparition de signes cliniques distincts tels que l'abattement, les plumes ébouriffées, l'éternuement et la respiration bec ouvert. Certains oiseaux présentent une incoordination, une paralysie des ailes et des tremblements de la tête et du cou. La tête peut sembler congestionnée et enflée et est parfois complètement penchée vers l'arrière ou sur le côté, en raison d'un torticollis.

L'urine est de couleur vert brillant (Fig. 6.50) et riche en urates ; les matières fécales sont hémorragiques (Fig. 6.51). Au cours de la phase préagonique, les oiseaux sont allongés sur le sol et un liquide muqueux de couleur verte s'écoule de la cavité buccale. Certains oiseaux peuvent guérir environ une semaine après la survenue des signes cliniques. Les autruches adultes ou les reproductrices ne montrent généralement pas de signes cliniques lorsqu'elles sont infectées par des virus IAHP.

Les lésions observées à l'examen *post-mortem* varient selon la souche virale. Les plus courantes sont cependant un œdème de la tête et de la partie haute du cou, une entérite hémorragique accompagnée d'exsudat hémorragique dans la lumière intestinale (Fig. 6.53), des hémorragies punctiformes sur la séreuse intestinale (Fig. 6.54) et sur l'épicarde (Fig. 6.55), un pancréas hémorragique, durci et hypertrophié (Fig. 6.56), ainsi qu'une congestion des poumons et de la trachée. Le foie peut être hypertrophié avec des contours arrondis et comporter des zones irrégulières nécrotiques et congestionnées (Fig. 6.57). Les reins sont hypertrophiés, mous et contiennent des calculs d'urate. La rate peut également être augmentée de volume.



Fig. 6.59 Pintade infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une pancréatite.

6.3.4 Pintade commune (*Numida meleagris*)

6.3.4.1 Signes cliniques

Les cas d'infections de pintade par IAHP constatés à travers le monde sont très peu nombreux et le nombre de cas documentés est encore plus rare. Ces oiseaux semblent généralement très sensibles à l'IAHP. Le syndrome de mort subite a été constaté 48 à 72 heures après la survenue des premiers signes cliniques ; ce syndrome est accompagné d'une mortalité élevée (atteignant jusqu'à 100 % des oiseaux reproducteurs). Les signes cliniques incluent l'anorexie et l'abattement, qui sont suivis de signes cliniques neurologiques.



Fig. 6.60 Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) infectée expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant un torticollis.

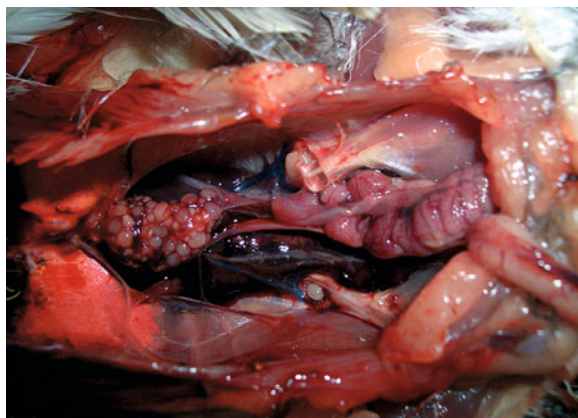


Fig. 6.61 Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) infectée expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant une congestion des reins, de l'ovaire et de l'oviducte.

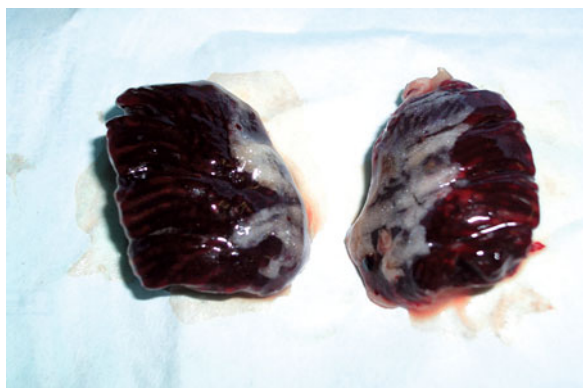


Fig. 6.62 Poumons d'une caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) infectée expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant une pneumonie bilatérale et un œdème.



Fig. 6.63 Caille reproductrice infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une pancréatite hémorragique.



Fig. 6.64 Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) infectée expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant une pancréatite accompagnée de foyers nécrotiques multiples et d'une duodénite.



Fig. 6.65 Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*) infectée expérimentalement par IAHP H7N1 et présentant des muscles pectoraux hémorragiques.

6.3.4.2 Lésions macroscopiques

Les lésions macroscopiques constatées à l'examen *post-mortem* sont similaires à celles observées chez les poulets. On constate couramment une congestion des organes internes, parfois associée à un œdème pulmonaire (Fig. 6.58). Une pancréatite focale est également rapportée (Fig. 6.59).

6.3.5 Caille japonaise (*Coturnix coturnix japonica*)

6.3.5.1 Signes cliniques

Dans cette espèce, les infections d'IAHP sont caractérisées par une affection respiratoire sévère qui évolue en quelques jours en un tableau clinique comprenant une prostration, une somnolence et une apathie, souvent accompagnées d'une diarrhée blanchâtre et d'une suffocation précédant la mort.

Des signes cliniques neurologiques simultanés tels qu'un opisthotonos et un torticolis (Fig. 6.60) sont aussi couramment observés. La ponte s'arrête quelques jours après le début des premiers signes cliniques. La mortalité est plus faible que chez les poulets et les dindes et se situe entre 5 et 10 % par jour.

6.3.5.2 Lésions macroscopiques

Lors de l'examen *post-mortem*, les seules lésions constatées sont une congestion des viscères (Fig. 6.61, 6.62), une entérite, une péritonite avec ponte abdominale et une pancréatite hémorragique (Fig. 6.63, 6.64). Une congestion musculaire a également été observée (Fig. 6.65). Les plumes situées sur le pourtour de l'orifice cloacal sont souvent souillées par des matières fécales de couleur blanc verdâtre.

Chez la caille, la suspicion d'IAHP doit faire l'objet d'une évaluation clinique méticuleuse puisque les signes cliniques n'ont pas été mis en évidence lors d'études expérimentales.

6.3.6. Canards et oies

6.3.6.1 Signes cliniques

Les canards et les oies sont plus résistants que les autres oiseaux domestiques aux manifestations cliniques d'IAHP.



Fig. 6.66 Canard pékinois (*Anas platyrhynchos*) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et présentant un opisthotonos (« tête dans les étoiles »).



Fig. 6.67 Canard pékinois (*Anas platyrhynchos*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant un torticollis. (Avec l'aimable autorisation de Walid Hamdy Kilany).

La pathogénicité de certaines souches envers plusieurs espèces d'oiseaux aquatiques a cependant été démontrée. Il s'agit des souches H7N1 et H5N1, responsables de plus de 50 % de la mortalité. Chez les canards de Barbarie (*Cairina moschata*), des signes cliniques neurologiques tels qu'une incoordination, des tremblements et



Fig. 6.68 Canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et présentant un contenu intestinal hémorragique.



Fig. 6.69 Canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et dont le proventricule et le gésier présentent un contenu hémorragique.

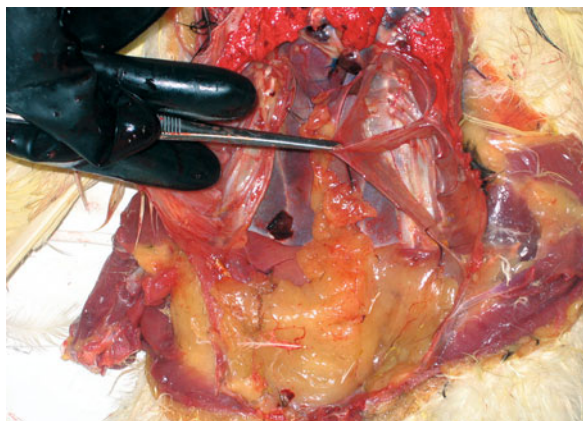


Fig. 6.70 Canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et présentant une aéro-sacculite.



Fig. 6.71 Canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et présentant des pétéchies au niveau du cerveau.



Fig. 6.72 Canard Pékin (*Anas platyrhynchos*) infecté expérimentalement par IAHP H5N1 et présentant des hémorragies au niveau du bec.



Fig. 6.73 Oie domestique infectée naturellement par IAHP H7N1 et présentant une pancréatite et une duodénite.

une démarche anormale ressemblant à un boitement ont été constatés.

Les canards Pékin (*Anas platyrhynchos*) sont aussi considérés comme étant cliniquement résistants aux virus IAHP. Selon des rapports concernant des infections naturelle et expérimentale par des virus appartenant au sous-type H5N1 asiatique, des oiseaux infectés par certaines souches ne présenteraient aucun signe clinique alors que d'autres souches seraient responsables d'une mortalité pouvant atteindre 70 %. Les signes cliniques incluent une conjonctivite et une dépression légère, suivies de signes cliniques neurologiques tels qu'un torticolis, une incoordination, des tremblements et des ictus (Fig. 6.66, 6.67).



Fig. 6.74 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant un torticolis. (Avec l'aimable autorisation d'Antonio Camarda.)



Fig. 6.75 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pancréatite accompagnée d'hémorragies pétéchiiales. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)



Fig. 6.76 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pancréatite accompagnée d'hémorragies pétéchiiales. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)



Fig. 6.77 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pancréatite et une duodénite hémorragiques. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)

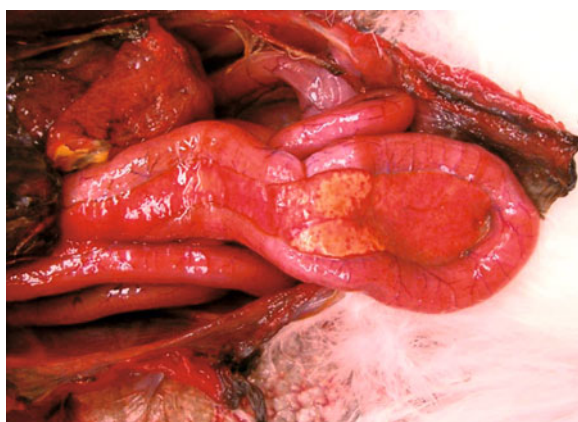


Fig. 6.78 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pancréatite nécrotique et hémorragique. (Avec l'aimable autorisation de Caroline Brojer.)

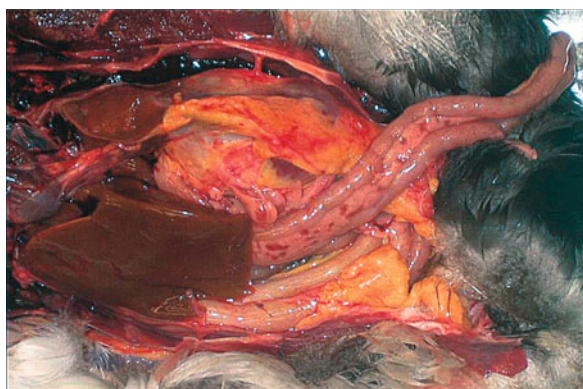


Fig. 6.79 Fuligule morillon (*Aythya fuligula*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pancréatite nécrotique et hémorragique. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)



Fig. 6.80 Pélican (*Pelecanus* spp.) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une duodénite et une pancréatite. (Avec l'aimable autorisation de Victor Irza.)

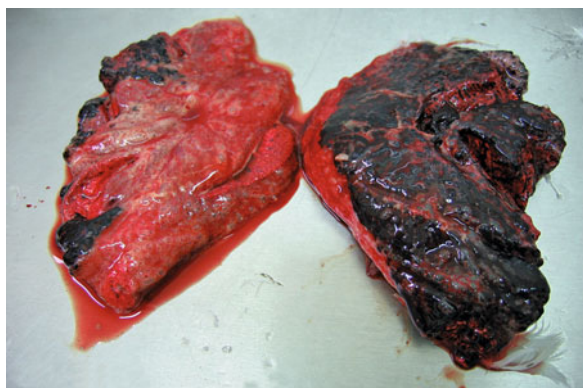


Fig. 6.81 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pneumonie bilatérale avec hémorragies et œdème. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)

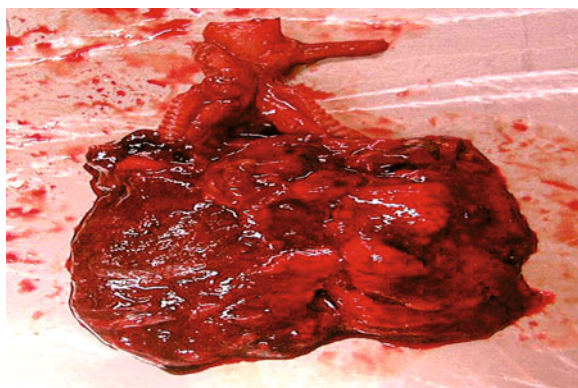


Fig. 6.82 Grand-duc d'Europe (*Bubo bubo*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pneumonie bilatérale accompagnée d'hémorragies et d'œdème. (Avec l'aimable autorisation de Caroline Brojer.)



Fig. 6.83 Fuligule milouin (*Aythya ferina*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une pneumonie, une aéro-sacculite et des caillots sanguins dans la cavité splanchnique. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)

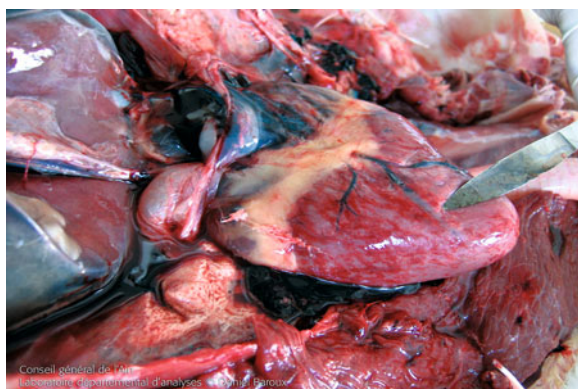


Fig. 6.84 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant des foyers hémorragiques multiples au niveau du myocarde. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)



Fig. 6.85 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant une duodénite hémorragique. (Avec l'aimable autorisation de Victor Irza.)



Fig. 6.86 Pélican (*Pelecanus* spp.) infecté naturellement par IAHP H5N1 et présentant des hémorragies au niveau du proventricule. (Avec l'aimable autorisation de Victor Irza.)



Fig. 6.87 Cygne tuberculé (*Cygnus olor*) infecté naturellement par IAHP H5N1 et dont les reins sont hypertrophiés, congestionnés et hémorragiques. (Avec l'aimable autorisation de Daniel Baroux.)

6.3.6.2 Lésions macroscopiques

Chez les canards Pékin infectés par certaines souches de virus IAHP responsables de signes cliniques, les lésions détectées à l'examen *post-mortem* incluent des saignements au niveau du tractus intestinal (Fig. 6.68), en particulier au niveau de l'estomac et du gésier (Fig. 6.69). Chez certains oiseaux, une aéro-sacculite a été constatée, ainsi que des hémorragies à la surface du pancréas et de la trachée (Fig. 6.70). Une hyperémie et des hémorragies punctiformes peuvent être observées à la surface du cerveau (Fig. 6.71) et sur le bec (Fig. 6.72). Les oies infectées naturellement ont été atteintes de pancréatite (Fig. 6.73).

6.3.7 Oiseaux sauvages aquatiques

6.3.7.1 Signes cliniques

À travers l'Europe, la plupart des oiseaux sauvages aquatiques infectés naturellement par le virus IAHP H5N1 asiatique ont présenté des signes cliniques neurologiques. Parmi les schémas comportementaux des oiseaux atteints, on constate une propension à l'isolement, une apathie en réponse à la stimulation et une absence de toute manifestation de peur vis-à-vis des êtres humains. Certains oiseaux ont montré une difficulté à s'alimenter et à nager et certains se déplaçaient en décrivant des cercles, à la fois sur le sol et dans l'eau. Un torticolis et des tremblements de la tête et du cou sont typiquement observés chez les oiseaux cliniquement infectés (Fig. 6.74).

6.3.7.2 Lésions macroscopiques

Les lésions concordent avec les résultats obtenus pour l'IAHP chez d'autres espèces aviaires, en l'occurrence des hémorragies et une congestion du pancréas (Fig. 6.75-6.80), une congestion des poumons et de la trachée qui peut se révéler hémorragique (Fig. 6.81-6.83), une aéro-sacculite, des hémorragies ecchymotiques sur l'épicarde et le muscle cardiaque (Fig. 6.84), une entérite ou une proventriculite hémorragique ou catarrhale (Fig. 6.85, 6.86), une dégénérescence des reins et une néphrite hémorragique (Fig. 6.87).

6.4 Directives pour la visite des exploitations

6.4.1 Mesures de protection pour le recueil d'échantillons sur une exploitation avicole infectée ou suspectée d'infection

Afin de minimiser le risque d'exposition humaine aux virus IA et pour éviter la contamination des vêtements par lesquels le virus peut se répandre à d'autres locaux, il est indispensable de prendre les précautions suivantes :

- un soin particulier doit être porté à la prévention ou à la minimisation de la production de poussière ou d'autres aérosols lors de la manutention de volailles infectées ou suspectées d'infection, ainsi que de matériels avicoles contaminés (parties du corps, tissus corporels, sang, plumes, sécrétions des volailles et autres matériels à risque potentiel d'infection tels que la litière) et lors de l'abattage d'oiseaux infectés et des opérations de nettoyage et de désinfection ;
- seul un personnel formé peut accéder aux zones de l'exploitation contenant des volailles infectées ou suspectées d'infection et l'effectif doit être limité aux seules personnes nécessaires à la réalisation des opérations essentielles.

6.4.1.1 Équipements de protection individuelle

En entrant dans des zones d'élevage de volailles, il est nécessaire de porter des vêtements spéciaux et des équipements de protection individuelle. Avant que le personnel ne quitte les lieux, ces équipements doivent être enlevés et conservés dans des conteneurs fermés hermétiquement, afin de permettre un nettoyage/désinfection ou une élimination réalisés par des professionnels, dans le but de prévenir la dissémination du virus. Les équipements concernés sont les suivants :

1. vêtements de travail recouvrant le corps (bleus, combinaisons jetables, sous-vêtements jetables) ;
2. bonnet recouvrant complètement les cheveux ;
3. bottes pouvant être désinfectées ;
4. gants protecteurs imperméables pouvant être désinfectés ;
5. masques protecteurs de la bouche et du nez ou masque respiratoire bien ajusté, au cas où la production d'aérosols ne peut être prévenue efficacement (FFP2 ou FFP3) ;

6. protections oculaires telles que des lunettes ajustables avec protection sur les côtés.

Une cagoule de protection respiratoire (THP3) est préférable car elle permet de dissocier les protections respiratoire et oculaire.

Après avoir enlevé les vêtements de travail/protection, prendre une douche et se désinfecter les mains. Les exigences légales spécifiques relatives au contrôle des maladies animales doivent être respectées.

6.4.2 Résumé des informations devant être recueillies à partir d'un cas index suspect (voir aussi Annexe 2 : formulaire d'enquête épidémiologique)

Avant de procéder au diagnostic de l'IA et aux examens *post-mortem*, il est indispensable de rassembler un historique complet du foyer, incluant :

- l'identification de l'exploitation que l'on soupçonne être le centre de l'infection ainsi que l'identification préliminaire des unités et sous-unités de production touchées par le foyer ; la localisation de la principale exploitation suspecte et la concentration des exploitations avicoles dans la région ; les mesures de biosécurité mises en place dans chaque unité et sous-unité impliquées ; les caractéristiques des différents types de production (troupeau de basse-cour ou élevage intensif) ; la proximité de terrains marécageux abritant des oiseaux sauvages sédentaires ou migrateurs ;
- l'identification du personnel concerné par la gestion de l'unité ;
- les données anamnestiques comprenant les informations relatives à la consommation de nourriture et au taux de production d'œufs des volailles domestiques (les pondeuses, les dindes et les poulets reproducteurs [filière chair] infectés par le virus IAHP peuvent initialement pondre des œufs dont la coquille est ramollie, puis s'arrêter de pondre), la durée des signes cliniques et le nombre d'oiseaux malades ou morts. L'information appropriée pouvant aider à révéler l'origine de la maladie doit inclure le lieu et l'heure d'apparition de la maladie chez les oiseaux atteints.

Toutes les espèces sensibles présentes sur l'exploitation doivent subir un examen clinique, en commençant par les unités les plus éloignées du centre du foyer. Une attention particulière doit être portée à la vaccination antérieure de tous les oiseaux ou de certains d'entre eux. Toutes ces informations doivent être restituées dans l'enquête épidémiologique. Un rapport

officiel doit identifier les espèces de tous les animaux présents dans chaque unité, la date d'apparition et la description de tous les signes cliniques, ainsi que le pourcentage de mortalité.

6.4.2.1 Examen clinique

Avant de les éliminer, il est indispensable d'effectuer un examen minutieux des oiseaux vivants atteints, afin d'identifier les signes caractéristiques causés par les virus de forte virulence et incluant des signes cliniques neurologiques tels que : incoordination, tremblement, torticolis, démarche anormale et paralysie. L'IAHP entraîne aussi souvent de l'abattement, une cécité, une entérite sévère accompagnée de diarrhée hémorragique et des troubles respiratoires sévères.

6.4.2.2 Examen externe

L'examen physique des oiseaux doit impérativement comporter une observation des plumes situées autour du cloaque afin de repérer les signes de diarrhée, ainsi que l'inspection des parties non couvertes de plumes telles que les pattes, les articulations, la crête et les caroncules. Les crêtes et les caroncules des oiseaux atteints d'IAHP sont typiquement cyanosées et œdémateuses ; leurs extrémités peuvent montrer des pétéchies ou des ecchymoses. Des hémorragies sous-cutanées peuvent aussi être observées. Il est important de noter tout gonflement des sinus sous-orbitaires et tout écoulement cloacal. La nature, la couleur, la consistance et l'odeur de ces écoulements doivent être documentées.

6.4.2.3 Précautions à prendre au cours de l'autopsie

L'examen *post-mortem* doit être effectué sur au moins cinq oiseaux suspectés d'être infectés par IAHP. Cet examen doit être réalisé par les autorités compétentes dans des laboratoires de diagnostic conformes aux règles de santé et de sécurité.

La table d'autopsie doit être humidifiée à l'aide d'une solution d'eau savonneuse. La même solution doit être utilisée pour mouiller les plumes des oiseaux destinés à être autopsiés, afin de minimiser la formation de poussière et d'aérosols. Il est nécessaire de porter des gants résistants en caoutchouc, un masque respiratoire avec soupape d'aspiration (FFP2 ou FFP3) et des visières ou des lunettes de protection.

Tous les équipements nécessaires, incluant bistouris, pinces, ciseaux, récipients en plastique, écouvillons, etc. doivent se situer à portée de main, dans la salle d'autopsie.

Les poubelles destinées à l'élimination des oiseaux autopsiés doivent être disponibles en quantité suffisante pour contenir tous les déchets.

6.5 Diagnostic différentiel

6.5.1 Résumé des principales lésions post-mortem associées à IAHP ou à IAFP

L'infection des oiseaux peut donner naissance à une grande diversité de signes cliniques qui varient selon l'hôte, la souche virale, l'état immunitaire de l'hôte, la présence d'organismes secondaires aggravants et les conditions environnementales.

Chez les volailles, l'IAHP peut provoquer l'apparition soudaine d'une mortalité élevée des troupeaux pouvant atteindre 100 %, malgré l'absence de signes cliniques avant-coureurs. Les oiseaux morts d'une forme suraiguë d'influenza aviaire présentent des lésions macroscopiques minimales qui se résument principalement à une déshydratation et une congestion des viscères et des muscles.

Lorsqu'elles sont présentes, les lésions du tractus respiratoire traduisent une détresse respiratoire grave et aiguë se manifestant par une toux, une suffocation et une expectoration d'exsudats sanglants. Chez les oiseaux morts après une évolution clinique prolongée, on observe des pétéchies et des ecchymoses affectant tout le corps et notamment le larynx, la trachée, le proventricule, les amygdales caecales et la graisse épicaudique, ainsi que les séreuses et les muqueuses des organes respiratoires et digestifs. Il y a souvent présence d'un œdème sous-cutané important, en particulier autour de la tête et des pattes. Le cadavre peut être déshydraté. Des foyers nécrotiques jaunes ou gris peuvent être présents dans la rate, le foie, les reins et les poumons. Les sacs aériens peuvent contenir un exsudat. La rate peut être hypertrophiée et hémorragique.

L'IAFP est généralement asymptomatique chez les oiseaux sauvages. Chez les volailles ne présentant pas d'exacerbation, elle n'est responsable que de signes cliniques respiratoires modérés à sévères. Chez les pondeuses, l'infection causée par IAFP peut entraîner une baisse de la production d'œufs et une diminution du taux d'éclosion. Les poulets et les dindes peuvent présenter un plumage ébouriffé, une apathie et une

baisse de la consommation de nourriture et d'eau. Il peut y avoir diarrhée aiguë, sans perte de poids.

Le diagnostic différentiel de l'IAFP doit envisager les maladies causant une baisse de la production d'œufs et des signes cliniques respiratoires modérés. Ces maladies sont la bronchite infectieuse, le coryza infectieux, l'infection par le pneumovirus, la laryngotrachéite bénigne et la mycoplasmosé.

Il faut tenir compte du fait que l'IAFP coexiste souvent avec une infection secondaire causée par une bactérie ou un mycoplasme. Dans un tel cas, l'IAFP peut évoluer en une forme chronique caractérisée par une perte de poids, un gonflement des sinus sous-orbitaires, des signes cliniques respiratoires sévères et une mortalité des troupeaux s'élevant à 40-70 %, en particulier chez les dindes.

En association avec l'IAFP, *Pasteurella multocida* et *Escherichia coli* entraînent souvent des lésions macroscopiques telles qu'une aéro-sacculite fibrineuse, une péricardite et une rétention d'œufs.

6.5.2 Diagnostic différentiel de l'influenza aviaire hautement pathogène

Le diagnostic différentiel de l'IAHP doit envisager toute circonstance responsable de l'apparition soudaine d'une mortalité élevée. Les maladies infectieuses, telles que les souches vélogènes du virus MN, doivent également être considérées, de même que l'empoisonnement aigu ou la mauvaise gestion de l'élevage. Cette dernière inclut les variations extrêmes de chauffage, de ventilation ou d'humidité, qui peuvent tous avoir des conséquences très graves lorsque les animaux sont maintenus dans des systèmes d'élevage clos. La mauvaise gestion de la régulation de la température peut entraîner une production de monoxyde de carbone. L'empoisonnement aigu peut provoquer la mort subite d'un pourcentage élevé d'animaux. Les autres formes d'empoisonnement peuvent être dues à l'ingestion de pesticides, à l'intoxication causée par le surdosage d'anticoccidiens ou à l'intoxication au chlore due à une désinfection imprudente de l'environnement.

L'apparition soudaine d'une mortalité élevée peut également être provoquée par le botulisme, qui est une intoxication causée par l'ingestion de toxines produites par *Clostridium botulinum*. Le botulisme causé par de la nourriture contaminée a été observé à la fois chez les volailles et les oiseaux aquatiques. Les signes cliniques apparaissent quelques heures à

quelques jours après ingestion de la toxine. Chez les poulets, ces signes cliniques incluent un affaiblissement et une perte progressive du contrôle des pattes, des ailes et du cou. Les tremblements et la parésie évoluent en paralysie. Les oiseaux les plus gravement atteints meurent en quelques heures.

Les principales maladies infectieuses qu'il est nécessaire de différencier de l'IAHP sont brièvement décrites ci-dessous.

6.5.2.1 Maladie de Newcastle

La MN est la maladie qui ressemble le plus à l'IA. Elle est causée par différentes souches de paramyxovirus aviaire de type 1. Les souches virales de MN sont classées selon leur degré de pathogénicité (souches vélogènes, mésogènes et lentogènes). Une description plus détaillée de la maladie est fournie dans le chapitre particulier consacré à la MN. Il est quasiment impossible de différencier l'IAHP d'une forme vélogène de MN sans diagnostic de laboratoire.

6.5.2.2 Laryngotrachéite infectieuse

La laryngotrachéite infectieuse est une maladie aviaire présente mondialement et causée par un Herpesvirus provoquant une détresse respiratoire importante. Les poulets et les faisans sont les espèces le plus fréquemment touchées, bien que des infections d'autres oiseaux tels que le paon aient également été citées. La période d'incubation se situe entre cinq et dix jours. Jusqu'à présent, un seul sérotype a été rapporté, malgré la variabilité importante de la pathogénicité des souches. La plupart des souches ont une virulence marquée. La maladie peut se manifester sous une forme aiguë ou sub-aiguë, en fonction du pathotype viral. La forme aiguë se propage rapidement à tout le troupeau. La mort est subite et la mortalité du troupeau peut s'élever jusqu'à 50 %. Les signes cliniques caractéristiques sont une dyspnée sévère avec respiration bec ouvert, une suffocation bruyante et l'expectoration de sécrétions hémorragiques. On trouve souvent des sécrétions hémorragiques éparses sur les murs des locaux. La baisse de la consommation de nourriture et d'eau ainsi que la diminution de la production d'œufs sont couramment observées.

Les constatations *post-mortem* se limitent à la partie supérieure du tractus respiratoire et consistent en une laryngotrachéite hémorragique accompagnée de caillots sanguins et d'exsudats mucoïdes dans la trachée. Le cadavre est souvent cyanosé.

La laryngotrachéite infectieuse est une maladie à déclaration obligatoire dans la plupart des pays. Les autorités responsables de la santé animale doivent immédiatement être averties de sa suspicion.

6.5.2.3 Bursite infectieuse (maladie de Gumboro)

La bursite infectieuse aviaire (IBD) est causée par des souches hypervirulentes de virus IBD (VVIBDV), appartenant à la famille des *Birnaviridae*. L'IBD est une maladie virale aiguë et contagieuse des jeunes poulets. D'autres formes d'IBD peuvent être beaucoup plus bénignes et le virus peut infecter d'autres oiseaux sans entraîner de signes cliniques. Dans le cas de l'IBD virulente, la morbidité et la mortalité commencent trois jours après l'infection, atteignent leur maximum, puis déclinent sur une période de 5-7 jours.

Les signes cliniques sont présents chez les poussins âgés de plus de trois semaines et sont caractérisés par de la diarrhée et une déshydratation. On observe souvent des tremblements, une incoordination et un picage de la région cloacale. Les poussins présentent également de l'abattement, une anorexie et un plumage ébouriffé. Le virus endommage gravement la bourse de Fabricius et les organes lymphoïdes tels que le thymus, les amygdales cœcales et la rate. L'infection entraîne des degrés variables d'immunodépression, se traduisant par une sensibilité élevée aux pathogènes secondaires. Lorsque les techniques d'élevage sont médiocres ou que la souche virale est particulièrement virulente, la mortalité du troupeau peut dépasser 30 %.

Les lésions macroscopiques consistent en une bourse hypertrophiée et hémorragique ayant tendance à s'atrophier après la phase aiguë, une présence accrue de mucus dans l'intestin, une hypertrophie des reins accompagnée de calculs d'urate et des foyers nécrotiques dans les autres organes lymphoïdes. Des pétéchies peuvent être présentes sur les muscles des cuisses et du bréchet et parfois à la jonction du proventricule et du gésier.

L'IBD est une maladie à déclaration obligatoire dans la plupart des pays. Les autorités responsables de la santé animale doivent immédiatement être averties de sa suspicion.

6.5.2.4 Entérite virale du canard (peste du canard)

L'entérite virale du canard (DVE) est une infection aiguë causée par un Herpesvirus et responsable

d'une entérite hémorragique entraînant parfois la mort subite. La mortalité du troupeau peut atteindre 100 % en cinq jours. La période d'incubation est de trois à cinq jours après exposition.

La forme aiguë de la DVE est caractérisée par une diarrhée aqueuse et hémorragique. Parmi les autres signes cliniques, on note une déshydratation, une faiblesse, une léthargie, une inappétence et une baisse marquée de la production d'œufs. Les oiseaux infectés manifestent parfois des tremblements et une ataxie. Le plumage des oiseaux est ébouriffé et taché de sang.

Les constatations *post-mortem* sont une entérite sévère, des hémorragies et des plaques croûteuses recouvrant la muqueuse de l'ensemble de l'appareil digestif, de l'œsophage jusqu'au tractus intestinal incluant le cæcum et le rectum.

6.5.2.5 Choléra aviaire aigu

Le choléra aviaire aigu est une maladie contagieuse résultant de l'infection par *Pasteurella multocida*. Le choléra aviaire doit être suspecté lorsque de grandes quantités d'animaux morts sont répertoriées sur un bref intervalle de temps. Toutes les espèces domestiques sont sensibles à la maladie, mais les canards, les dindes et les cailles sont les plus à risque d'infection. La pasteurellose aiguë peut entraîner la mort, 6 à 12 heures après l'exposition. La sensibilité à l'infection et le cours de la maladie dépendent de plusieurs facteurs : le sexe, l'âge, la génétique, l'état immunitaire, les infections simultanées, le statut nutritionnel et la virulence de la souche.

Certains oiseaux apparaissent léthargiques alors que d'autres peuvent présenter des signes cliniques neurologiques tels que des convulsions, une nage en cercles ou un vol erratique causé par l'inflammation de l'oreille moyenne. Parmi les autres signes cliniques, on note un écoulement muqueux par le bec, des croûtes nasales tachées de sang et des plumes ébouriffées. Chez les volailles, la mortalité liée au choléra aviaire peut dépasser 50 % du troupeau.

La mort peut survenir très rapidement, auquel cas les lésions macroscopiques sont absentes. Chez les oiseaux morts du choléra aviaire, on observe couramment une rate congestionnée, hypertrophiée et hémorragique. On constate également souvent des hémorragies recouvrant le cœur, le foie et le gésier. Des taches jaunes peuvent aussi être observées sur certaines parties du tissu hépatique, de même qu'une

altération de la texture, de la couleur et de la forme de cet organe. *Pasteurella multocida* peut aussi être localisée sur la crête et les caroncules et donner un aspect enflé et œdémateux.

Le choléra aviaire est une maladie à déclaration obligatoire dans la plupart des pays. Les autorités responsables de la santé animale doivent être averties dès son identification.

7.1 Isolement du virus de l'influenza aviaire

7.1.1 Gestion et préparation des échantillons

Attribuer un numéro d'identification à l'échantillon, dès son arrivée au laboratoire.

Remplir une fiche technique en y indiquant le numéro de l'échantillon, le type d'échantillon, l'espèce, les analyses à effectuer et la date à laquelle les analyses vont commencer.

Cette fiche doit être préparée et tenue par le technicien qui effectue les tests.

7.1.1.1 Écouvillons

- Sous une hotte à flux laminaire et en conditions stériles, prélever 2 mL de PBS contenant des antibiotiques à partir du tube où les écouvillons avaient été immergés et les transférer dans un autre tube.
- Pour les écouvillons fortement contaminés, ajouter 2 mL d'antibiotiques pour obtenir une dilution finale de 1/2.
- Centrifuger l'échantillon à 1 000 g pendant 10 min pour éliminer les grosses particules.
- Utiliser le surnageant pour inoculer des œufs de poule embryonnés exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS).
- Conserver l'échantillon à 4 °C jusqu'au lendemain ou à -80 °C si le stockage doit être plus long.

7.1.1.2 Organes

- Dégeler les organes à température ambiante ou à 4 °C.
- Sous une hotte à flux laminaire, prélever un échantillon de 1 cm³ à l'aide de pinces et de ciseaux stériles.

Les organes peuvent être groupés en fonction de l'appareil auquel ils appartiennent.

- Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'un mortier, en y ajoutant du sable de silice stérile.
- Ajouter 9 mL de PBS contenant des antibiotiques.
- Faire décanter l'homogénat dans un tube à essai de 15 mL. Laisser incuber à 4 °C pendant une nuit. Au cas où l'inoculation des œufs ne pourrait être effectuée le lendemain, conserver l'échantillon à -80 °C jusqu'à la date prévue pour le test.
- Centrifuger l'échantillon à 1 000 g pendant 10 min.
- Utiliser le surnageant pour inoculer les œufs de poule embryonnés.

7.2 Isolement viral

Le virus est isolé selon le protocole de l'OIE et en conformité avec les normes européennes (*Manuel de l'OIE* 2008, EC 94/2005).

7.2.1 Protocoles

1. Mirer les œufs de poule EOPS embryonnés âgés de 9 à 11 jours afin de vérifier leur viabilité. Repérer la chambre à air en traçant un trait sur la coquille à l'aide d'un stylo. Percer un petit orifice juste au-dessus de la chambre à air, à l'aide d'un appareil manuel ou électrique (Fig. 7.1).
2. Noter sur cinq œufs le numéro d'identification de l'échantillon, le numéro de passage (1^{er} ou 2^e), le type d'échantillon (poumon, écouvillons cloacaux, etc.) et la date d'inoculation.
3. Inoculer 0,1-0,2 mL de surnageant clarifié obtenu à partir des écouvillons cloacaux ou de l'homogénat d'organe, dans la cavité allantodienne de chacun des cinq œufs de poule EOPS embryonnés âgés de 9 à 11 jours (Fig. 7.2 a-d).

4. Sceller les œufs avec de la colle ou de la cire (Fig. 7.3).
5. Laisser incuber les œufs inoculés à 37 °C pendant 7 jours.
6. Mirer quotidiennement les œufs inoculés afin de contrôler leur viabilité.
7. Pour chaque échantillon, le nombre d'œufs morts doit être noté quotidiennement dans le registre du laboratoire.
8. Tester l'activité hémagglutinante (HA) du liquide allantoïdien des œufs contenant des embryons morts, comme indiqué ci-dessous (Fig. 7.4).
9. Si une activité HA est détectée, procéder à l'identification des agents hémagglutinants à l'aide d'un test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), comme indiqué ci-dessous.
10. Après 7 jours, mettre les œufs restants au frais dans un réfrigérateur (4 °C) pour mettre fin au premier passage.



Fig. 7.1 Perforation d'œufs exempts d'agents pathogènes spécifiques (EOPS) et destinés aux tentatives d'isolement viral.

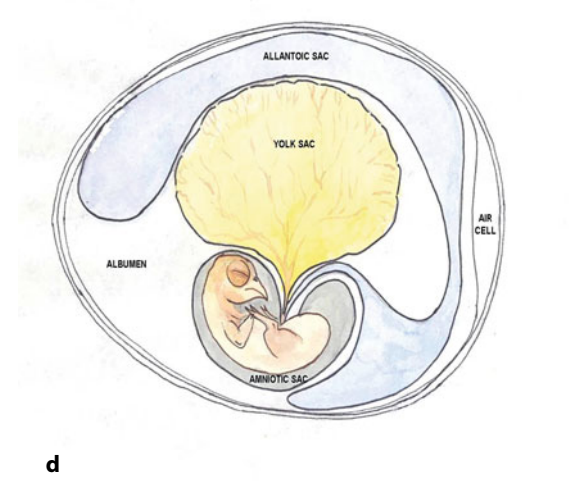
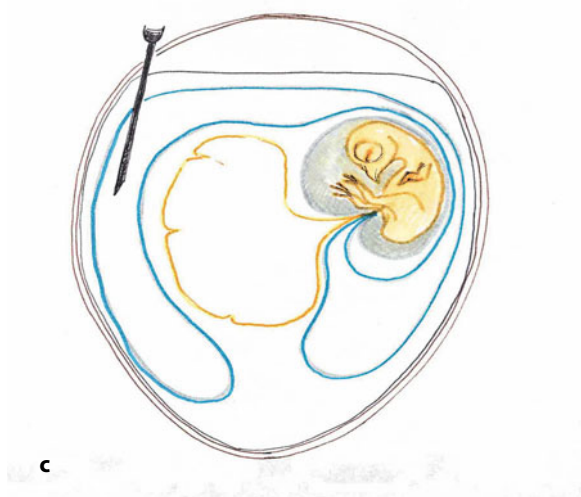


Fig. 7.2 a-d (a) Inoculation d'œufs EOPS destinés aux tentatives d'isolement viral. (b) Aiguille introduite dans la cavité allantoïdienne, au-dessus de la limite de la chambre à air (trait noir horizontal sur la coquille). (c) Œuf de poule embryonné : inoculation par voie allantoïdienne. (Avec l'aimable autorisation d'Amelio Meini.) (d) Schéma anatomique d'un œuf de poule embryonné après 9-10 jours d'incubation. (Avec l'aimable autorisation d'Amelio Meini.)

11. Le lendemain, ouvrir les œufs sous hotte à flux laminaire, en employant des techniques stériles.
Récouter environ 5 mL de liquide allantoïdien.
12. Tester l'activité HA du liquide allantoïdien par un « test HA rapide », comme indiqué ci-dessous.
13. Si aucune activité HA n'est détectée après le premier passage aveugle, utiliser le liquide allantoïdien non dilué, récolté à partir de ce passage, pour effectuer un second



Fig. 7.3 Scellage d'œufs EOPS destinés aux tentatives d'isolement viral.

- passage sur œufs embryonnés, comme indiqué ci-dessus.
14. La mortalité après 24 heures des œufs inoculés est généralement considérée non spécifique, bien que certains virus IAHP provoquent une mortalité de l'embryon dès 18 heures post-infection.
15. Si aucune activité HA n'est décelée après deux passages sur œufs, l'échantillon est considéré négatif.
16. Lorsque l'activité HA est détectée, la présence de bactéries doit être exclue par culture.
17. Si des bactéries sont présentes, les liquides doivent être passés dans un filtre à membrane pourvu de pores de 450 nm, additionnés d'un complément d'antibiotiques, puis inoculés dans des œufs embryonnés, comme indiqué ci-dessus.
18. Un échantillon donnant un résultat positif lors du test HA rapide doit faire l'objet d'analyses plus poussées.

Ces tests incluent le titrage de l'activité HA. Cette méthode permet la confirmation et l'évaluation de l'activité HA, conditions préalables à l'identification de l'agent hémagglutinant par le test IHA.

Si un laboratoire n'est pas en mesure d'effectuer le test IHA, le liquide allantoïdien hémagglutinant doit être expédié à un laboratoire de référence national ou international afin de confirmer le diagnostic.

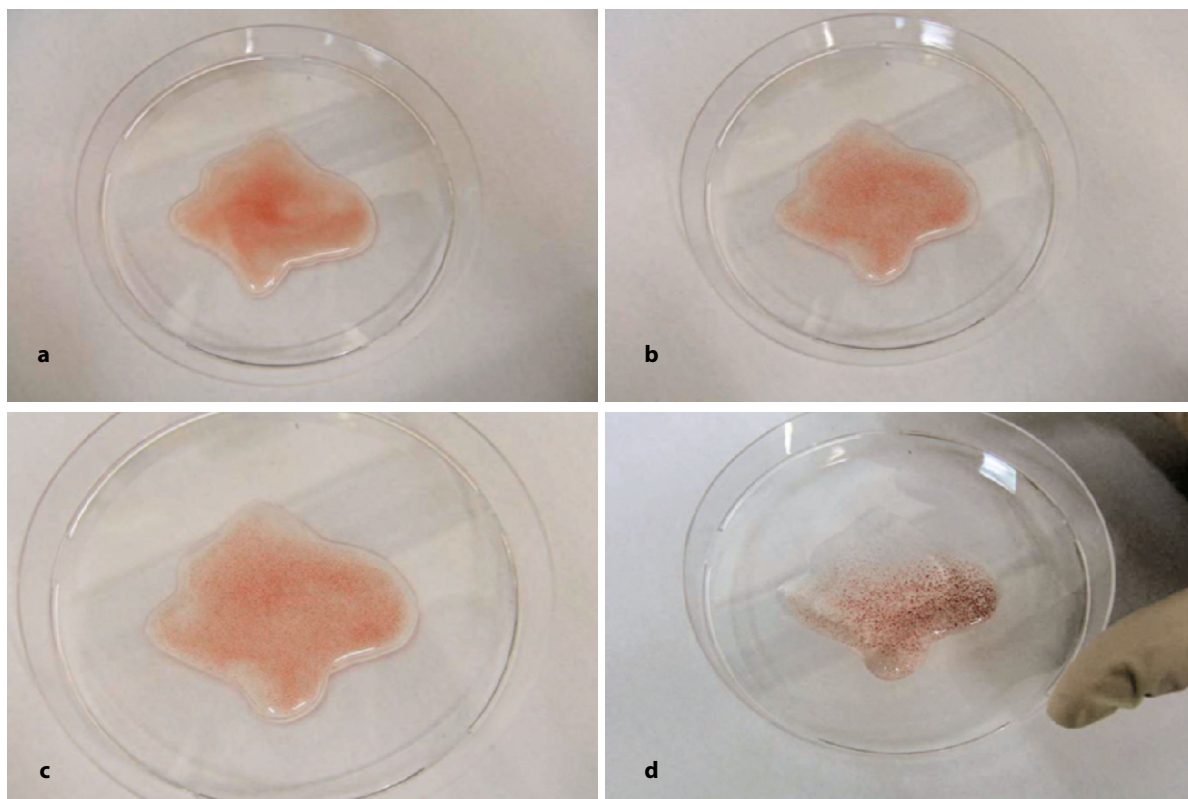


Fig. 7.4 a-d Réaction d'hémagglutination rapide. Temps d'incubation : 5 s (a), 10 s (b) 20 s (c) et 30 s (d).

7.2.2 Test d'hémagglutination sur boîte de Pétri (test HA rapide)

Cette méthode est basée sur la réaction entre l'activité HA du virus et les globules rouges (GR). Si la multiplication virale a bien eu lieu dans les œufs de poule EOPS embryonnés, le liquide allantoïdien contiendra des particules virales présentant une activité HA. Cette activité peut être mise en évidence par l'ajout d'une goutte de liquide allantoïdien à une goutte de suspension de GR ; il se produit une réaction visible à l'œil nu.

1. Placer une goutte de liquide allantoïdien sur une boîte de Pétri et ajouter une quantité équivalente de suspension de GR à 1 %.
2. Laisser se mélanger les deux liquides.
3. Attendre 30-60 secondes et rechercher la présence d'amas de GR (Fig. 7.4 a-d).

7.2.3 Caractérisation des virus de l'influenza aviaire

7.2.3.1 Test d'hémagglutination sur microplaque (test de micro-neutralisation)

1. Distribuer 0,025 mL de PBS dans chacun des puits d'une microplaque en plastique (puits à fond en V).
2. Déposer 0,025 mL de la suspension virale (c'est-à-dire du liquide allantoïdien) dans le premier puits.

3. Utiliser une micropipette multicanaux pour effectuer des dilutions au demi de la suspension virale (de 1/2 à 1/4096), sur l'ensemble de la plaque. Jeter les 0,025 mL restants.
4. Distribuer 0,025 mL de PBS dans chaque puits.
5. Distribuer 0,025 mL de GR à 1 % dans chaque puits.
6. Mélanger en tapotant doucement la plaque et la placer à 4 °C ou à température ambiante (20-24 °C).
7. Les plaques sont lues au bout de 30 min (à température ambiante) ou 40 min (à 4 °C), lorsque les GR témoins ont sédimenté en formant une pastille nette. Si l'activité HA est présente, elle apparaîtra sous forme d'une fine couche de globules rouges tapissant le fond du puits. En l'absence d'activité HA, les globules rouges se déposent au centre du puits en formant une pastille. Les échantillons sont lus en inclinant la plaque perpendiculairement à la paillasse, c'est-à-dire en la tenant verticalement, sur un fond blanc et en observant la présence ou l'absence d'une coulée de GR en forme de larme (Fig. 7.5).

Les puits contenant une activité HA ne présenteront pas de coulée. Dans les puits ne contenant pas d'activité HA, les globules rouges s'écouleront à la même vitesse que dans les puits témoins contenant uniquement des GR et du PBS.

Le titre HA de la suspension virale étudiée correspond à la dilution virale la plus élevée provoquant l'hémagglutination (absence de coulée).

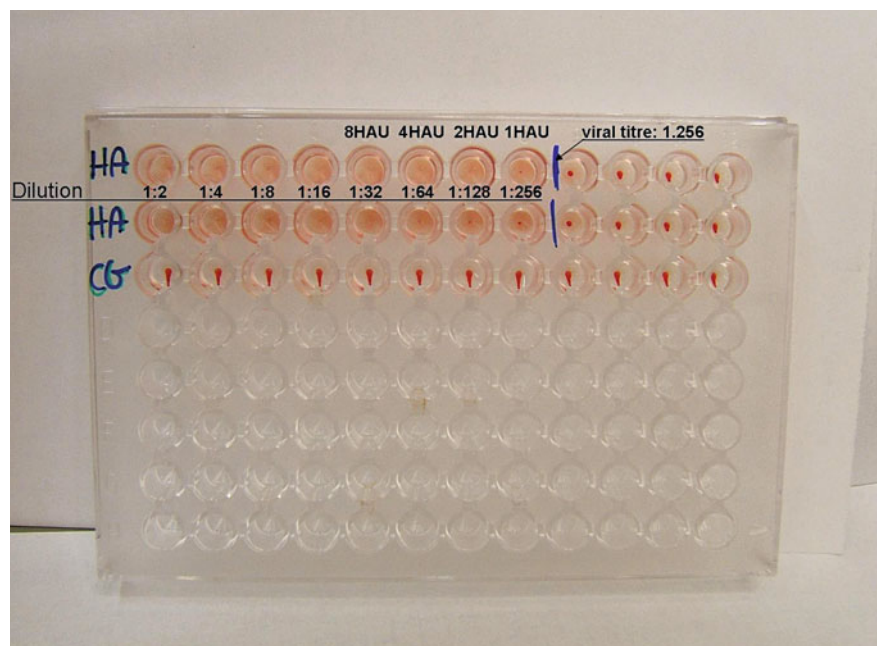


Fig. 7.5 Réaction d'hémagglutination sur microplaque.

Cette dilution est définie comme contenant une unité d'hémagglutination (UHA). Une solution titrée à 4 UHA, c'est-à-dire contenant quatre fois cette concentration virale, est généralement utilisée pour effectuer le test IHA permettant de définir le sous-type viral. Par exemple : si le titre HA obtenu est 1/512 (1 UHA), on obtient 4 UHA en divisant ce titre par 4 ($512 : 4 = 128$). Une dilution 1/128 du liquide allantoïdien hémagglutinant sera utilisée pour la préparation de la solution antigénique destinée au test IHA. Afin de déterminer avec exactitude la teneur en hémagglutinine, cette étape doit être effectuée à partir d'une fourchette étroite de dilutions initiales, c'est-à-dire 1/3, 1/5, 1/6 etc.

7.2.3.2 Test d'inhibition de l'hémagglutination (test IHA)

Cette méthode est basée sur la réaction entre le virus et un antisérum spécifique. Lorsque l'antisérum réagit avec le virus, il se lie aux déterminants antigéniques responsables de l'hémagglutination ; ces derniers ne seront donc pas disponibles pour se lier aux globules rouges. Si l'antisérum n'est pas spécifique du virus, l'hémagglutination indiquera la non-identité entre les deux réactifs.

Préparation des réactifs

- *Antisérum de référence* : reconstituer un flacon de sérum lyophilisé en y ajoutant 1 mL d'eau distillée stérile ou selon les instructions du fabricant. Préparer 16 antisérums dirigés contre tous les sous-types connus d'IA ainsi qu'un antisérum dirigé contre le virus de la maladie de Newcastle (MN). Les antisérums reconstitués et n'ayant pas été utilisés peuvent être divisés en fractions aliquotes qui seront conservées à -20°C .
- *Virus faisant l'objet de la caractérisation* : préparer la suspension virale à partir de 4 UHA, comme indiqué ci-dessus.

Protocole

1. Distribuer 0,025 mL de PBS dans tous les puits d'une microplaque de plastique comportant des puits à fond en V, sauf le premier puits de la rangée témoin (généralement H1-H6) à 4 UHA.
2. Déposer 0,025 mL de chaque antisérum de référence

dans les premiers puits de la première colonne de la plaque (A1-G1) et utiliser la dernière rangée (H) pour le titrage des 4 UHA et pour les GR témoins (Fig. 7.6).

3. Utiliser une micropipette multicanaux pour effectuer des dilutions au demi de tous les sérums sur l'ensemble de la plaque et éliminer les 0,025 mL restants.
4. Ajouter 0,025 mL de liquide allantoïdien dilué à 4 UHA, dans chaque puits situé entre les rangées A et G.
5. Dans les deux premiers puits de la dernière rangée (titre viral témoin égal à 4 UHA : H1-H6) de chaque plaque, distribuer 0,025 mL de liquide allantoïdien dilué à 4 UHA et faire des dilutions au demi entre le deuxième et le sixième puits (H2-H6). Éliminer les 0,025 mL restants.
6. Ajouter 0,025 mL de PBS dans tous les puits contenant le virus témoin et 0,5 mL de PBS dans les puits contenant les GR témoins (H7-H12).
7. Mélanger en tapotant doucement la plaque et la placer à $+4^{\circ}\text{C}$ pendant 40 min ou à température ambiante pendant 30 min.
8. Ajouter 0,025 mL de GR à 1 % dans tous les puits.
9. Mélanger en tapotant doucement la plaque et la placer à 4°C ou à température ambiante. Les plaques sont lues après 30-40 min, lorsque les GR témoins ont sédimenté. Cette étape est réalisée en maintenant la plaque perpendiculairement à la paillasse, c'est-à-dire en la tenant verticalement sur un fond blanc et en observant la présence d'une coulée en forme de larme s'écoulant à la même vitesse que celle des puits témoins contenant des GR.

Résultats

L'hémagglutination doit être observée dans les trois premiers puits témoins (H1-H3) à 4 UHA. Le quatrième puits doit présenter une hémagglutination partielle (soit une demi-goutte en forme de larme) et les puits H5 et H6 ne doivent comporter aucune hémagglutination. Les puits H1-H6 contiennent respectivement 4 UHA, 2 UHA, 1 UHA, 0,5 UHA, 0,25 UHA et 0,125 UHA.

Le virus est identifié par correspondance avec l'antisérum de référence qui inhibe son activité hémagglutinante. S'il y a identité, le titre de l'antisérum de référence contenant le virus étudié doit être égal à (ou \pm) 1 dilution du titre obtenu avec un antigène homologue (Ag) (voir Fig. 7.6).

Le témoin à 4 UHA permet de s'assurer qu'une quantité adéquate d'antigène a été utilisée pour le test.

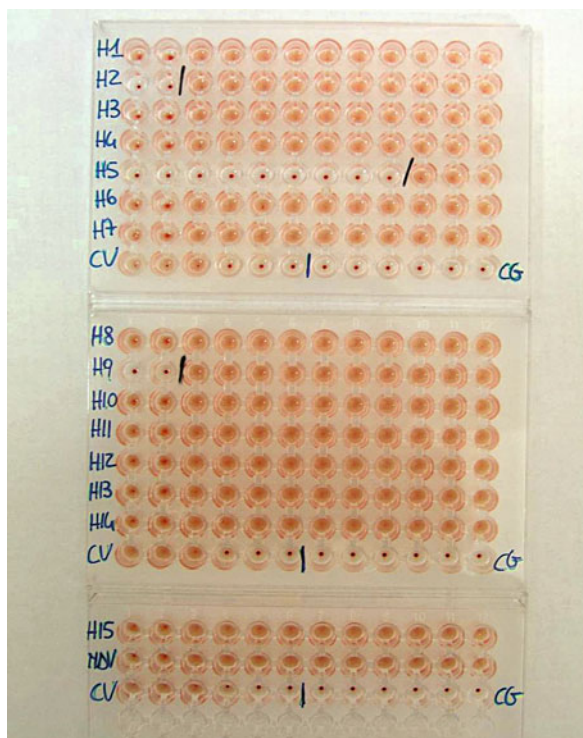


Fig. 7.6 Typage du virus de l'influenza aviaire par le test d'inhibition de l'hémagglutination. La souche a été identifiée comme appartenant au sous-type H5. Elle présente de faibles réactions croisées avec les antisérums H2 et H9. CV témoin contenant 4 unités HA ; CG GR témoins.

7.2.3.3 Test d'inhibition de la neuraminidase

Le test d'inhibition de la neuraminidase (IN) est réalisé en laboratoire et permet de caractériser le sous-type neuraminidase des virus de l'influenza. Le test est basé sur la réaction entre le sous-type viral inconnu et l'antisérum monovalent capable d'inhiber l'activité enzymatique de la neuraminidase. Neuf sous-types différents de neuraminidase d'influenza A sont connus (N1-N9) ; ils ont tous été associés à des isolats obtenus à partir d'oiseaux.

Cette méthode complexe est basée sur l'inhibition de l'activité de la protéine neuraminidase en présence d'antisérums monovalents dirigés contre chaque sous-type de neuraminidase. L'activité enzymatique de la neuraminidase est détectée par la libération d'acide N-acétyl neuraminique à partir du substrat fétuine. Par la suite, l'addition d'ions périodates entraîne l'oxydation de l'acide N-acétyl neuraminique en acide β -formyl pyruvique, alors que l'addition d'acide thio-barbiturique (ATB) produit un chromophore qui peut être extrait par du butanol acide. Les résultats peuvent

être lus par colorimétrie, à l'aide d'un spectrophotomètre ; la lecture optique est proportionnelle à l'activité neuraminidase de la préparation initiale. Seul l'antisérum dirigé spécifiquement contre le sous-type de neuraminidase du virus en cours de caractérisation inhibera l'activité enzymatique.

En pratique, si l'antisérum n'est pas spécifique de la neuraminidase, l'activité enzymatique est maintenue et il y a apparition d'une couleur rose. Si l'antisérum se lie spécifiquement à la neuraminidase, l'activité enzymatique est inhibée et le chromophore reste blanc (incolore).

Ce test ne doit être effectué qu'après avoir déterminé le sous-type HA du virus.

Sécurité

Le test IN libère des composés toxiques lors de l'immersion des tubes à essai dans l'eau bouillante. Cette étape doit donc être réalisée sous hotte aspirante et les laborantins doivent porter un masque de protection.

Équipement

- *Pipettes de 100 à 300 μ L*
- *Hotte à flux laminaire*
- *Incubateur à 37 ± 2 °C*
- *Bain-marie à 56-100 °C*
- *Spectrophotomètre (549 nm) (facultatif)*
- *Tubes à essai en plastique de 12×75 mm*
- *Tubes à essai en verre de 16×100 mm*
- *Seringues*
- *Bouchons en caoutchouc*
- *Portoir à pipettes*
- *Pipettes de 10 mL*

Réactifs pour le test d'inhibition de la neuraminidase

- *Antisérums dirigés contre chacun des neuf différents sous-types de neuraminidase. Les antisérums doivent être conservés à -20 °C*
- *Fétuine standard*
- *PBS 0,1 M (pH 5,9)*
- *Périodate de sodium 0,025 M dans 0,125 mL de NH_4SO_4*
- *Arsénite de sodium (NaAsO_2) à 2 % dans du HCl à 0,5 N*
- *ATB 0,1 M (pH 9,0)*
- *Mélange butanol-HCl à 5 %, 10 N (facultatif)*
- *Les instructions relatives à la préparation de ces solutions sont fournies dans l'Annexe 4.*

Protocole

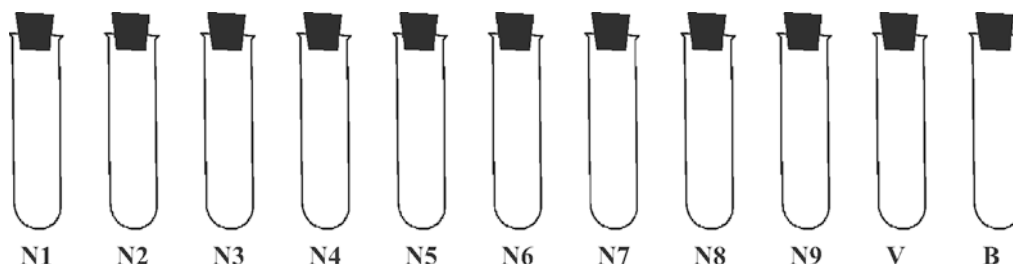
1. S'approvisionner en antisérums pour chacun des différents sous-types de neuraminidase (9 en tout). L'hémagglutinine des sérums doit être différente de celle des virus testés. Exemple : si le virus étudié est H7, il faut choisir les antisérums H1N1, H1N2, H5N3, H8N4, etc. Ne pas sélectionner des antisérums dirigés contre les virus H7.
2. Diluer les antisérums à 1/5 dans du PBS (pH 5,9).
3. Si le titre HA est $> 1/64$, diluer le virus à 1/5 dans du PBS (pH 5,9) ; si le titre HA est $\leq 1/64$, diluer le virus à 1/13.
4. Préparer les antisérums et l'échantillon comme indiqué dans le protocole ci-dessous.

une coloration brune qui disparaît ensuite. À ce stade, il est possible d'arrêter le test et de conserver les tubes à 4 °C.

14. Ajouter 2 mL d'ATB dans chaque tube. Agiter les tubes avec précaution pendant 20 s, afin de mélanger les réactifs.
15. Enlever le bouchon et immerger partiellement les tubes dans de l'eau bouillante (100 °C) pendant 7,5 min.

Résultats

Tubes contenant une solution de couleur rose = pas d'inhibition. L'antisérum utilisé n'est pas spécifique de la neuraminidase.



V virus témoin, N sous-type de neuraminidase, B blanc (réaction témoin)

5. Distribuer 100 µL de dilution d'antisérum dans chacun des tubes à essai en verre (antisérum anti-N1 dans le tube N1, antisérum anti-N2 dans le tube N2, etc.).
6. Ajouter 100 µL de dilution virale dans tous les tubes sauf le tube B (blanc).
7. Ajouter 100 µL de PBS (pH 5,9) dans le tube V (virus témoin) et 200 µL dans le tube B (réaction témoin).
8. Fermer hermétiquement chaque tube à l'aide de son bouchon et laisser incuber les tubes fermés à température ambiante pendant 30 min.
9. Ajouter 300 µL de fétuine standard dans chaque tube. Agiter les tubes avec précaution pendant 15 s, afin de mélanger les réactifs.
10. Fermer hermétiquement le tube à l'aide de son bouchon et laisser incuber à 37 °C pendant 16-20 h.
11. Ajouter 200 µL de périodate de sodium dans chaque tube. Agiter les tubes avec précaution pendant 15 s, afin de mélanger les réactifs.
12. Fermer hermétiquement chaque tube à l'aide de son bouchon et laisser incuber à 37 °C pendant 30 min.
13. Ajouter 200 µL d'arsénite de sodium dans chaque tube. Agiter les tubes avec précaution afin de mélanger les réactifs. Il se forme

Tubes contenant une solution incolore ou de couleur blanche par rapport au tube contenant le virus = inhibition totale. L'antisérum utilisé est spécifique de la neuraminidase.

Par exemple, si l'on obtient une solution blanche/incolore avec l'antisérum dirigé contre N2, alors la neuraminidase est de type N2 (Fig. 7.7).

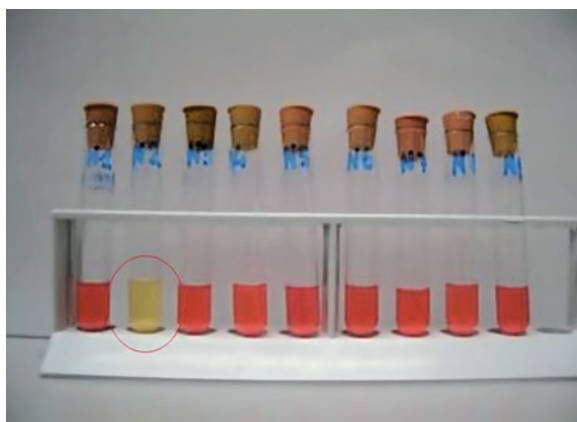


Fig. 7.7 Typage du virus de l'influenza aviaire par le test d'inhibition de la neuraminidase. La souche a été identifiée comme appartenant au sous-type N2 (cercle rouge).

7.2.3.4 Test de pathogénicité *in vivo*

Le test de l'index de pathogénicité par voie intraveineuse (IPIV) permet d'évaluer la virulence chez les poulets des virus influenza A isolés à partir d'oiseaux.

Réactifs et équipements

- *Liquide allantoïdien contenant le virus à évaluer.*
- *Solution saline isotonique stérile*
- *10 poulets EOPS ou indemnes d'anticorps spécifiques (SAN, pour specific antibody negative) âgés de 6 semaines*
- *Seringues de 1 mL*
- *Tubes à essai, coton*
- *Locaux confinés sous pression négative*
- *Nourriture, litière et eau potable*
- *Sacs jetables*

Protocole

1. À l'aide d'une solution saline isotonique stérile, diluer à 1/10 du liquide allantoïdien infectieux frais de titre HA > 1/16. Le liquide doit avoir subi le moins de passages possibles et provenir de préférence de la solution initiale, sans sélection préalable.
2. Injecter 0,1 mL de la dilution virale par voie intraveineuse, dans chacun des dix poulets EOPS ou SAN âgés de six semaines.
3. Les oiseaux sont observés toutes les 24 heures

pendant dix jours. Au cours de chaque observation, une note est attribuée à chaque oiseau : 0 pour un oiseau normal, 1 si l'oiseau est malade, 2 s'il est gravement malade et 3 lorsqu'il est mort.

La décision de juger l'oiseau « malade » ou « gravement malade » est une évaluation clinique subjective. Habituellement, les oiseaux « malades » présentent l'un des signes suivants et les oiseaux « gravement malades » au moins deux des signes suivants :

- *atteinte respiratoire ;*
- *abattement ;*
- *diarrhée ;*
- *cyanose des parties cutanées exposées et des caroncules ;*
- *œdème facial et/ou de la tête ;*
- *signes cliniques neurologiques.*

Les oiseaux morts doivent continuer à être notés 3 lors des observations quotidiennes suivantes. Pour le bien-être des animaux, les oiseaux qui sont trop malades pour manger ou boire doivent être sacrifiés humanement et être notés 3 lors de l'examen suivant, puisque la mort serait survenue 24 heures plus tard, en l'absence d'intervention. Cette démarche est acceptée par les autorités d'accréditation.

L'IPIV est la note moyenne par oiseau et par observation sur un intervalle de dix jours. Un index 3,00 signifie que tous les oiseaux sont morts dans les 24 heures. Un index 0,00 signifie qu'aucun oiseau n'a présenté de signes cliniques pendant la période d'observation de dix jours.

Une méthode simple d'enregistrement des résultats et de calcul des index est présentée dans l'exemple suivant :

Signes cliniques	Nombre de jours après l'inoculation										Nombre total de points
	Nombre de poulets présentant des signes spécifiques										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
État normal	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	$10 \times 0 = 0$
Malade	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	$6 \times 1 = 6$
Gravement malade	0	2	4	2	0	0	0	0	0	0	$8 \times 2 = 16$
Mort	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	$76 \times 3 = 228$
											TOTAL = 250/100
											IPIV = 2,50

10 oiseaux observés pendant 10 jours = 100 observations

Index = Note moyenne par oiseau et par observation = $250/100 = 2,50$.

Tout virus influenza A obtenant un IPIV > 1,2 est considéré comme étant un virus aviaire hautement pathogène (IAHP), indépendamment du sous-type auquel il appartient.

Données provenant de la décision de la Commission du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CE du Conseil 2005/94/CE (2006). *Journal Officiel des Communautés européennes* L 237/1-27.

7.3 Sérologie

7.3.1 Introduction

Les oiseaux sauvages et domestiques, ayant été infectés naturellement par les virus IA ou vaccinés contre ces derniers, produisent des anticorps détectables par des tests sérologiques. La réponse immunitaire des oiseaux envers les virus IA est dirigée contre les protéines immunogènes du virus. L'infection naturelle par les virus IA entraîne la production d'anticorps spécifiques à la fois du type (c'est-à-dire dirigés contre les antigènes appartenant au type A tels que la protéine de matrice (M) et la nucléoprotéine) et au sous-type (dirigés contre les protéines HA et N). La mise en place d'un protocole de diagnostic est donc indispensable, tout en gardant à l'esprit l'importance diagnostique du résultat. Les tests permettant de détecter des anticorps dirigés contre les antigènes de type A sont spécifiques d'un groupe, c'est-à-dire que la détection de ces anticorps indique que l'oiseau a été infecté (ou vacciné) par un virus influenza de type A appartenant à n'importe quel sous-type. Ces tests sont l'immuno-diffusion en gélose (IDG) et les méthodes immuno-enzymatiques (ELISA pour *enzyme-linked immunosorbent assay*), tous deux dirigés contre les protéines NP et/ou M.

Les anticorps spécifiques aux sous-types sont détectés par le test IHA et indiquent que l'infection (ou la vaccination) a eu lieu en présence d'un virus appartenant à un sous-type H spécifique. Le test IHA ne donne aucune indication du sous-type N auquel appartient le virus responsable de la réponse immunitaire, puisque les anticorps évalués par ce test ciblent uniquement l'hémagglutinine.

Le diagnostic sérologique de l'IA s'effectue généralement en deux étapes, à moins que le sous-type circulant dans une région donnée ne soit déjà connu. La première étape a pour objectif la détection d'anticorps dirigés contre tout virus IA. Elle est réalisée à l'aide des tests IDG ou ELISA. La deuxième étape est effectuée sur des échantillons qui se sont révélés positifs lors de la première étape. Elle permet de déterminer le sous-type viral responsable de l'infection.

7.3.1.1 Étape 1 : détection des anticorps dirigés contre l'antigène de groupe (du type A)

Ces tests permettent de détecter les anticorps dirigés contre l'antigène de groupe des virus influenza de type A. La réaction anticorps-antigène est dirigée

contre les protéines virales M ou NP. Ces antigènes sont présents chez tous les virus influenza de type A, indépendamment du sous-type H ou N auquel ils appartiennent. La positivité sérologique à ces tests indique que les oiseaux ont été en contact avec un virus influenza de type A. Mais aucune information ne peut être déduite quant au sous-type de l'IA responsable de la séroconversion.

Remarque : chez les oiseaux aquatiques (sauvages et domestiques), la positivité sérologique envers le type A est une constatation fréquente.

Test d'immunodiffusion en gélose (IDG).

Ce test est simple et efficace pour les sérums de poulet et de dinde. Il est très spécifique mais a une sensibilité limitée. Il doit donc être utilisé en tant qu'outil de diagnostic à l'échelle du lot. Il peut être effectué dans n'importe quel laboratoire comportant un équipement de base.

Il n'est absolument pas fiable chez les oiseaux aquatiques car ces oiseaux ne produisent pas d'anticorps précipitants. Il n'a pas été validé pour d'autres espèces aviaires.

Méthodes immuno-enzymatiques (ELISA)

Ce test nécessite des équipements de laboratoires plus sophistiqués, dont un spectrophotomètre. Il a une sensibilité élevée mais manque de spécificité. Les tests ELISA dits indirects nécessitent un soin particulier afin de s'assurer que l'anticorps secondaire du test (anti-espèce) soit bien dirigé contre l'espèce étudiée. Les tests ELISA compétitifs présentent l'avantage de permettre l'examen de sérum provenant de n'importe quelle espèce. Il est nécessaire de suivre les instructions fournies par le fabricant du test et il faut éviter d'émettre des hypothèses quant à la réactivité du test envers d'autres espèces que celles mentionnées dans les spécifications du kit.

7.3.1.2 Étape 2 : détection d'anticorps spécifiques d'un sous-type donné (sous-type H)

Ce test est utilisé chez les oiseaux dont on sait qu'ils ont été infectés par le virus IA, soit suite à la positivité du test sérologique dirigé contre le groupe (antigène de type A), soit d'après les antécédents cliniques. Le test permet d'identifier le sous-type d'hémagglutinine du virus responsable de la séropositivité. Le test IHA est utilisé à cette fin. Il peut présenter une faible

réactivité croisée envers d'autres sous-types H, due à l'homologie avec l'antigène de la neuraminidase. Cette réactivité croisée est généralement inférieure à 1/16 (2^4) et disparaît en présence d'un autre antigène contenant un sous-type différent de neuraminidase. Par exemple : un échantillon de sérum est positif pour H9N2 lorsque le titre est de 1/256 (2^8). S'il est testé contre l'antigène H5N2, une inhibition positive est observée à 1/8 (2^3). S'il est testé contre l'antigène H5N9, l'échantillon sera négatif.

7.3.2 Test d'immunodiffusion en gélose (IDG)

Ce test est utilisé couramment et régulièrement pour détecter la présence d'anticorps dirigés contre le virus influenza de type A dans les sérums d'oiseaux. Étant très spécifique mais de sensibilité limitée, il est utilisé en tant qu'outil de diagnostic à l'échelle du lot. Les anticorps dirigés contre les virus de l'influenza A sont détectés par l'apparition de lignes de précipitation produites par la formation du complexe immunitaire qui s'établit entre les anticorps contenus dans les antisérums et l'antigène de référence.

7.3.2.1 Préparation des boîtes d'agar

1. Dissoudre 8 g de NaCl dans 100 mL d'eau distillée, dans un flacon jaugé.

2. Ajouter 1,25 g d'agar noble et mélanger doucement.
3. Faire fondre l'agar en immergeant le flacon dans un bain-marie bouillant, jusqu'à ce que l'agar soit complètement dissous.
4. Transférer 15 mL de la solution d'agar dans chacune des boîtes de Pétri de 90 mm.
5. Laisser reposer les boîtes ouvertes afin que l'agar refroidisse à température ambiante.
6. Étiqueter la pile de boîtes d'agar en notant la date de fabrication sur chaque couvercle et fermer hermétiquement les boîtes dans un sac en plastique hermétique. Les boîtes d'agar peuvent être conservées à l'envers (pour éviter la condensation de gouttelettes d'eau à l'intérieur des couvercles) à 4 °C et jusqu'à 15 jours.

7.3.2.2 Protocole du test

1. Noter les numéros d'identification des échantillons sur les boîtes.
2. Creuser des puits dans l'agar à l'aide d'un emporte-pièce comme l'indiquent les figures 7.8 et 7.9. Enlever les morceaux d'agar à l'aide d'une pointe en acier ou d'une pipette Pasteur reliée à une pompe à vide.
3. Placer 30 µL d'antigène dans le puits central.
4. Ajouter 30 µL d'antisérum positif (S+) dans deux puits diamétralement opposés (Fig. 7.8, 7.9).
5. Placer 30 µL du sérum à examiner (SE) dans chacun des puits restants. La disposition des



Fig. 7.8 Test de précipitation en gélose. Ag antigène de référence, S+ sérum positif, SE sérum étudié.

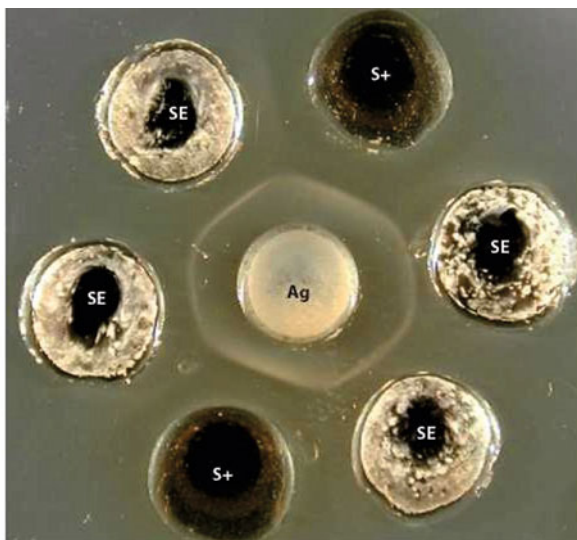


Fig. 7.9 Test de précipitation en gélose : Ag antigène de référence, S+ sérum positif, SE sérum étudié.

réactifs assure que chaque SE est adjacent à un puits contenant un sérum positif S+ et à un autre puits contenant l'antigène.

6. Laisser incuber les boîtes dans une chambre humide et à température ambiante, pendant 48 h.

7.3.2.3 Interprétation des résultats

1. Quarante-huit heures après l'incubation, lire les boîtes en les plaçant au-dessus d'une source de lumière diffuse.
2. Le test est valable lorsqu'une ligne de précipitation est observée entre les puits contenant le sérum positif et le puits central contenant l'antigène (Figs. 7.8, 7.9).
3. L'échantillon est positif lorsqu'une ligne de précipitation est observée entre le puits contenant le sérum à tester et le puits central contenant l'antigène. La ligne doit prolonger celle formée entre le sérum positif et l'antigène (c'est-à-dire montrer une identité avec cette dernière).
4. L'échantillon est négatif en l'absence d'une ligne de précipitation entre le puits contenant le SE et le puits central contenant l'antigène.

7.3.3 Méthodes immuno-enzymatiques (ELISA) permettant la détection d'anticorps dirigés contre le virus de l'influenza aviaire de type A

Le test ELISA est un test sensible qui peut être utilisé dans les dépistages sérologiques. Une variété de kits différents est maintenant disponible sur le marché, ce qui permet de détecter la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines NP et M des virus IA. Les instructions du fabricant du kit doivent être suivies à la lettre.

7.3.4 Détection des sous-types d'anticorps spécifiques à l'aide du test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

Cette méthode est basée sur la réaction entre un virus hémagglutinant et un antisérum contenant des anticorps spécifiques de ce virus. Lorsque le virus hémagglutinant est incubé en présence de l'anticorps spécifique, l'activité HA naturelle du virus

est inhibée. Ce phénomène peut être visualisé par l'ajout d'une suspension de GR dans le puits. Ces derniers sédimentent en formant une pastille.

Le test IHA étant à la fois qualitatif et quantitatif, il nécessite l'utilisation d'une quantité d'antigène déterminée correspondant, dans la plupart des cas, à 4 unités HA.

7.3.4.1 Préparation des suspensions de GR destinés aux tests HA et IHA

Les tests réalisés sur les sérums de poulets requièrent une suspension de GR à 1 % alors que le prétraitement des sérums provenant d'espèces autres que les poulets nécessite une suspension de GR à 10 %. Des réactions non spécifiques peuvent se produire au cours du test IHA. Elles sont dues à la présence d'hémagglutinine non spécifique dans le sérum des espèces autres que les poulets. Pour éviter ces réactions, les sérums ne provenant pas de poulets sont prétraités avec des globules rouges de poulets afin d'éliminer l'hémagglutinine non spécifique.

Protocole

1. Collecter 5 mL de sang à partir d'au moins trois poulets EOPS, à l'aide d'une seringue contenant suffisamment de solution d'Alsever pour obtenir une proportion 1/1.
 2. Rassembler les contenus des seringues et centrifuger la suspension de sang à 1 000 g pendant 10 min. Éliminer la solution d'Alsever ou le surnageant.
 3. Laver les GR deux fois dans du PBS en les centrifugeant à 1 000 g pendant 10 min après chaque lavage.
 4. Le surnageant est enlevé à la pipette et le culot de globules rouges est utilisé pour préparer une suspension de concentration appropriée pour un test donné. La suspension peut être conservée à 4 °C pendant sept jours.
- Suspension de GR à 10 % : préparer 9 mL de PBS contenant 0,05 % d'albumine bovine et y ajouter 1 mL du culot de globules rouges.

Suspension de GR à 1 % : préparer 99 mL de PBS contenant 0,05 % d'albumine bovine et y ajouter 1 mL du culot de globules rouges. Le pourcentage correct doit être vérifié à l'aide d'une des méthodes suivantes.

7.3.4.2 Calcul de la concentration en GR

Méthode spectrophotométrique

Cette méthode permet de calculer la concentration en GR de manière indirecte, en dosant le taux d'hémoglobine de la solution.

1. Placer deux cuves contenant chacune 3,6 mL d'eau distillée et 0,4 mL de la suspension destinée à être lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 545 nm.
2. Une solution de PBS contenant 0,05 % d'albumine est utilisée comme solution de référence et sert de blanc.
3. Une suspension de GR à 1 % doit avoir une densité optique (DO) de 0,250 nm \pm 0,010.

Microhématocrite

L'hématocrite peut être mesuré manuellement par centrifugation.

1. Remplir de sang un tube capillaire standard à microhématocrite et en fermer hermétiquement l'extrémité inférieure.
2. Centrifuger le tube à 10 000 rpm pendant 5 min. Les globules rouges étant les éléments les plus lourds, ils sont concentrés au fond du tube.

3. Mesurer la hauteur de la colonne de GR en pourcentage de la colonne de sang totale. Plus la colonne de GR est haute, plus l'hématocrite et le pourcentage sont élevés.

Cellules de numération

Peuvent être utilisées les cellules de Thoma, de Burker ou de Malassez. Pour chacune de ces cellules, 75 à 80 millions de GR/mL correspondent à une concentration de 1 %.

7.3.4.3 Test d'inhibition de l'hémagglutination pour les sérums de poulets

Réactifs

- PBS
- PBS et albumine (PBS/albumine 0,05 %)
- Antigène de référence lyophilisé dilué dans du PBS afin d'obtenir 4 UHA/0,025 mL
- Suspension de GR de poulet (1 %)
- Sérum de poulet servant de témoin négatif
- Sérum de poulet servant de témoin positif
- Remarque : les sérums de référence reconstitués doivent être conservés à -20°C et les antigènes de référence reconstitués, à -80°C .

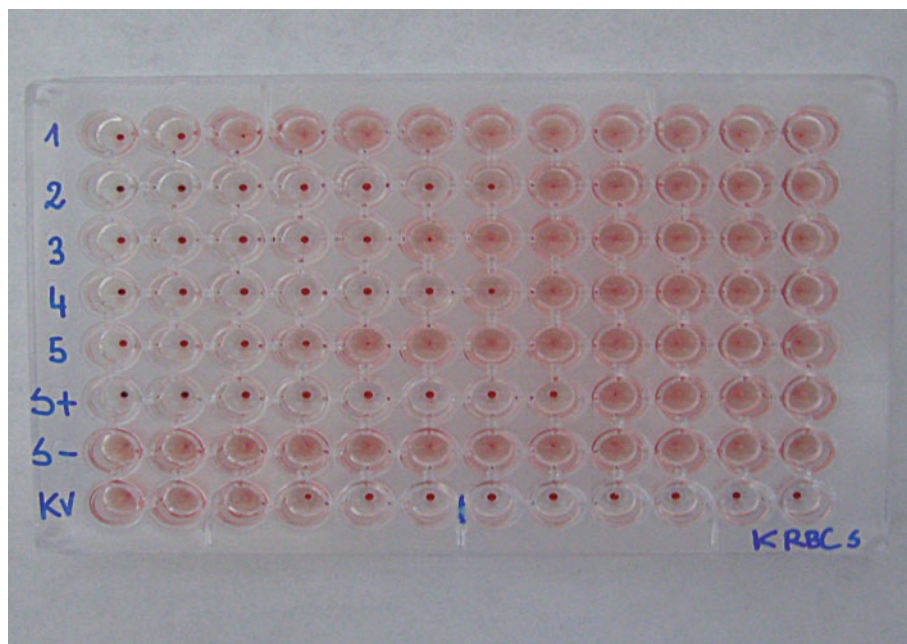


Fig. 7.10 Test d'inhibition de l'hémagglutination. A1-A5 sérums tests, S- sérum négatif, S+ sérum positif ; la dernière rangée correspond au témoin à 4 unités HA (KV) et les six derniers puits contiennent les GR témoins (KRBCS).

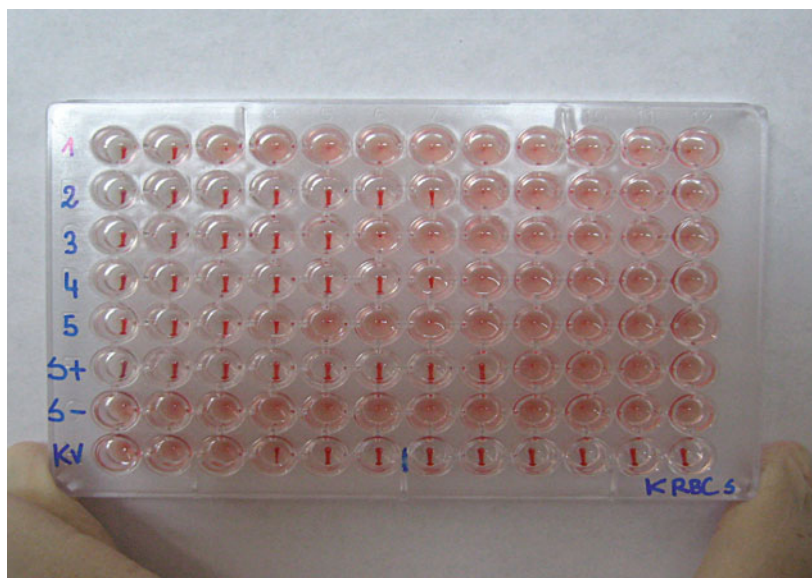


Fig. 7.11 Test d'inhibition de l'hémagglutination. A1-A5 sérums tests, S- sérum négatif, S+ sérum positif ; la dernière rangée correspond au témoin à 4 unités HA (KV) et les six derniers puits contiennent les GR témoins (KRBCS). Même plaque que celle de la figure 7.10, en position inclinée.

Protocole

1. Distribuer 0,025 mL de PBS dans tous les puits d'une microplaque de plastique, à l'exception du puits destiné à l'IHA.
2. Distribuer 0,025 mL de sérum dans les premiers puits de la microplaque (colonne 1). Ajouter au puits F1, 0,025 mL de sérum témoin positif (dont le titre IHA est connu) et ajouter 0,025 mL de sérum témoin négatif au puits G1. Idéalement, les sérums témoins sont inclus dans chaque plaque ou chaque lot de dix plaques. Le témoin à 4 UHA et les GR témoins doivent être inclus dans chaque plaque.
3. Utiliser une micropipette multicanaux pour effectuer des dilutions au demi des sérums, sur l'ensemble de la plaque (A1-A12). Éliminer les 0,025 mL restants.
4. Ajouter 0,025 mL de la suspension d'antigène à 4 UHA, sur l'ensemble de la plaque, à l'exception de la rangée H.
5. Ajouter 0,025 mL de la suspension à 4 UHA dans les deux premiers puits de la rangée H, puis effectuer des dilutions au 1/2 de H2 à H6 (éliminer les 0,025 mL restants) afin d'obtenir 4, 2, 1, 0,5, 0,25 et 0,125 UHA. Les puits H1-H6 contiennent le titre témoin à 4 UHA.
6. Ajouter 0,025 mL de PBS contenant 0,05 % d'albumine dans tous les puits de la rangée H.
7. Mélanger en tapotant doucement. Placer la plaque à 4 °C pendant 40 min ou à température ambiante pendant 30 min.
8. Ajouter 0,025 mL d'une suspension de GR à 1 % dans tous les puits.
9. Mélanger en tapotant doucement. Mettre la plaque à incuber à 4 °C pendant 40 min ou à température ambiante pendant 30 min.
10. Lire les plaques après 30-40 min, lorsque les GR témoins ont sédimenté. Cette étape est réalisée en maintenant la plaque en position verticale et en notant la présence ou l'absence de coulée de globules rouges en forme de larme, s'écoulant à la même vitesse que dans les puits contenant seulement des globules rouges (0,025 mL) et seulement du PBS (0,05 mL) (Fig. 7.10, 7.11). Le titre IHA correspond à la dilution de sérum la plus élevée provoquant l'inhibition complète de l'hémagglutination.

Interprétation des résultats

1. Le test est valable si :
 - le titre du *sérum témoin négatif* est inférieur à 2^3 ;
 - le titre du *sérum témoin positif* correspond au titre annoncé ou se situe à une dilution près du titre annoncé ;
 - l'hémagglutination complète est observée dans les trois premiers puits (H1-H3) de la rangée témoin à 4 UHA (contenant respectivement 4, 2, et 1 UHA).
2. L'échantillon est considéré négatif si le titre IHA est $\leq 1/8$. Cela signifie que le sérum ne contient pas d'anticorps spécifiques à ce sous-type de virus IA.
3. L'échantillon est considéré positif si le titre IHA est $\geq 1/16$. Cela signifie que le sérum contient des anticorps spécifiques à ce sous-type de virus IA.

7.3.4.4 Test d'inhibition de l'hémagglutination pour les espèces autres que les poulets

Des réactions non spécifiques apparaissent souvent avec l'utilisation d'échantillons de sérum provenant d'oiseaux autres que les poulets. Les sérums doivent être prétraités comme indiqué ci-dessous.

Prétraitement des sérums

1. Distribuer 0,050 mL de PBS dans les puits de la première colonne de la microplaque (puits A1-E1).
2. Laisser la deuxième rangée vide (A2-E2).
3. Distribuer 0,025 mL de PBS dans tous les autres puits de la microplaque.
4. Ajouter 0,050 mL des sérums à tester dans les premiers puits de la microplaque (colonne 1).
5. Ajouter 0,050 mL d'une suspension de GR à 10 % dans les premiers puits (colonne 1).

6. Laisser incuber la plaque pendant 30-40 min à température ambiante et attendre que la suspension de globules rouges décante.
7. Transférer 0,025 mL de surnageant, des puits de la première colonne vers les puits de la deuxième colonne.
8. Transférer encore 0,025 mL de surnageant, des puits de la première colonne vers les puits de la troisième colonne. Effectuer des dilutions au 1/2 des sérums, de la troisième à la dernière colonne (12). Éliminer les 0,025 mL restants.
9. Les sérums sont à présent prêts à être traités de la même façon que les sérums de poulet. La colonne 1 doit être exclue du test.

Avant de les tester, il est également recommandé d'inactiver les agents hémagglutinants non-spécifiques contenus dans le sérum des gibiers à plumes (faisans, perdrix, etc.) et dans celui des cailles, des autruches et des pintades, par un traitement à la chaleur dans un bain-marie à 56 °C, pendant 30 min.

8.1 Introduction et terminologie de base pour les tests de diagnostic moléculaire

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation de méthodes fondées sur la technologie moléculaire a connu un progrès important ; des tests de laboratoire sont à présent disponibles pour l'identification et la caractérisation des virus de l'influenza aviaire (IA). Ces tests peuvent être utilisés pour la détection directe du génome viral de l'IA à partir d'échantillons cliniques, ainsi que la production de données concernant les caractéristiques moléculaires d'un isolat ou de l'ARN viral présents dans un échantillon prélevé sur un animal contaminé. Par ailleurs, les définitions actuelles de l'IA hautement pathogène (IAHP) (CE 2006 ; OIE 2004) sont fondées sur les résultats obtenus par des techniques à la fois conventionnelles et moléculaires. Ces dernières font donc partie des méthodes officielles utilisées pour détecter la présence de facteurs de virulence et pour confirmer la présence de virus IAHP dans les échantillons de laboratoire.

8.1.1 PCR après transcription inverse (RT-PCR)

La plupart des méthodes de détection moléculaire des virus IA sont fondées sur la transcription inverse (RT pour *Reverse Transcription*) de l'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc est ensuite amplifié par la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR pour *Polymerase Chain Reaction*). Le processus entier est donc appelé RT-PCR.

Les protocoles classiques de RT-PCR peuvent être appliqués directement sur des échantillons cliniques. Ces protocoles comportent une étape d'amplification par RT-PCR suivie d'une électrophorèse en gel des produits amplifiés. Selon les séries

d'amorces utilisées, il est possible d'identifier le type ou le sous-type du virus (type A et sous-types H5 et H7). L'ADNc amplifié peut aussi être séquencé directement, ce qui permet une caractérisation et un pathotypage opportuns du virus identifié. L'introduction récente des techniques de RT-PCR en temps réel (rRT-PCR) pour la détection d'ARN IA, ont conduit à une méthode plus rapide, plus sensible et parfois plus spécifique pour la détection du génome viral dans les échantillons cliniques.

8.2 RT-PCR en une et deux étapes

Les transcriptases inverses requises pour la transcription inverse de l'ARN en ADNc sont généralement obtenues à partir de rétrovirus. La RT-PCR peut être effectuée en une ou deux étapes.

Dans le cas de la RT-PCR en deux étapes, la molécule d'ARN est d'abord transcrite en ADNc, à l'aide d'oligomères aléatoires, d'amorces oligo-dT ou d'une amorce spécifique de la cible. La réaction est effectuée dans un tube distinct et dans des conditions distinctes. Une partie aliquote de la réaction RT est ensuite ajoutée à la PCR en vue de l'amplification de l'ADNc. Les oligomères aléatoires ou les amorces oligo-dT permettent la transcription de la totalité de l'ARN présent dans l'échantillon, de telle sorte que la même partie aliquote d'ADNc peut être utilisée pour effectuer plusieurs PCR, avec des cibles différentes.

Dans le cas de la RT-PCR en une étape, la transcription inverse et la PCR sont effectuées dans le même tube. Ceci est possible grâce à des conditions particulières de chimie et du processus cyclique. Dans ce cas, seules des amorces spécifiques de la cible sont utilisées, que ce soit pour la RT ou pour la PCR. Cette méthode est plus rapide que la méthode en deux étapes et permet de diminuer le nombre de manipulations, ainsi que de minimiser le risque de contamination de l'échantillon.

Le tableau ci-dessous (Tableau 8.1) présente un résumé des avantages de chacune de ces méthodes.

Tableau 8.1 Avantages des réalisations, en une et deux étapes, de la transcription inverse (RT) et de l'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

RT-PCR en deux étapes	RT-PCR en une étape
PCR multiples à partir d'une seule réaction RT	Manipulation facile
Flexibilité dans le choix des amorces destinées à la RT	Protocoles rapides
Conservation de l'ADNc à long terme	Bonne reproductibilité et faible risque de contamination

8.3 Extraction de l'ARN à partir d'échantillons cliniques et de laboratoire

Le génome viral de l'influenza est constitué d'un ARN simple brin de polarité négative, obtenu à partir d'animaux contaminés, ou par des méthodes de culture en laboratoire. Il peut être extrait de divers échantillons animaux (sang, organes, tissus, fèces, écouvillons, etc.). L'ARN est une molécule instable et la RNase (l'enzyme dégradant l'ARN) est quasiment ubiquitaire (voir Tableau 8.2). Il est important de porter des gants jetables pour manipuler l'ARN et d'utiliser du matériel jetable, tel que des cônes et des tubes de réaction certifiés exempts de RNase. Bien que l'eau distillée soit généralement exempte de RNase, l'utilisation de DEPC (diéthylpyrocarbonate, voir ci-dessous) ou d'eau exempte de RNase est également fortement recommandée. On recommande par ailleurs l'utilisation de réactifs prêts à l'emploi et exempts de RNase. Pour une conservation à long terme, la congélation à -80°C dans de l'azote liquide permet d'empêcher la dégradation des échantillons.

Dans les laboratoires de diagnostic modernes, l'ARN est extrait à l'aide de kits disponibles dans le commerce. Les principaux avantages de ces kits commerciaux sont les suivants :

- utilisation de protocoles standardisés ;
- débit d'échantillon élevé et possibilité d'automatisation du protocole d'extraction ;
- permet de gagner plus de temps et est moins laborieux que les protocoles manuels classiques ;
- utilisation de volumes moins importants ;
- pureté des réactifs.

La principale contrainte est le coût relativement élevé du kit.

Les méthodes classiques d'extraction manuelle au phénol et à la guanidine peuvent également être utilisées pour extraire l'ARN viral. Cette technique peut s'avérer plus efficace pour l'extraction de l'ARN à partir d'échantillons dont on sait qu'ils produisent peu d'ARN, notamment les tissus fibreux. Les sels de guanidine sont des inhibiteurs efficaces de la RNase. Du reste, les méthodes manuelles sont moins coûteuses que les kits d'extraction prêts à l'emploi, bien qu'elles demandent plus de travail et comportent un risque accru de contamination, affectant les applications en aval (telles que la PCR en temps réel). Les méthodes demandant beaucoup de travail sont évidemment moins appropriées au traitement de grandes quantités d'échantillons.

L'extraction d'ARN est une procédure délicate dont le succès influence les étapes ultérieures du diagnostic moléculaire. Les erreurs commises à ce stade engendrent des résultats incohérents ou peu fiables (faux négatifs et faux positifs).

Tableau 8.2 Principales sources de contamination par la RNase

Origine	Remarques
Rnases endogènes	Tout échantillon de tissus contient des RNases endogènes. Après avoir été prélevés, les tissus doivent être immédiatement conservés dans de l'azote liquide ou dans un milieu de conservation particulier. Au cas contraire, ils doivent être immédiatement placés dans des solutions salines chaotropes (tampons de lyse inclus dans la plupart des kits commerciaux).
Surfaces corporelles	La peau, la microflore bactérienne et les fluides corporels tels que la sueur ont une activité RNase importante. Toujours porter des gants durant les activités de laboratoire.
Surfaces du laboratoire	La contamination environnementale par les cellules provenant de la peau humaine, des bactéries, des champignons ou des spores de champignons, entraîne la présence d'une activité RNase sur les paillasses ainsi que sur les ustensiles en plastique et en verre exposés dans le laboratoire. Le matériel traitable peut être nettoyé à l'eau de Javel ou à l'aide de produits spéciaux disponibles dans le commerce.

Cônes et tubes	Les cônes et les tubes autoclavés peuvent demeurer une source de contamination puisque ces enzymes sont très stables et peuvent réacquies une activité partielle après un refroidissement à température ambiante. Toujours utiliser des cônes et des tubes testés et certifiés exempts de RNase.
Eaux et tampons	L'eau et les tampons, généralement utilisés pour préparer les solutions de laboratoire, peuvent constituer une source de RNase. Traiter la solution au DEPC à 0,05-0,1 % ou utiliser des réactifs certifiés exempts de RNase. Le DEPC est un cancérigène potentiel. Toujours porter des gants et manipuler le DEPC sous une hotte aspirante appropriée.
Conservation de l'ARN	La présence de traces de RNase dans les échantillons d'ARN peut entraîner une dégradation au cours de la conservation, même à basses températures. La méthode la plus efficace de conservation à long terme de l'ARN isolé (c'est-à-dire plus d'une année à -80 °C) est la conservation de l'ARN sous forme de précipité, dans une solution de précipité de sels et l'alcool. Autrement, des solutions permettant de protéger l'ARN au cours de la conservation, sont disponibles dans le commerce.

DEPC, diéthylpyrocarbonate

8.3.1 Inactivation de la RNase par traitement au DEPC

Remarque : Le DEPC est un cancérigène potentiel. Toujours porter des gants et manipuler sous une hotte aspirante appropriée.

Le diéthylpyrocarbonate réagit avec les résidus histidine des protéines et inactive les RNases.

1. Ajouter aux solutions du DEPC à 0,05-0,1 % (par exemple, 0,5-1 mL de DEPC pour 1 L de solution) ;
2. Remuer ou agiter la solution et laisser incubé pendant plusieurs heures.
3. Autoclaver pendant au moins 45 minutes, afin d'inactiver le DEPC restant.

Remarque : Les composés contenant des groupements aminés primaires tels que le Tris, réagissent avec le DEPC. Le Tris doit être ajouté à la solution, uniquement après la fin du traitement au DEPC.

Remarque : Des concentrations élevées en DEPC ou en sous-produits du DEPC peuvent inhiber les réactions de translation *in vitro* ou endommager l'ARN.

8.3.1 Protocoles de précipitation destinés à la purification partielle et à la concentration de l'ARN

8.3.1.1 Précipitation à l'éthanol (Protocole IZSve)

1. Ajouter 1/10^e du volume de NaOAc 3M (pH 5,2) à la solution d'acide nucléique que l'on souhaite précipiter.
2. Ajouter 2,5 volumes d'éthanol froid à 95 %.
3. Placer à -20 °C pendant au moins 30 minutes.
4. Centrifuger à 13 000 tpm, à une température de + 4 °C et pendant 30 minutes, puis éliminer le surnageant.
5. Ajouter de l'éthanol à 70 % (soit environ quatre fois le volume de l'échantillon initial) et centrifuger à nouveau à 13 000 tpm pendant 10 minutes ; éliminer le surnageant
6. Ajouter 50 mL d'éthanol à 100 % (soit environ le même volume que celui de l'échantillon initial) ;
7. L'ARN peut alors être récupéré par centrifugation à 13 000 tpm pendant dix minutes. Après la précipitation, éviter le séchage complet du culot d'ARN, car cela pourrait rendre difficile la remise en suspension de l'ARN. L'ARN est remis en suspension dans de l'eau distillée ou du tampon TE exempt de RNase.

Pour des concentrations en ARN < 10 ng/mL, l'addition d'acide nucléique transporteur ou de glycogène traité à la DNase permet de faciliter la précipitation et de maximiser la récupération de l'ARN.

8.3.1.2 Précipitation au chlorure de lithium (LiCl) (Protocole d'Ambion)

Ce protocole permet la précipitation de l'ARN seul, alors que les hydrates de carbone, les protéines et l'ADN restent en suspension. Le LiCl est souvent utilisé pour éliminer les inhibiteurs de translation qui sont co-purifiés avec l'ARN, lorsque ce dernier est préparé par d'autres techniques.

1. Ajouter du LiCl 4M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) et EDTA 10 mM à volumes égaux, pour une concentration finale de LiCl de 2 M.

2. Faire précipiter l'ARN à -20°C . Le temps d'incubation à -20°C dépend de la concentration en ARN. En règle générale, il est prudent de laisser précipiter l'ARN pendant plusieurs heures et même jusqu'au lendemain.
3. Récupérer l'ARN par centrifugation.
4. Laver le culot d'ARN avec de l'éthanol à 70 %, afin d'éliminer les traces de LiCl (facultatif). Pour des résultats optimaux, la concentration en ARN doit être $\geq 200\ \mu\text{g/mL}$.

8.4 L'amplification en chaîne par polymérase

La PCR est une méthode particulièrement sensible d'amplification d'une séquence spécifique d'ADN. Le principe de la PCR est simple : un fragment spécifique d'ADN est synthétisé de manière répétitive à l'aide de l'enzyme ADN polymérase I provenant de la bactérie *Thermus aquaticus* (Taq). Cet organisme vit dans les sources d'eau chaude et beaucoup de ses enzymes, dont la polymérase, sont résistantes à la dénaturation par la chaleur. La stabilité thermique de la Taq polymérase est une caractéristique essentielle de la méthodologie de la PCR.

On peut choisir n'importe quelle partie de la molécule d'ADN (y compris l'ADNc issu des réactions de transcription inverse), à condition que les séquences bordant la région intéressée soient connues. Cette technique est vite devenue l'une des techniques les plus utilisées en biologie moléculaire. Elle est rapide, universelle, peu coûteuse et constitue un moyen simple de produire des quantités relativement importantes de copies de molécules d'ADN (à plusieurs millions d'exemplaires et parfois plus) à partir de quantités infimes d'ADN initial, même si ce dernier est de mauvaise qualité. Le développement de la PCR a entraîné une augmentation drastique des applications en biologie moléculaire ; et ce, parallèlement à l'augmentation du nombre de publications concernant des méthodes basées sur la PCR. La PCR est utilisée entre autres pour effectuer des tests de diagnostic, des empreintes d'ADN, des séquençages d'ADN, ainsi que pour le criblage des maladies génétiques et des mutations d'ADN au niveau d'un site spécifique et pour le clonage ou le sous-clonage des ADNc.

Les acides nucléiques d'une grande variété d'échantillons peuvent être analysés. Les protocoles de PCR prennent pour cible l'ADN plutôt que l'ARN, en raison de la stabilité de la molécule d'ADN et de la facilité à l'isoler. Cependant,

il est également possible de commencer à partir de l'ARN, à condition que cette molécule soit d'abord transcrite en ADNc.

Les critères essentiels de traitement d'un échantillon par PCR sont les suivants : l'échantillon doit contenir au moins quelques copies d'un brin d'ARN ou d'ADN intact, comprenant la région que l'on souhaite amplifier, et les impuretés doivent être suffisamment diluées afin qu'elles n'inhibent pas l'étape de polymérisation par PCR.

8.4.1 Composantes de la PCR

Réactifs

- *Amorces (directe et inverse)*
- *dNTP*
- *Tampon Taq polymérase*
- *Taq polymérase*
- *Chlorure de magnésium (MgCl_2)*
- *Eau distillée et désionisée (ddH_2O)*
- *Amorces* : une amorce est un fragment court de nucléotides qui sont complémentaires des séquences flanquantes du fragment d'ADN destiné à l'amplification (matrice). Deux amorces sont requises pour la PCR (amorce directe et amorce inverse, appelées 3'-5' et 5'-3'). Elles complètent chacune un brin de la double hélice d'ADN. Les amorces s'hybrident à l'ADN matriciel dénaturé, afin de fournir un site d'initiation à l'élongation de la nouvelle molécule d'ADN par la Taq polymérase. La conception de l'amorce est essentielle à une amplification efficace. Les amorces destinées à la réaction doivent être très spécifiques de la matrice à amplifier. La réactivité croisée avec des séquences d'ADN non ciblées entraîne une amplification non spécifique de l'ADN et l'obtention, au final, de faux positifs. D'autre part, les amorces ne doivent pas être capables de s'auto-hybrider ni de s'hybrider les unes aux autres. Il en résulterait une amplification très efficace de molécules d'ADN courtes et incohérentes et une amplification inefficace de l'ADN cible spécifique.
- *dNTP* : les quatre nucléotides de base, qui sont les composantes de base de tout fragment d'ADN, sont représentés par les lettres A, C, G, et T : adénine, cytosine, guanine et thymine. Le A situé sur un brin s'apparie toujours au T de l'autre brin, alors que le C s'apparie toujours au G. Les deux brins sont dits complémentaires l'un de l'autre.

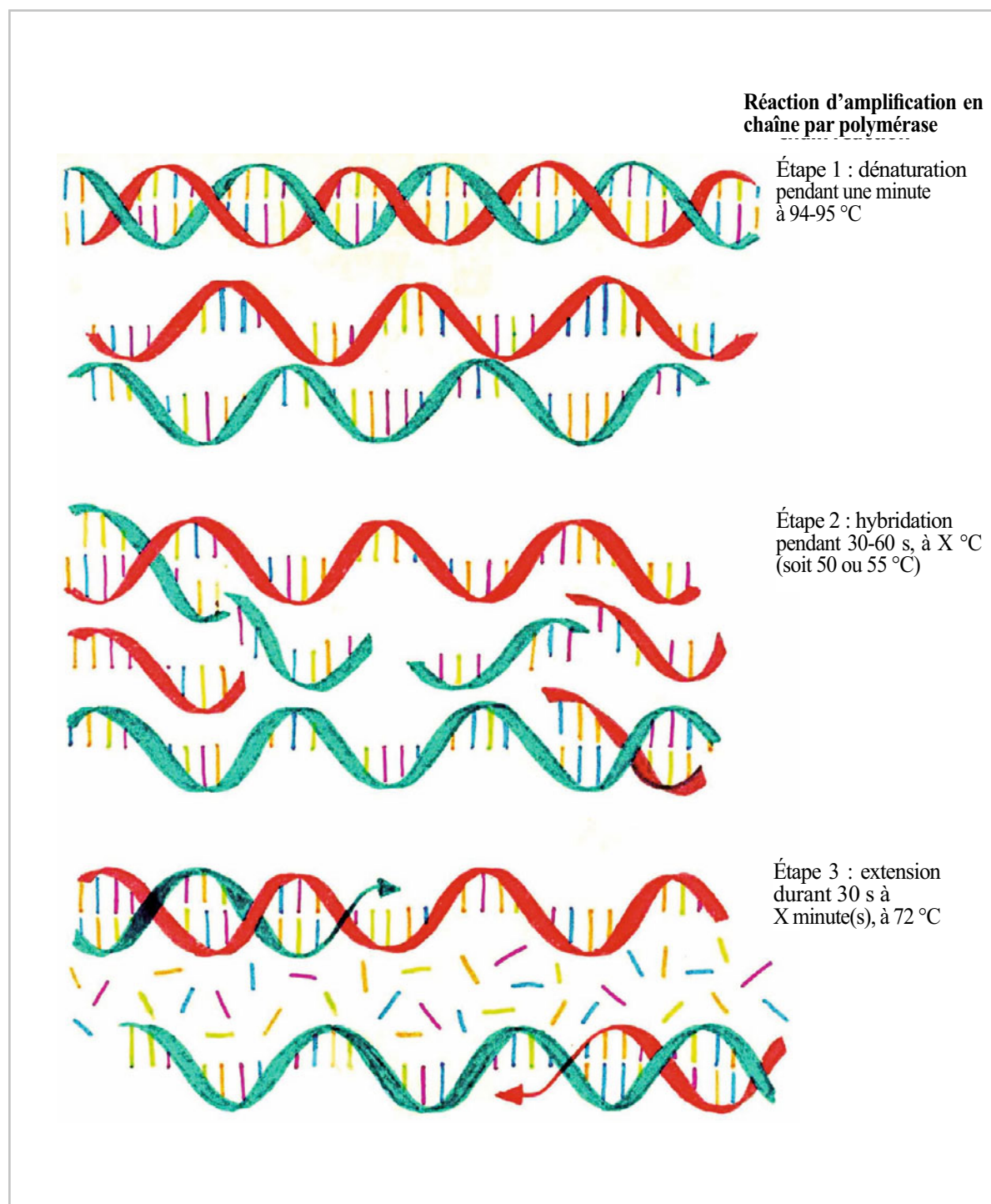


Fig. 8.1 Exemple d'un cycle standard de réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). La totalité du processus d'amplification par PCR dure 2-4 heures, en fonction du nombre de cycles et du temps requis pour les diverses étapes. Théoriquement, au cours de la PCR, une copie unique de la séquence cible est amplifiée de manière exponentielle. Au cours de chaque cycle, la quantité de fragments amplifiés double de telle sorte que la corrélation facteur/ratio entre le nombre de cycles et la quantité de fragment amplifié est 2^n , n étant le nombre de cycles. À partir d'un fragment cible unique, le nombre de fragments amplifiés après un cycle est $2^1 = 2$, après deux cycles $2^2 = 4$, après trois cycles $2^3 = 8$ et ainsi de suite. Après 36 cycles, le nombre de fragments amplifiés sera de 68 milliards de copies (voir Fig. 8.2). (Avec l'aimable autorisation d'Amelio Meini.)

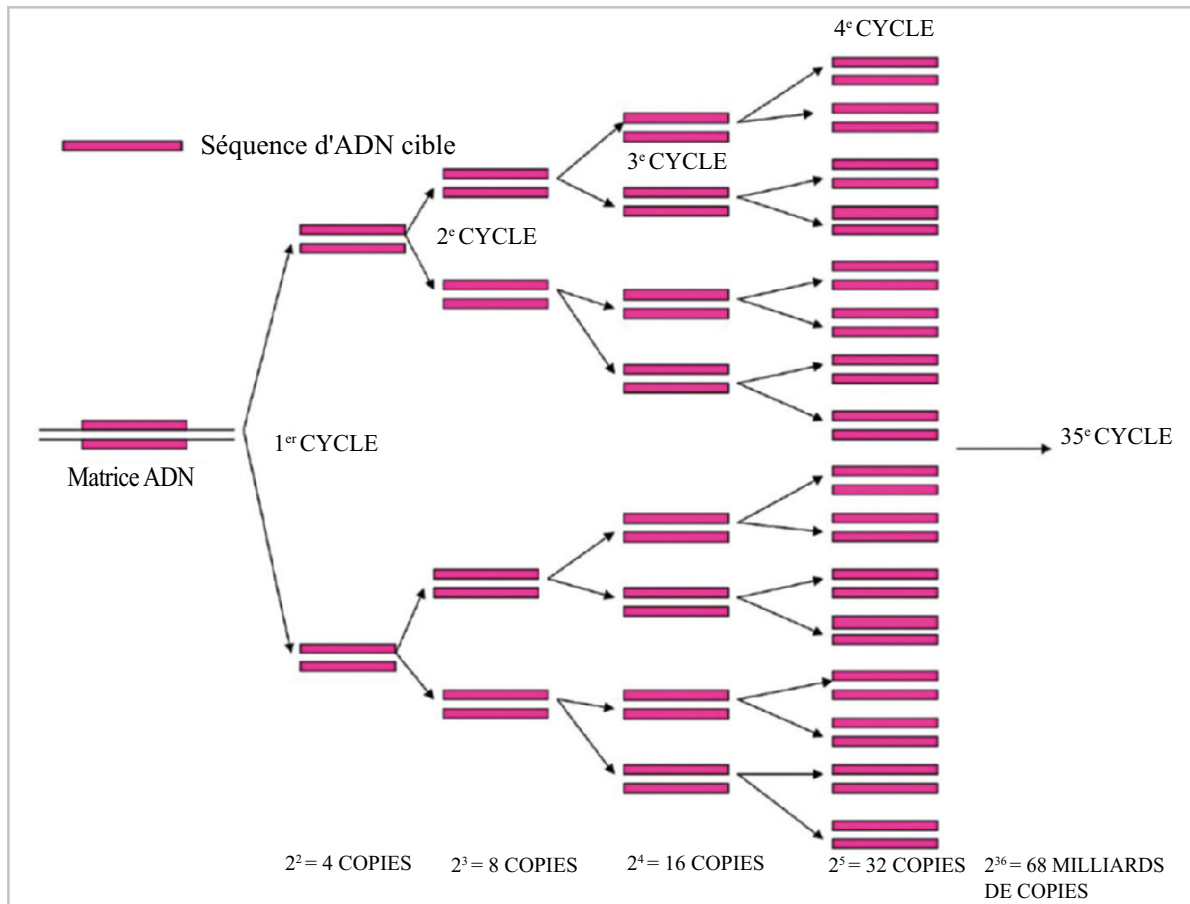


Fig. 8.2 Amplification exponentielle par PCR.

Les dNTP sont incorporés au brin nouvellement synthétisé par la Taq polymérase, en fonction de la séquence du brin matrice.

- *Tampon Taq polymérase* : ce réactif est nécessaire à la création de conditions chimiques optimales à l'activité de la Taq polymérase.
- *Taq polymérase* : cette polymérase reconnaît le duplex amorce-matrice et commence à ajouter des nucléotides à l'amorce pour finalement constituer un double de la matrice. Si la matrice contient un nucléotide A, l'enzyme ajoute un nucléotide T à l'amorce. Si la matrice contient un G, elle ajoute un C à la nouvelle chaîne et ainsi de suite jusqu'à l'extrémité du brin d'ADN.
- *Chlorure de magnésium (MgCl₂)* : ce réactif catalyse la réaction enzymatique et est donc indispensable à l'activité de la Taq polymérase.
- *Eau distillée et désionisée (ddH₂O)* : les réactifs sont dilués à la concentration voulue et le volume réactionnel est complété par du ddH₂O, qui doit

être stérile et exempt de sels, d'ions et de RNase, dans le cas de la RT-PCR. Cette dernière condition est essentielle afin d'éviter la dégradation de la molécule d'ARN (voir paragraphe 8.3).

8.4.2 La réaction en chaîne

La PCR comporte trois étapes majeures qui sont répétées 30 à 40 fois (cycles) (Fig. 8.1). La réaction est effectuée dans un thermocycleur automatique, qui réchauffe et refroidit très rapidement les tubes contenant le mélange réactionnel. La plupart des protocoles utilisés couramment pour la PCR sont conformes au plan indiqué ci-dessous.

- **Dénaturation** à 94-95 °C (pendant 30 secondes à 1 minute). Au cours de la dénaturation, l'ADN double brin fond et s'ouvre pour former de l'ADN simple brin. Toutes les réactions enzymatiques sont arrêtées (notamment l'extension à partir d'un cycle précédent).

- Hybridation à X °C (pendant 30 secondes à 1 minute). Les amorces contenues dans la solution se forment en continu et rompent les liaisons ioniques avec les matrices simple brin. Les liaisons les plus stables (les amorces parfaitement ajustées) se maintiennent plus longtemps. La polymérase va donc se lier à ces petits morceaux d'ADN double brin et commencer à copier la matrice. La température à laquelle cette réaction a lieu est la température d'hybridation. La température d'hybridation dépend de la séquence des amorces et se situe la plupart du temps entre 35 et 60 °C.
- Extension à 72 °C et durant 30 secondes à X minute(s) (le temps dépend de la longueur du fragment amplifié, en général une minute pour 1 kb). C'est la température idéale pour la polymérase. Les bases (complémentaires à la matrice) sont couplées à l'amorce sur l'extrémité 3' (la polymérase ajoute des dNTP dans le sens 5'-3').

Voir les protocoles de PCR utilisés pour la détection des virus IA, en pages 110-115.

8.4.3 Limites

Comme toute autre technique de laboratoire, la PCR classique a certaines limites. La nécessité d'amorces spécifiques à la séquence signifie qu'il faut connaître la séquence d'ADN des régions flanquant l'ADN à amplifier. Seule l'électrophorèse en gel, qui est une technique longue et comportant des risques chimiques, permet de déterminer les résultats de l'essai ainsi que leur spécificité. La réaction est également limitée par la taille des ADN destinés à être amplifiés (c'est-à-dire la distance qui sépare les amorces). L'amplification la plus efficace s'effectue sur des séquences d'ADN de 300 à 1 000 pb. Des produits de 4 kb ont cependant déjà été amplifiés.

La contamination est l'un des facteurs les plus importants qu'il est nécessaire de prendre en considération. Si l'échantillon testé est contaminé un tant soit peu par de l'ADN cible d'origine exogène, cet ADN sera également amplifié et conduira à la détection de faux positifs. La manipulation des échantillons après amplification peut aussi être considérée comme critique, quant à la contamination de l'environnement et des échantillons. Lors de la manipulation des tubes pour la détection par électrophorèse, l'énorme quantité de molécules d'ADN cible amplifiées peut facilement se répandre à l'environnement du laboratoire et aux autres échantillons.

Afin de réduire l'impact de certaines de ces contraintes liées à la PCR classique, une nouvelle méthodologie a

été élaborée, dite PCR en temps réel (rPCR destinée à l'ADN et rRT-PCR destinée à l'ARN).

8.5 PCR en temps réel

Au cours d'une PCR standard, la quantité de produit généré doit théoriquement doubler à chaque cycle. Si tel était le cas, la quantité finale de produit serait simplement proportionnelle à la quantité de matrice présente au début. Ce n'est pourtant pas le cas. En réalité, au fur et à mesure que la réaction progresse, les amorces et les nucléotides sont consommés et deviennent finalement limitants ; l'efficacité par cycle diminue donc progressivement. Dans le cas de la rPCR, un rapport quantitatif existe entre la quantité de matrice initialement présente et la quantité de produit formé, comme l'indique la mesure réalisée au cours de chaque cycle, à l'aide d'un rapporteur. Le rapporteur peut être relié à une sonde (un nucléotide court complémentaire d'une séquence cible située entre les amorces) ou à une molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN double brin (par exemple SybrGreen). Différents types de sondes sont disponibles dans le commerce : les sondes d'hydrolyse (TaqMan), les sondes d'hybridation (FRET), les balises moléculaires, ainsi que les APN (acides nucléiques peptidiques) et les sondes se fixant au sillon mineur, MGB (pour *minor-groove-binding*). Malgré les différences de chimie et de modes d'action, le principe de base reste la mesure de la fluorescence (puis de la concentration du fragment amplifié) à la fin de chaque étape d'élongation de la PCR, ainsi que le traçage d'une courbe à partir des données obtenues. Pour les 10-20 premiers cycles (phase exponentielle), la courbe sigmoïde obtenue sera linéaire au niveau de la ligne de base, jusqu'à ce que la quantité d'ADN matriciel s'accumule et atteigne le point auquel la fluorescence devient détectable. La courbe présente une croissance linéaire pendant plusieurs cycles (phase linéaire), commence à s'incurver, puis s'aplatit presque (phase de plateau, Fig. 8.3). C'est seulement dans la partie linéaire qu'il est possible d'établir un rapport direct entre la quantité de matrice présente dans la réaction et l'intensité de la fluorescence. Les mesures peuvent être effectuées lorsque la PCR est en cours et sont donc déduites en « temps réel » et non en fin de réaction (Fig. 8.3). La quantification des cibles d'ADN, d'ADNc ou d'ARN est aisément réalisée, grâce à la détermination du cycle (Ct ou Cp, voir définitions ci-dessous) auquel le produit de la PCR est décelé pour la première fois par l'automate (c'est-à-dire lorsque la fluorescence associée au produit est assez intense pour être détectée automatiquement).

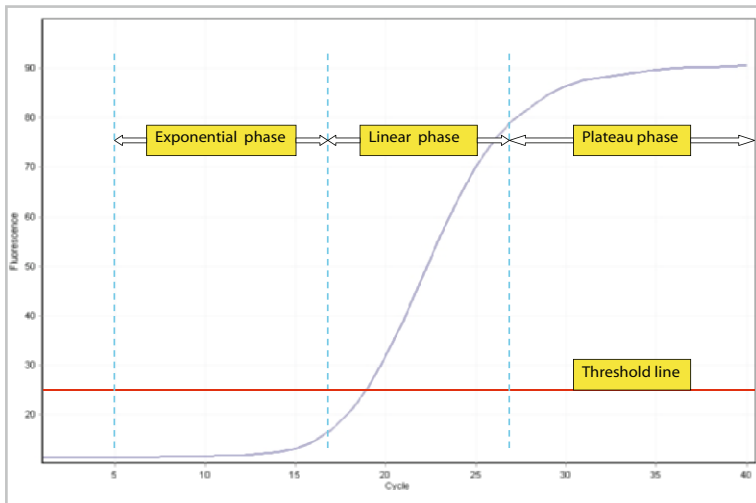


Fig. 8.3 Vue schématique d'une courbe d'amplification en rPCR.

8.5.1 Glossaire pour PCR en temps réel

Fluorescence de fond : fluorescence non spécifique, généralement plus évidente au cours des cycles initiaux de PCR. L'automate et le logiciel correspondants utilisent généralement ce signal de fond pour déterminer la valeur de la fluorescence de base.

Seuil : limite entre la fluorescence de fond et la fluorescence spécifique de la réaction. Elle est généralement déterminée par l'automate et le logiciel mais peut aussi être réglée manuellement.

Le **cycle seuil**, C_t (pour *cycle threshold*) ou le **point de croisement**, C_p (pour *crossing point*) est le numéro du cycle auquel la fluorescence générée par la réaction dépasse le seuil. Il est inversement proportionnel au logarithme du nombre initial de copies de la séquence cible.

Voir les protocoles de rPCR utilisés pour la détection du virus IA, en pages 116-117.

8.6 Organisation du laboratoire de diagnostic moléculaire

Le risque de contamination croisée doit être pris en compte, en raison de la sensibilité élevée de la méthode et du volume élevé d'échantillons traités dans un laboratoire de diagnostic par PCR.

L'ensemble du procédé de PCR doit être effectué dans un minimum de trois pièces, séparées et agencées comme l'indique l'exemple ci-dessous.

Première pièce : Extraction de l'acide nucléique (ADN/ARN)

Équipement

- Hotte à flux laminaire BL2.
- Vortex.
- Centrifugeuse.
- Micropipettes.
- Bain-marie.
- Congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Congélateur à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Réfrigérateur à $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

L'extraction des acides nucléiques par des solvants organiques tels que le phénol et le chloroforme doit être effectuée sous hotte aspirante.

Deuxième pièce : Préparation des réactifs et des mélanges réactionnels en l'absence de matrice (ADN ou ARN)

Équipement

- Hotte à flux laminaire.
- Centrifugeuse.
- Vortex.
- Congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pour la conservation des réactifs de PCR, des amorces et des sondes).

Les échantillons et les matrices d'ADN/ARN ne doivent pas pénétrer dans cette pièce. Le personnel entrant dans cette pièce doit porter une blouse et les gants prévus à cet effet, afin d'éviter la contamination des réactifs.

Troisième pièce : Ajout d'acide nucléique matriciel au mélange réactionnel, lancement de la PCR et de la rPCR et visualisation du produit de la PCR par électrophorèse en gel

Équipement

- Hotte PCR (pour l'ajout d'ADN ou d'ARN).

- Hotte aspirante (pour les produits chimiques destinés à l'électrophorèse en gel).
- Congélateur à -20°C .
- Réfrigérateur à $+4^{\circ}\text{C}$.
- Thermocycleur et/ou.
- Plateforme de PCR en temps réel.
- Centrifugeuse.
- Vortex.
- Unité d'électrophorèse en gel.

8.7 Échantillons destinés à être soumis aux protocoles moléculaires d'IA et préparation d'échantillon en vue de la PCR

Les protocoles moléculaires décrits dans ce chapitre ont été testés sur les préparations d'échantillons suivantes.

Organes et tissus (cervelle, trachée, poumons et intestins)

- Couper des petits blocs de tissu ($2\text{--}5\text{ mm} \times 2\text{--}5\text{ mm}$) à l'aide de ciseaux stériles ou de lames chirurgicales.
- Les tissus animaux sont broyés à l'aide d'un pilon et d'un mortier stériles. Les tissus fibreux (poumons, trachée et intestins) peuvent nécessiter l'ajout de poudre de quartz ou de sable stérile afin d'obtenir un meilleur broyage des cellules. L'ajout de 300–500 mL de PBS facilite le broyage et l'homogénéisation et permet de préparer des fractions aliquotes destinées à d'autres tests que la PCR (notamment à l'isolement viral).
- L'homogénéisation est effectuée de manière simple, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Des homogénéisateurs commerciaux peuvent aussi être utilisés.
- Clarifier la suspension obtenue par centrifugation à 1 000 g.

Écouvillons cloacaux et trachéaux

- Immerger les écouvillons dans du PBS (maximum 1 mL) et procéder à l'extraction de l'ARN à partir de cette suspension. Les échantillons peuvent être groupés (cinq écouvillons trachéaux par groupe ou cinq écouvillons cloacaux par groupe). Mélanger brièvement au vortex.
- Ajouter le volume adéquat de cette suspension au tampon de lyse du kit d'extraction de l'ARN, selon les instructions du fabricant.

Fèces

Ajouter un volume de fèces à quatre volumes de PBS stérile. Clarifier la suspension obtenue par centrifugation à 1 000 g.

Ajouter la quantité requise de surnageant au tampon de lyse du kit d'extraction de l'ARN, selon les instructions du fabricant.

Liquide allantoïdien

Ajouter la quantité requise de liquide allantoïdien au tampon de lyse du kit d'extraction de l'ARN, selon les instructions du fabricant.

8.7.1 Extraction de l'ARN

Il existe plusieurs méthodes d'extraction manuelle ou automatique de l'ARN. De nombreux kits sont commercialisés et certains sont élaborés et optimisés en vue de l'extraction d'acides nucléiques à partir d'échantillons spécifiques tels que les tissus, le sang ou les selles. Certains kits d'extraction disponibles dans le commerce sont utilisés ci-dessous.

- Ces kits (ou des kits équivalents) peuvent être utilisés sur diverses matrices et donnent des résultats satisfaisants.
- NucleoSpin RNA II (Macherey-Nage, Allemagne ; numéro de catalogue : FC140955N).
- RNeasyMiniKit (Qiagen, Allemagne).
- High pure RNA isolation kit (Roche Applied Science, Allemagne) : déconseillé pour les fèces.
- MagMax (Ambion/Applied Biosystems) : destiné aux écouvillons et autres matrices liquides.

Le protocole d'extraction recommandé par le fabricant doit être suivi.

8.8 Préparation du mélange PCR

- Calculer les volumes exacts de réactifs nécessaires avant de préparer le mélange réactionnel et selon les protocoles fournis dans ce livre (voir les exemples présentés dans le Tableau 8.3). Afin que les réactifs soient répartis de façon homogène dans chacune des fractions aliquotes, il est conseillé de les mélanger dans un seul tube réactionnel (mélange mère) puis de distribuer ce mélange dans les différents tubes PCR destinés à chaque échantillon.

Tableau 8.3 Exemple de calcul des volumes de réactifs destinés à une PCR préparée pour dix échantillons.

Réactif (concentration de la solution mère) ^a	Concentration finale ^b	1 × Mélange réactionnel (μL) ^c	Volume total (μL) ^e
Eau stérile exempte de Rnase	/	3,2 ^d	35,2
Tampon PCR (5×)	1×	5	55
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2,5	27,5
Mélange de dNTP (10 mM)	1 mM	2,5	27,5
DTT (100 mM)	10 mM	2,5	27,5
Amorce M25F (5 pmol/μL)	0,3 μM	1,5	16,5
Amorce M124R (5 pmol/μL)	0,3 μM	1,5	16,5
Inhibiteur de RNase (20 U/μL)	10 U	0,5	5,5
Transcriptase inverse (50 U/μL)	15 U	0,3	3,3
Ampli Taq GOLD (5 U/μL)	2,5 U	0,5	5,5
Volume réactionnel final : ARN			
Mélanger au vortex pendant quelques secondes.			
Répartir des parts aliquotes de mélange mère dans des tubes PCR de 0,2 mL. (volume de mélange mère pour 10 échantillons + 1) ^e		20	220
Ajouter l'ARN ^a		5	
Volume réactionnel final ^b		25	/

^aGénéralement fourni avec le produit ou préparé au laboratoire.

^bGénéralement décrit dans le manuel du kit ou dans le protocole de la PCR (par exemple dans une revue scientifique).

^cPour un calcul rapide et aisé du volume d'un réactif spécifique nécessaire à la réalisation d'une réaction, la formule suivante peut être appliquée :

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

C_i étant la concentration initiale du réactif (c'est-à-dire la concentration de la solution mère fournie par le fabricant ou préparée au laboratoire). Connu.

V_i étant le volume initial du réactif (c'est-à-dire le volume nécessaire à la réalisation d'une PCR). Inconnu.

C_f étant la concentration finale du réactif nécessaire à la PCR. Connu.

V_f étant le volume réactionnel final. Connu.

Dans l'exemple ci-dessus, le volume de MgCl₂ nécessaire pour effectuer une PCR (V_i) est le suivant : $25 \text{ mM} \times V_i = 2,5 \text{ mM} \times 25 \mu\text{L}$

$$25 \text{ mM} \times V_i = 2,5 \text{ mM} \times 25 \mu\text{L}$$

$$V_i = \frac{2,5 \text{ mM} \times 25 \mu\text{L}}{25 \text{ mM}} = 2,5 \mu\text{L de MgCl}_2 (25 \text{ mM}) \text{ pour une concentration finale de } 2,5 \text{ mM dans } 25 \mu\text{L}.$$

^dObtenu en soustrayant la somme des volumes des réactifs individuels, du volume final de réactifs [$\mu\text{L d'eau} = 20 \mu\text{L} - \Sigma \mu\text{L des différents réactifs (tampon PCR, MgCl}_2, \text{dNTP, DTT, amorces, inhibiteur de Rnase, transcriptase reverse et Taq)}$].

^e $\mu\text{L/L réaction}$ nombre total de réactions + 1 (un volume additionnel est généralement calculé afin de compenser les erreurs de pipetage ou les distributions imprécises de volume).

- Toutes les solutions mères des réactifs utilisés pour la PCR sont conservées à -20°C . Les fractions aliquotes des solutions mères des réactifs (en particulier les amorces et les sondes) devraient être préparées en évitant toute contamination possible des solutions mères et en minimisant la détérioration en cas de contamination. Les enzymes (notamment la transcriptase inverse, Taq) doivent être sorties du congélateur (-20°C) au dernier moment afin de préserver leur durée de vie.
- Le volume exact est placé dans le récipient stérile approprié.

Protocole

1. Dégeler tous les réactifs, à l'exception de la Taq polymérase et/ou de la transcriptase inverse ; les conserver si possible sur de la glace.
2. Ajouter le ddH₂O.
3. Ajouter le tampon Taq polymérase.
4. Ajouter le MgCl₂.
5. Ajouter les dNTP.
6. Ajouter l'amorce directe.
7. Ajouter l'amorce inverse.
8. Ajouter la Taq polymérase (et/ou la transcriptase inverse).

9. Mélanger la solution au vortex.
10. Distribuer le mélange réactionnel dans les différents tubes PCR stériles (autant que le nombre d'échantillons à tester).
11. Ajouter l'acide nucléique matriciel sous hotte à flux laminaire et dans une pièce séparée.
12. Charger les tubes sur le bloc thermique du thermocycleur (ou sur la plateforme de la PCR en temps réel) et lancer la réaction.

8.9 Détection et analyse du produit de la réaction en PCR classique (PCR en point final)

Les produits finaux de la PCR (les *amplicons*) doivent correspondre à des fragments d'ADNc de longueur définie. L'électrophorèse en gel est le moyen le plus simple de rechercher la présence de ces fragments (voir ci-dessous). Un échantillon du produit de la réaction (généralement quelques microlitres), ainsi que l'échelle contenant les marqueurs de masses moléculaires appropriés, sont déposés sur un gel d'agarose contenant 0,8-4,0 % de bromure d'éthidium ou sur un gel de polyacrylamide. Les bandes d'ADN obtenues sur le gel d'agarose sont visualisées par transillumination UV (Fig. 8.4). Les bandes obtenues sur le gel d'acrylamide peuvent être visualisées par coloration à l'argent. Les fragments contenus dans le produit peuvent être identifiés en fonction de leurs masses moléculaires, par comparaison entre les bandes de produit et les bandes des marqueurs moléculaires de masses connues.

8.9.1 Électrophorèse en gel

L'électrophorèse consiste à séparer les fragments d'ADN de tailles différentes sur une matrice d'agarose ou d'acrylamide placée à l'intérieur d'une cuve d'électrophorèse. La cuve contient deux électrodes opposées, placées aux extrémités opposées et reliées à un générateur de courant alternatif. La cuve est remplie d'un tampon d'électrophorèse approprié, qui conduit l'électricité entre les deux électrodes. Lorsque le courant est appliqué, l'ADN chargé négativement migre vers l'électrode positive. Le gel (agarose ou acrylamide) agit comme crible, de telle sorte que les fragments de plus petite taille migrent plus vite que les plus gros. Les fragments sont donc séparés en fonction de leur taille. La différence principale entre l'agarose et l'acrylamide est la taille de la maille formée par la matrice. La vitesse

d'électrophorèse dépend de la taille du gel et de la tension appliquée dans la cuve par le générateur. Plus la tension est élevée, plus les fragments migrent vite. Chaque cuve a une gamme optimale de tension maximale au-delà de laquelle les bandes d'ADN sont barbouillées. Des tensions plus basses permettent généralement de séparer les bandes de façon plus nette. Après l'électrophorèse, l'ADN peut être visualisé par coloration au bromure d'éthidium ou au SyBrGreen pour les gels d'agarose et au nitrate d'argent pour les gels d'acrylamide. La coloration au bromure d'éthidium est la plus couramment utilisée par les laboratoires de diagnostic, en raison de sa sensibilité à l'ADN et de sa vitesse de coloration. Les inconvénients incluent le coût élevé de la visualisation (qui nécessite une source de lumière UV) et le pouvoir cancérogène potentiel. Cependant, ce risque est minimisé en raison des faibles concentrations requises pour la coloration et grâce à l'usage d'équipements de protection personnelle (tels que PPE, blouses et gants jetables).

Les gels d'acrylamide colorés à l'argent sont plus sensibles et permettent donc la détection d'amplicons présents en plus faibles quantités. La taille inférieure de la matrice du gel d'acrylamide conduit à une meilleure séparation des amplicons, notamment des plus petits d'entre eux (50-200 pb). Ces caractéristiques contribuent à augmenter la sensibilité et la spécificité du protocole de PCR (Fig. 8.5 a, b) et à se passer d'équipements coûteux nécessaires à la visualisation. Les inconvénients incluent l'usage de

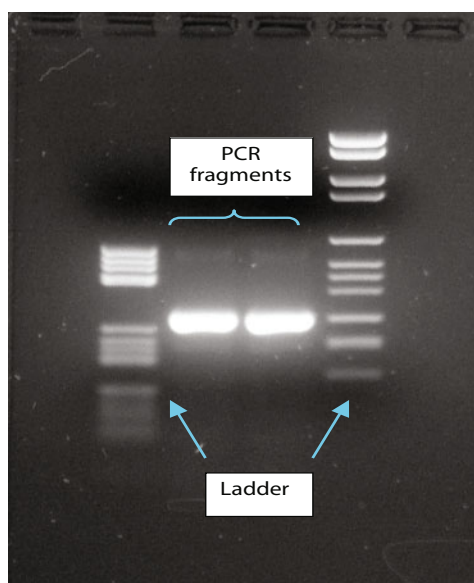
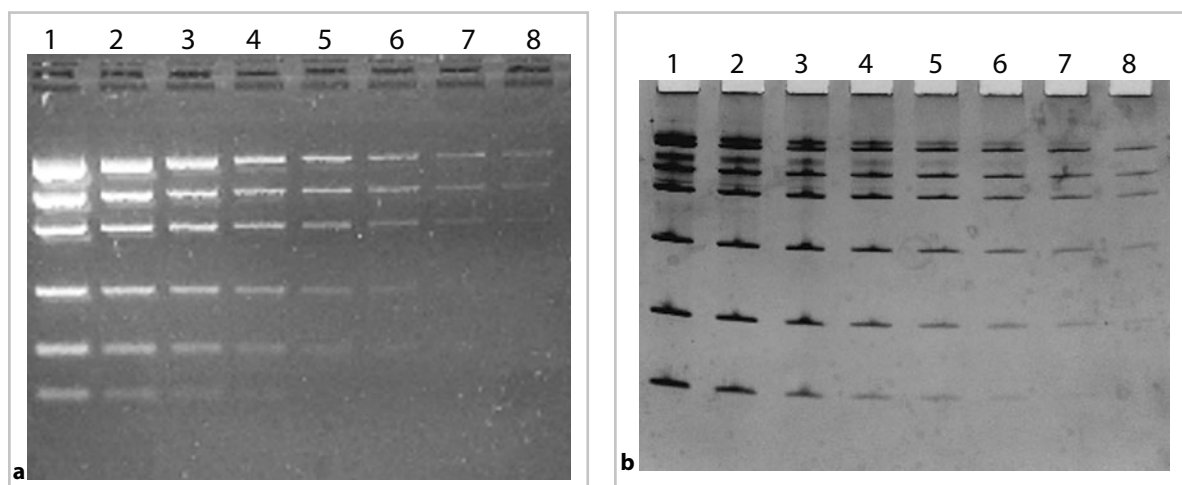


Fig. 8.4 Détection des amplicons PCR sur gel d'agarose.



Échelle d'ADN de faible poids moléculaire (Invitrogen, numéro de catalogue 10068-013)

Concentration pour 4 μ L								
Taille du fragment (pb)	1	2	3	4	5	6	7	8
2000	100 ng	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
1200	60	30	15	7,5	3,75	1,87	0,93	0,46
800	40	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31
400	20	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15
200	10	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,07
100	5	2,5	1,25	0,62	0,31	0,15	0,07	0,04

Fig. 8.5 a, b (a) Exemple de gel d'agarose à 2 % dans du TAE 0,5 \times . Conditions d'électrophorèse : 90 V pendant 45 min. Échantillon : 8 dilutions du marqueur au $\frac{1}{2}$, dans de l'eau ; chargement : 4 μ L d'échantillon + 1 μ L de tampon de charge. Voir tableau ci-dessous indiquant la taille du fragment et les concentrations. (b) Exemple de gel d'acrylamide à 7 % dans du TBE 1 \times . Conditions d'électrophorèse : 200 V pendant 40 minutes. Échantillon : huit dilutions du marqueur au $\frac{1}{2}$, dans de l'eau ; chargement : 4 μ L d'échantillon + 1 μ L de tampon de charge. Voir tableau ci-dessous indiquant la taille du fragment et les concentrations. Les bandes d'ADN des pistes 5 à 8 sont plus visibles et ont une meilleure définition que les bandes obtenues sur gel d'agarose, en particulier pour les bandes de plus petite taille. La séparation des bandes de taille identique est également améliorée.

composés toxiques (tels que le nitrate d'argent et l'acrylamide) ainsi qu'un montage du gel nécessitant plus de temps et une électrophorèse plus lente que dans le cas de l'agarose. Les formules et les protocoles sont indiqués dans les pages suivantes.

8.9.2 Préparation du gel de polyacrylamide-SDS, en vue de l'électrophorèse

Remarque : Les recettes des solutions requises sont fournies en section 8.9.3.1.

Assemblage du portoir du gel (Fig. 8.6 b)

- Nettoyer toutes les pièces à l'alcool (les plaques de verre, l'espaceur, le peigne, etc.).
- Assembler le bac à gel selon les instructions du fabricant.

Préparation du gel

Remarque : Les volumes utilisés sont indiqués pour un gel vertical (de 10 \times 7 cm).

1. Mélanger les réactifs suivants sous hotte aspirante :
 - 5 mL de solution d'acrylamide à 7 % (solution A) ;

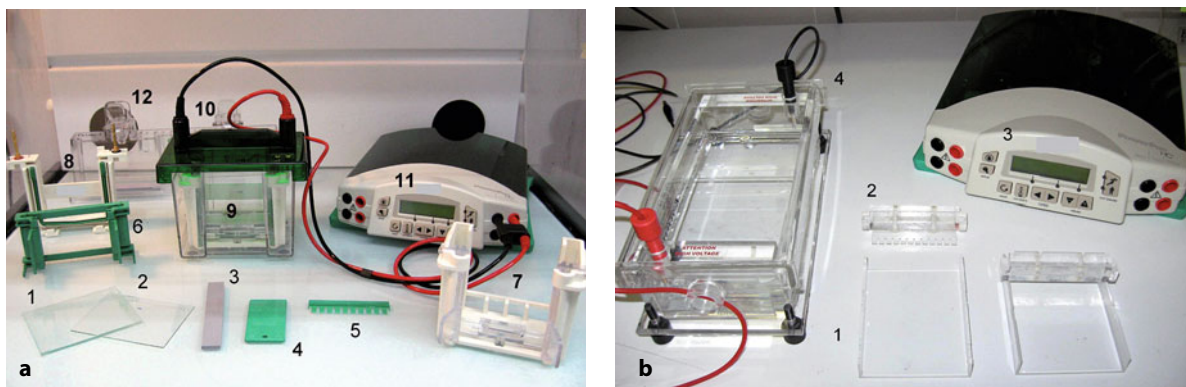


Fig. 8.6 a, b (a) 1 Plaques d'espacement ; 2 plaques courtes ; 3 joint de moulage du support ; 4 plaque de dégagement du gel ; 5 peigne ; 6 cadre de moulage ; 7, 8 cadres de fixation ; 9 réservoir de tampon ; 10 couvercle ; 11 générateur ; 12 support de moulage. (b) 1 plateau transparent aux UV ; 2 peigne ; 3 générateur ; 4 cuve d'électrophorèse.

- 20 μL de PSA (persulfate d'ammonium) à 10 % (solution B) ;
- 10 μL de TEMED (tétra-méthyl-éthylènediamine [N,N,N',N'] disponible dans le commerce et prêt à l'emploi. Sigma 7024 ou Biorad 161-0800 ou -0801).

2. Verser la solution sur le bac à gel.
3. Placer le peigne dans le gel et laisser polymériser ce dernier à température ambiante pendant 20 minutes.

Chargement de l'échantillon et électrophorèse

1. Mettre le bac à gel dans la cuve. Remplir de tampon TBE et de solution C concentrée, en proportions égales.
2. Mélanger le volume approprié d'échantillon (généralement 7 μL) avec 3-4 μL de tampon de charge.
3. Enlever le peigne.
4. Rincer les puits à l'aide d'une seringue remplie de tampon TBE.
5. Déposer les échantillons et le marqueur approprié sur le gel.
6. Fermer la cuve.
7. Allumer le générateur et programmer les conditions de l'électrophorèse (généralement 40 minutes, 200 V et 400 mA pour un gel d'acrylamide à 7 %).
8. Connecter la cuve au générateur et lancer l'électrophorèse.

Coloration du gel

Remarque : Il est recommandé d'utiliser un agitateur à balancier.

1. À la fin de la migration, éteindre le générateur et démonter la cuve.

2. Ouvrir le bac à gel et placer le gel dans un récipient installé sur l'agitateur à balancier.
3. Recouvrir entièrement le gel d'une solution de fixation et agiter pendant au moins cinq minutes.
4. Récupérer la solution de fixation et recouvrir entièrement le gel de ddH_2O . Agiter pendant deux minutes.
5. Éliminer l'eau et recouvrir entièrement le gel d'une solution de nitrate d'argent. Agiter pendant cinq minutes.
6. Récupérer la solution de nitrate d'argent et recouvrir entièrement le gel de ddH_2O . Agiter pendant deux minutes.
7. Éliminer l'eau et recouvrir entièrement le gel d'une solution de révélation (solution F). Agiter jusqu'à ce que les bandes deviennent visibles.
8. Éliminer la solution de révélation. Recouvrir entièrement le gel avec de l'acide acétique (solution G).
9. Agiter pendant au moins cinq minutes.
10. Récupérer la solution G et immerger le gel dans du ddH_2O . Agiter pendant deux minutes.
11. Emballer le gel dans du film en plastique pour faciliter sa manipulation.

8.9.2.1 Solutions pour gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE) (Fig 8.6 a)

Solution A : Acrylamide à 7 %

(pour 500 mL de solution) :

- 50 mL de TBE 10×
- 87,5 mL d'acrylamide/bis acrylamide à 40 %, 29:1
- 500 mL de glycérol à 100 %.

1. Verser l'acrylamide à 40 %.
2. Ajouter le TBE 10×
3. Ajouter le glycérol à 100 %.
4. Ajouter 313 mL de ddH₂O.
5. Conserver à température ambiante (stabilité maintenue pendant un maximum d'un an).

Solution B : Persulfate d'ammonium (PSA) à 10 %

(pour 10 mL de solution) :

- 1 g de persulfate d'ammonium
1. Placer le persulfate d'ammonium dans un tube de 15 mL.
 2. Dissoudre le persulfate d'ammonium dans 10 mL de ddH₂O.
 3. Conserver à température ambiante (stabilité maintenue pendant un maximum d'un an).

Solution C : TBE 10 ×

(pour 1 L) :

- 108 g de base Trizma
 - 55 g d'acide borique
 - 40 mL d'EDTA à 0,5 M, pH 8
1. Peser la base Trizma et l'acide borique.
 2. Dissoudre les sels dans l'EDTA et le ddH₂O et mélanger à température ambiante.
 3. Ajouter du ddH₂O jusqu'à obtenir un volume final de 1 L.
 4. Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.
 5. Conserver à + 4 °C (stabilité maintenue pendant un maximum d'un an).

Solution D : Fixateur

(pour 1 L) :

- 100 mL de méthanol ou d'éthanol absolu
 - 15 mL d'acide nitrique à 70 %
1. Verser 885 mL de ddH₂O.
 2. Ajouter l'acide nitrique à 70 %.
 3. Ajouter le méthanol ou l'éthanol absolu.
 4. Conserver à température ambiante (stabilité maintenue pendant un maximum de six mois).

Solution E : Nitrate d'argent à 4 %

(pour 500 mL) :

- 2 g de nitrate d'argent

1. Dissoudre le nitrate d'argent dans 500 mL de ddH₂O.
2. Ajouter le nitrate d'argent.
3. Filtrer la solution.
4. Conserver à température ambiante.

Solution F : Solution de révélation

(pour 1 L)

- 30 g de carbonate de sodium
 - 700 µL de formaldéhyde à 36 %
1. Dissoudre le carbonate de sodium dans 1 L de ddH₂O.
 2. Conserver à température ambiante (stabilité maintenue pendant un maximum de six mois).
 3. Après la première utilisation, ajouter 700 µL de formaldéhyde à 36 %.

Solution G : Acide acétique à 5 %

(pour 1 L)

- 50 mL d'acide acétique pur glacé (100 %)
1. Verser 950 mL de ddH₂O dans un flacon.
 2. Ajouter l'acide acétique pur glacé.
 3. Conserver à température ambiante.

8.9.3 Préparation du gel d'agarose

Remarque : Les recettes des solutions requises sont fournies en section 8.9.3.1.

Préparation du gel

1. Peser les quantités exactes de poudre d'agarose (de qualité biologie moléculaire) permettant d'obtenir la concentration voulue (%). Le volume du gel dépend de la dimension du bac. Il est calculé de la façon suivante :

Largeur du bac × longueur du bac × épaisseur du bac (0,5 cm).

Exemple 1 :

$10 \times 7,5 \times 0,5 \text{ cm} = 37,5 \text{ mL de TAE } 1\times = 0,375 \text{ g d'agarose pour un gel à } 1 \% \text{ ou } 0,75 \text{ g d'agarose pour un gel à } 2 \%$.

Exemple 2 :

$8,5 \times 7 \times 0,5 \text{ cm} = 30 \text{ mL de TAE } 1\times = 0,3 \text{ g d'agarose pour un gel à } 1 \% \text{ ou } 0,6 \text{ g d'agarose pour un gel à } 2 \%$.

2. Mélanger la poudre d'agarose au volume adéquat de tampon TAE (solution H).

3. Dissoudre le mélange d'agarose au four à micro-ondes.
4. Faire refroidir la solution dans un bain d'eau jusqu'à ce qu'elle soit facile à manipuler.
5. Colorer le gel par incorporation de bromure d'éthidium (BET) : ajouter 1,8 µL d'une solution contenant 10 mg de BET/mL (pour un gel de 30 mL) et mélanger. Pour colorer le gel par immersion finale dans du BET, omettre l'étape ci-dessus et voir ci-dessous.
6. Placer la solution refroidie dans le bac à gel, dans lequel un peigne a été préalablement placé. Éviter la formation de bulles d'air.
7. Laisser le gel se solidifier à température ambiante.

Chargement de l'échantillon et électrophorèse

1. Extraire le peigne du gel solidifié et placer le gel (et le bac) dans la cuve à électrophorèse.
2. Mélanger l'échantillon à charger (5-10 µL) à 3-4 µL de tampon de charge (solution I).
3. Déposer les échantillons et les marqueurs appropriés (solution J) sur le gel.
4. Fermer la cuve.
5. Allumer le générateur et programmer les conditions requises pour l'électrophorèse : 90-100 V, 30-40 min pour des fragments de 100 à 1 000 pb, en gel d'agarose à 1 %.
6. À la fin de l'électrophorèse :
 - placer le gel sur un trans-illuminateur UV, s'il a été coloré par inclusion de BET. Coloration du gel par immersion finale dans du BET ;
 - immerger le gel dans un récipient contenant une solution de BET à 0,5-1 µg/mL. Agiter pendant 20 minutes. Récupérer la solution de BET (qui peut être réutilisée jusqu'à 20 fois) et immerger le gel dans du ddH₂O. Agiter pendant 20 minutes. Placer le gel accompagné du bac, sur un trans-illuminateur UV.

3. Ajouter la solution d'EDTA à température ambiante.
4. Ajouter du ddH₂O jusqu'à obtenir un volume final de 1 L.
5. Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.
6. Conserver à + 4 °C.

Solution B : Tampon de charge 10 ×

(pour 10 mL)

- 0,2 g de Ficoll
- 1 mL de TBE 10 ×
- 6 mL de glycérol à 100 %.
- 1 mL de bleu de bromophénol et de xylène cyanol (0,5 %)

1. Peser le Ficoll dans un tube de 15 mL.
2. Ajouter 1 mL de TBE 10 ×.
3. Ajouter 2 mL de ddH₂O.
4. Dissoudre la solution au bain-marie, à 37 °C.
5. Ajouter le glycérol.
6. Ajouter le bleu de bromophénol et la solution de xylène cyanol.
7. Conserver à + 4 °C.

Solution C : Marqueurs

(pour 800 µL)

- 100 µL de marqueurs (Roche)
- 300 µL de tampon de charge 10 ×
- 400 µL de TBE 1 ×

1. Placer les marqueurs dans un tube de 15 mL.
2. Ajouter le tampon de charge.
3. Ajouter le TBE 1 ×.
4. Conserver à + 4 °C (stabilité maintenue pendant un maximum d'un an).

8.10 Détection du virus de l'influenza de type A par RT-PCR en point final

8.9.3.1 Solutions pour l'électrophorèse en gel d'agarose

Solution A : TAE 10 ×

(pour 1 L)

- 48,4 g de base Trizma.
- 11,4 mL d'acide acétique pur glacé
- 20 mL d'EDTA à 0,5M, pH 8

1. Peser la base Trizma.
2. Ajouter l'acide acétique glacé.

8.10.1 Protocole 1

Ce protocole a été élaboré à l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), en adaptant la série d'amorce utilisée dans le protocole de rRT-PCR mis au point par Spackman *et al.* 2002, à une RT-PCR en point final en une étape. Ainsi que l'on pouvait s'y attendre, les observations effectuées au laboratoire montrent que ce protocole est moins sensible que la rRT-PCR originale. Toutefois, il peut être utilisé facilement et à bon escient dans

les laboratoires ne possédant pas de plateforme en temps réel. En raison de la petite taille de l'amplicon (99 pb), les résultats de RT-PCR doivent être visualisés sur gel SDS-PAGE coloré à l'argent ou sur gel d'agarose à 2-3 %. Le kit utilisé pour la PCR est le GeneAmp Gold RNA de la compagnie Applied Biosystems (numéro de produit : 4308207).

Amorces

Directe M+25 : AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG

Inverse M-124 : TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG

Protocole

Réactif (solution mère concentrée)	Concentration finale	Réaction 1 × (μL)
Eau stérile exempte de Rnase	/	3,2
Tampon PCR (5×)	1×	5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2,5
Mélange de dNTP (10 mM)	1 mM	2,5
DTT (100 mM)	10 mM	2,5
Amorce M25F (5 pmol/μL)	0,3 μM	1,5
Amorce M124R (5 pmol/μL)	0,3 μM	1,5
Inhibiteur de RNase (20 U/μL)	10 U	0,5
Transcriptase reverse 50 U/μL	15 U	0,3
Ampli Taq GOLD (5 U/μL)	2,5 U	0,5
Volume total		20
Mélanger au vortex pendant quelques secondes.		
Répartir des parties aliquotes de 20 μL dans des tubes PCR de 0,2 mL.		
Ajouter l'ARN		5
Volume réactionnel final		25

Conditions du processus cyclique

	95 °C	94 °C		72 °C	72 °C	
42 °C	5 min	1 min	60 °C	1 min	10 min	4 °C
20 min			1 min 40 cycles			∞

L'amplicon est identifié sur gel d'acrylamide à 7 % coloré à l'argent ou sur gel d'agarose à 2-3 %. La taille du fragment amplifié attendu est de 99 pb.

8.10.2 Protocole 2

Ce protocole correspond à une variante de la méthode élaborée par Fouchier *et al.* (2000) pour la détection des virus influenza de type A dans des échantillons d'origines humaine, animale et aviaire. Selon des investigations antérieures, menées sur le terrain sur des écouvillonnages d'origine aviaire, la sensibilité

relative était de 95,6 % ($CI_{95} = 93,1-98,0$) (Cattoli *et al.* 2004). Dans certains cas, les bandes non spécifiques sont visualisées sur gel (Marti *et al.* 2006). Un examen minutieux du gel et l'utilisation de témoins et de marqueurs de taille appropriés sont donc extrêmement importants. Le kit utilisé pour la PCR est le GeneAmp Gold RNA de la compagnie Applied Biosystems (numéro de produit : 4308207).

Amorces

Directe M52 C: 5'-CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG-3'

Inverse M253 R : 5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAG/T CGT CTA-3'

Protocole

Réactif (solution mère concentrée)	Concentration finale	Réaction 1 × (μL)
Eau stérile exempte de Rnase	/	4,7
Tampon PCR (5×)	1×	5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	2,5
Mélange de dNTP (10 mM)	1 mM	2,5
DTT (100 mM)	10 mM	2,5
Amorce M25 C (10 pmol/μL)	0,3 μM	0,75
Amorce M253 R (10 pmol/μL)	0,3 μM	0,75
Inhibiteur de RNase (20 U/μL)	10 U	0,5
Transcriptase reverse 50 U/μL	15 U	0,3
Ampli Taq GOLD (5 U/μL)	2,5 U	0,5
Volume total		20
Mélanger au vortex pendant quelques secondes.		
Répartir des parties aliquotes de 20 μL dans des tubes PCR de 0,2 mL.		
L'ARN		5
Volume réactionnel final		25

Conditions du processus cyclique

	95 °C	94 °C		72 °C	72 °C	
42 °C	5 min	1 min	55 °C	1 min	10 min	4 °C
20 min			1 min 40 cycles			∞

L'amplicon est identifié sur gel d'agarose à 2 % ou sur gel SDS acrylamide à 7 %, coloré à l'argent. La taille du fragment amplifié attendu est de 244 pb.

8.11 Protocole de détection du virus de l'influenza aviaire appartenant au sous-type H5, par RT-PCR en point final

8.11.1 Introduction

Deux protocoles de PCR sensible au H5 ont été élaborés dans le cadre du projet européen AVIFLU (Slomka *et al.* 2007). Ces protocoles permettent la détection classique d'amplicons, par électrophorèse en gel d'agarose avec coloration au BET ou en gel SDS-PAGE avec coloration au nitrate d'argent. Les deux types d'amplicons obtenus couvrent tous deux le site de clivage HA. Leur séquençage permet donc d'obtenir l'information concernant le pathotype, c'est-à-dire IAFP ou IAHP. Les deux méthodes font appel à des paires d'amorces différentes et sont connues selon leurs acronymes : PCR H5KHA et PCR J3/B2a. Elles permettent la détection clinique des isolats H5 eurasiatiques actuels, y compris les isolats d'IAHP H5N1 qui ont circulé

parmi les volailles en Extrême-Orient depuis 2003, ainsi que les isolats H5N1 les plus récents, circulant en Europe, au Moyen-Orient et en Afrique. D'autres souches d'IAFP H5, isolées à partir d'oiseaux aquatiques européens au cours de la dernière décennie, peuvent aussi être identifiées par l'une ou l'autre de ces méthodes de PCR H5.

La PCR H5KHA est extrêmement sensible, bien que d'éventuels problèmes de spécificité aient été rencontrés dans certains cas, notamment l'obtention de faux positifs dans des échantillons d'IA non H5 et/ou de bandes multiples, de taille identique à celle de l'amplicon attendu.

La PCR J3/B2a est moins sensible que la H5KHA, mais permet pourtant de détecter avec succès les amplicons H5 à partir d'échantillons cliniques. Des difficultés de séquençage et de pathotypage ont toutefois été rencontrées. La spécificité semble meilleure que celle obtenue en conditions de PCR H5KHA.

Il serait donc plus approprié d'utiliser les deux méthodes pour la détection initiale d'un foyer primaire.

8.11.2 Protocole 1

Amorces

H5-kha-1: CCT CCA GAR TAT GCM TAY AAA ATT GTC

H5-kha-3: TAC CAA CCG TCT ACC ATK CCY TG

Remarquer l'insertion de nucléotides dégénérés, comme indiqué ci-dessus en gras.

Protocole

Utiliser le kit Qiagen OneStep RT-PCR (numéro de catalogue : 210212) pour la préparation de volumes de 50 µL destinés à la PCR.

Réactif	Concentration finale	Volume requis pour une réaction (µL)	Total (µL)
Eau stérile exempte de Rnase	/	28,8	
Tampon PCR (5×, fourni dans le kit Qiagen OneStep RT-PCR)	1×	10	
Mélange de dNTP (10 mM de chaque, fourni dans le kit Qiagen)	0,4 mM de chaque	2	
Amorce H5-kha-1 (50 pmol/µL, 50 µM)	1 µM	1	
Amorce H5-kha-3 (50 pmol/µL, 50 µM)	1 µM	1	
Inhibiteur de RNase (40 U/µL, Promega)	8 U	0,2	
Mélange d'enzymes pour PCR à une étape (fourni dans le kit Qiagen)		2	
Volume excluant la cible		45	
Volume d'ARN extrait		5	
Volume réactionnel final		50	

Conditions du processus cyclique

	94 °C	94 °C		68 °C	68 °C	
50 °C	15 min	30 sec	58 °C	2 min	7 min	4 °C
30 min			1 min 40 cycles			∞

L'amplicon est identifié sur gel d'agarose à 2 % ou sur gel SDS-acrylamide à 7 %, coloré à l'argent. La taille du fragment amplifié attendu est de 300–320 pb.

8.11.3 Protocole 2**Amorces**

J3 : GAT AAA TTC TAG CAT GCC ATT CC

B2a : TTT TGT CAA TGA TTG AGT TGA CCT TAT TGG

Protocole

Utiliser le kit Qiagen OneStep RT-PCR (numéro de catalogue 210212) pour la préparation de volumes de 50-μL destinés à la PCR.

Réactif	Concentration finale	Volume requis pour une réaction (μL)	Total (μL)
Eau stérile exempte de Rnase	/	28,8	
Tampon PCR (5×, fourni dans le kit Qiagen OneStep RT-PCR)	1×	10	
Mélange de dNTP (10 mM de chaque, fourni dans le kit Qiagen)	0,4 mM de chaque	2	
Amorce J3 (50 pmol/μL, 50 μM)	1 μM	1	
Amorce B2a (50 pmol/μL, 50 μM)	1 μM	1	
Inhibiteur de RNase (40 U/μL, Promega)	8 U	0,2	
Mélange enzymatique pour RT-PCR à une étape (kit Qiagen)		2	
Volume excluant la cible		45	
Volume d'ARN extrait		5	
Volume réactionnel final		50	

Conditions du processus cyclique

	94 °C	94 °C		72 °C	72 °C	
50 °C	15 min	45 sec	50 °C	2 min	10 min	4 °C
30 min			45 sec 35 cycles			∞

L'amplicon est identifié sur gel d'agarose à 2 % ou sur gel SDS-acrylamide à 7 %, coloré à l'argent. La taille du fragment attendu est de 300–320 pb.

8.12 Protocole de détection spécifique du sous-type du virus de l'influenza aviaire H7, par RT-PCR en point final

Ce protocole de RT-PCR en deux étapes a donné de bons résultats dans divers tests, menés dans le cadre du projet européen AVIFLU (Slomka *et al.* 2007). Il permet la détection classique de l'amplicon, par

électrophorèse en gel d'agarose avec coloration au BET ou en gel SDS-PAGE avec coloration à l'argent.

L'amplicon couvre le site de clivage HA ; son séquençage peut fournir l'information concernant le pathotype, c'est-à-dire IAFP ou IAHP.

Cette RT-PCR en deux étapes génère un amplicon de 200-220 pb.

8.12.1 Préparation de l'ADNc

Amorces

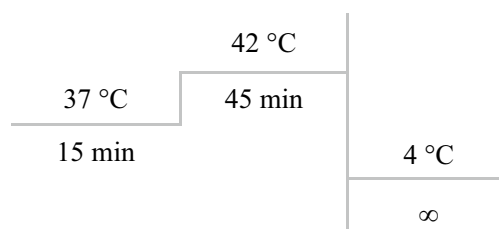
GK 7,3 5'-ATG TCC GAG ATA TGT TAA GCA-3'

GK 7,4 5'-TTT GTA ATC TGC AGC AGT TC-3'

Protocole

Réactif	Concentration finale	Réaction 1 × (μL)
ARN/		10
Amorce GK 7,3 (50 μM)	2,5 μM	1
Chauffer jusqu'à 95 °C pendant 2 min puis placer immédiatement le mélange sur de la glace		
Ajouter les réactifs suivants :		
Eau exempte de Rnase	/	3
Tampon M-MLVRT (5×)	1×	4
Mélange de dNTP (10 mM)	0,5 mM de chaque	1
Inhibiteur de RNase (40 U/μL)	20 U	0,5
MMLV-RT (200 U/μL)	100 U	0,5
Volume réactionnel final		20

Conditions du processus cyclique



8.12.2 Amplification d'ADNc par PCR

Ce protocole a été évalué à l'aide des réactifs contenus dans le kit AB Gene (numéro de catalogue : AB-0575/DC/LD/A).

Protocole

Réactif	Concentration finale	Réaction 1× (μL)
Eau exempte de RNase	/	18
Mélange Reddy mélange mère pour PCR contenant des dNTP (2×)	1×	25
Amorce GK 7,3 (50 μM)	1 μM	2
Amorce GK 7,4 (50 μM)	1 μM	1
Volume total		45
ADNc		5
Volume réactionnel final		50

Conditions du processus cyclique

94 °C	94 °C		72 °C	72 °C	
30 min	30 sec	52 °C	45 sec	4,15 min	4 °C
		30 sec			∞
		35 cycles			

L'amplicon est identifié sur gel d'agarose à 2 % ou sur gel SDS-acrylamide à 7 %, coloré à l'argent. La taille du fragment attendu est de 200-220 pb.

8.13 Détection du virus de l'influenza de type A par PCR qualitative en temps réel (M Gene)

8.13.1 Détection d'ARN de type A par RT-PCR en temps réel

Ce protocole fait usage de la série d'amorces sondes élaborée précédemment par Spackman *et al.* (2002). Le protocole de base a été évalué par d'autres auteurs (Spackman *et al.* 2002 ; Slomka *et al.* 2007 ; Van Borm *et al.* 2007). Le protocole de rRT-PCR en une étape décrit ci-dessous fait usage du kit QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen, numéro de produit : 204643).

Amorces

Directe M+25 : AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG

Reverse M-124: TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG

Sonde

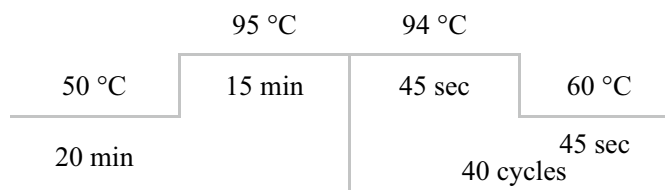
FAM M+64 : FAM-5'-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-3'-TAMRA

Protocole

Réactif	Concentration finale	Réaction 1 × (μL)
Sonde FAM M+64 (1 μM)	100 nM	2,5
Mélange mère QuantiTect Multiplex RT-PCR (2×)	1×	12,5
Amorce M+25F (5 μM)	300 nM	1,5
Amorce M-124R (5 μM)	300 nM	1,5
Mélange QuantiTect Multiplex RT	/	0,2
RNase-free water	/	1,8
Volume total		20
Vortexer le mélange pendant quelques secondes.		
Répartir des parties aliquotes de 20 μL dans chaque tube.		
ARN		5
Volume réactionnel final		25

Conditions du processus cyclique

Ce protocole a été évalué sur les plateformes en temps réel : AB7300 (Applied Biosystems) et Rotorgene 6000 (Corbett). Les laboratoires qui utilisent des plateformes d'instrumentation différentes doivent d'abord examiner ces conditions avec soin et de façon critique, car elles peuvent ne pas être optimales sur des instruments différents.



8.14 Détection du sous-type hémagglutinine H5 du virus de l'influenza, par RT-PCR qualitative en temps réel, réalisé en une étape

Ce protocole a été élaboré et validé au laboratoire de référence italien de l'OIE/FAO (IZSVe, Legnaro–Padoue). Il peut être couplé à une détection simultanée de H7 et de H9 au cours de la PCR en temps réel. Il fournit ainsi une méthode rapide et sensible de détection des sous-types d'IA à déclaration obligatoire chez

les volailles (Monne *et al.* 2008). Ce protocole a été validé sur une grande variété d'isolats H5 appartenant à la lignée eurasiatique. Ces isolats comprennent les virus récents d'IAFP H5 circulant chez les volailles et les oiseaux sauvages, ainsi que les virus IAHP H5N1 circulant en Asie centrale et de l'Est, au Moyen-Orient et en Afrique.

Le protocole a été élaboré à l'aide du kit QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen, numéro de produit : 204643).

Les nucléotides dégénérés sont indiqués en gras.

Amorces

Directe H5 F : TTA TTC AAC AGT GGC GAG

Inverse H5NE-R : CCA **K**AA AGA TAG ACC AGC

Sonde

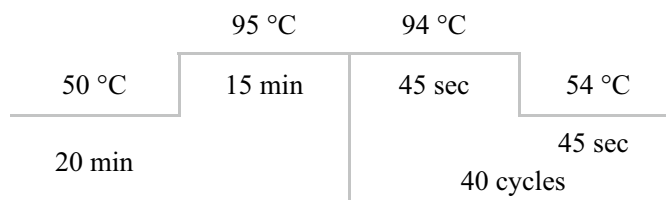
FAM H5 : FAM-5'-CCC TAG CAC TGG CAA TCA TG-3'-TAMRA

Protocole

Réactif	Concentration finale	Réaction 1 × (μL)
Sonde FAM H5 (1 μM)	150 nM	3,75
Mélange mère QuantiTect Multiplex RT-PCR (2×)	1×	12,5
Amorce H5F (5 μM)	300 nM	1,5
Amorce H5NE-R (5 μM)	300 nM	1,5
Mélange QuantiTect Multiplex RT		0,2
Eau exempte de RNase	/	0,55
Volume total		
Vortexer le mélange pendant quelques secondes.		20
Répartir des parties aliquotes de 20 μL dans chaque tube.		
ARN		5
Volume réactionnel final		25

Conditions du processus cyclique

Ce protocole a été évalué sur les plateformes en temps réel : AB7300 (Applied Biosystems) et Rotorgene 6000 (Corbett). Les laboratoires qui utilisent des plateformes d'instrumentation différentes doivent d'abord examiner ces conditions avec soin et de façon critique, car elles peuvent ne pas être optimales sur des instruments différents.



8.15 Protocole alternatif pour la détection de virus de l'influenza aviaire H5 par RT-PCR en temps réel

Amorces et sonde

Les amorces et la sonde ont été modifiées par rapport à celles conçues initialement par Spackman *et al.* (2002). Les séquences modifiées sont les suivantes (Slomka *et al.* 2007b) :

H5LH1 : ACA TAT GAC TAC CCA **CAR** TAT TCA G

H5RH1 : AGA CCA GCT **AYC** ATG ATT GC

H5PRO : FAM-TC**W** ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA

Les nucléotides dégénérés sont indiqués en gras. Les amorces et la sonde ci-dessus comportent des modifications permettant la détection des virus actuels de l'influenza aviaire eurasiatique H5 (incluant les virus IAHP).

Mélange mère pour PCR H5 en temps réel

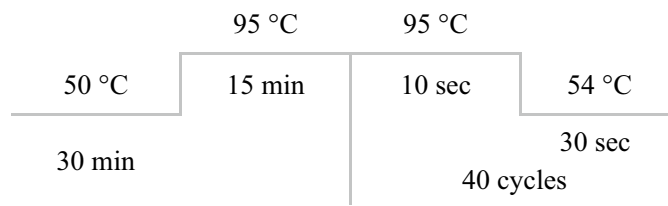
Le protocole suivant est basé sur la partie Méthodes de Spackman *et al.* (2002). Il a été mis en œuvre à l'aide du kit QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen, numéro de produit : 204643).

Protocole

Réactif	Concentration finale	Réaction 1× (μL)
Eau exempte de RNase	/	4,95
Mélange mère QuantiTect Multiplex RT-PCR (2×)	1×	12,5
Amorce H5LH1 (5 μM)	400 nM	2
Amorce H5RH1 (5 μM)	400 nM	2
Sonde FAM PRO-H5 (6 μM)	300 nM	1,25
RNasine (40 U/μL)	4 U	0,1
Mélange QuantiTect Multiplex RT		0,2
Volume total		23
Vortexer le mélange pendant quelques secondes.		
Répartir des parties aliquotes de 23 μL dans chaque tube.		
ARN		2
Volume réactionnel final		25

Conditions du processus cyclique

Ce protocole a été évalué sur les plateformes en temps réel : AB7300 (Applied Biosystems) et Rotorgene 6000 (Corbett). Les laboratoires qui utilisent des plateformes d'instrumentation différentes doivent d'abord examiner ces conditions avec soin et de façon critique, car elles peuvent ne pas être optimales sur des instruments différents.



8.16 Détection du sous-type hémagglutinine H7 du virus de l'influenza, par PCR qualitative en temps réel, réalisé en une étape (Protocole IZSVe)

Ce protocole a été élaboré et validé au laboratoire de référence italien de l'OIE/FAO (IZSVe, Legnaro-Padoue). Il peut être couplé à la détection simultanée de H5 et H9 au cours de la rPCR et fournit ainsi une méthode rapide et sensible pour la détection chez les

volailles des sous-types d'IA à déclaration obligatoire (Monne *et al.* 2008). Ce protocole a été validé sur une grande variété d'isolats H7 appartenant à la lignée eurasiatique et incluant les virus récents d'IAFP H7 qui circulent chez les volailles et les oiseaux sauvages en Europe et en Afrique, ainsi que les virus IAHP H7 responsables des foyers survenus récemment en Europe (notamment H7N1 en Italie et H7N7 aux Pays-Bas).

Le protocole a été élaboré à l'aide du kit QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen, Code 204643).

Amorces

Directe **H7 F** : TTT GGT TTA GCT TCG GG

Inverse **H7-degR** : GAA GAM AAG GCY CAT TG

Les nucléotides dégénérés sont indiqués en gras.

Sonde

VIC **H7** : VIC-5'-CAT CAT GTT TCA TAC TTC TGG CCA T-3'-TAMRA

Protocole

Réactif	Concentration finale	Réaction 1× (μL)
Sonde VIC H7 (1 μM)	150 nM	3,75
Mélange mère QuantiTect Multiplex RT-PCR (2×)	1×	12,5
Amorce H7F (10 μM)	300 nM	0,75
Amorce H7-degR (10 μM)	900 nM	2,25
Mélange QuantiTect Multiplex RT		0,2
Eau exempte de Rnase	/	0,55
Volume total		20
Vortexer le mélange pendant quelques secondes.		
Répartir des parties aliquotes de 20 μL dans chaque tube		
ARN		5
Volume réactionnel final		25

Conditions du processus cyclique

	95 °C	94 °C	
50 °C	15 min	45 sec	54 °C
20 min		45 sec	
		40 cycles	

Références

- Cattoli G, Drago A, Maniero S *et al.* (2004) Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol* 33(4):432-437
- EC (European Commission) (2006) Commission Decision 2006/437/EC of 4 August 2006 approving a Diagnostic Manual for avian influenza as provided for in Council Directive 2005/94/EC (notified under document number C(2006) 3477) Available at: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2006/l_237/l_23720060831_en00010027.pdf
- Fouchier RA, Bestebroer TM, Herfst S *et al.* (2000) Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J Clin Microbiol* 38(11):4096-4101
- Marti NB, Del Pozo ES, Casals AA *et al.* (2006) False-positive results obtained by following a commonly used reverse transcription-PCR protocol for detection of Influenza A virus. *J Clin Microbiol* 44(10):3845
- Monne I, Ormelli S, Salviato A *et al.* (2008) Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7 and H9 avian influenza viruses. *J Clin Microbiol* 46(5):1769-1773
- OIE (World Organization for Animal Health) (2004) Highly Pathogenic Avian Influenza. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Edition, Office International des Epizooties, Paris, France, 258
- Slomka MJ, Coward VJ, Banks J *et al.* (2007) Identification of sensitive and specific avian influenza polymerase chain reaction methods through blind ring trials organized in the European Union. *Avian Dis* 51(1 Suppl):227-234
- Slomka MJ, Pavlidis T, Banks J *et al.* (2007b) Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis* 51(1 Suppl):373-377
- Spackman E, Senne DA, Myers TJ *et al.* (2002) Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol* 40(9):3256-3260
- Van Borm S, Steensels M, Ferreira HL *et al.* (2007) A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. *Avian Dis* 51(1 Suppl):213-220

Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de l'infection causée par le virus de la maladie de Newcastle ; directives pour la visite des élevages et le diagnostic différentiel

9

Calogero Terregino et Ilaria Capua

9.1 Introduction

Les principales preuves concernant les aspects cliniques de l'infection par le paramyxovirus aviaire de type 1 (APMV-1) ont été obtenues chez les volailles et notamment les poulets. Beard et Hanson (1984) ont identifié cinq pathotypes viraux (tableau 9.1), en se basant sur l'incidence et la sévérité des manifestations cliniques. Les manifestations cliniques de cette maladie sont très variables et aucun signe ni lésion ne peut être considéré comme étant pathognomonique (McFerran et McCracken 1988).

Les signes cliniques engendrés par un même virus sont influencés par de nombreux facteurs. Ces facteurs incluent l'espèce infectée, l'âge et l'état de productivité ou de santé de l'hôte, notamment lorsqu'il y a co-infection avec d'autres virus, bactéries ou parasites. Par ailleurs, la vaccination contre l'infection causée par le virus de la maladie de Newcastle (MN) est menée à l'échelle mondiale. Les signes cliniques peuvent donc varier selon le degré d'immunité envers le virus, laquelle peut être acquise passivement par l'intermédiaire des anticorps maternels ou induite activement par le biais de la vaccination. L'immunité

consécutrice à la vaccination contre la MN est influencée par de nombreux facteurs. Ces facteurs comprennent les maladies immunodépressives sous-jacentes, la qualité et le type du vaccin, ainsi que le nombre d'administrations. Les signes cliniques de l'infection même avec des virus hautement virulents peuvent donc ne pas être aussi manifestes que ceux décrits et illustrés dans ce chapitre.

9.2 Poulets et dindes

La MN vélogène est une affection aiguë, atteignant les oiseaux de tous âges et de toutes catégories. Chez les oiseaux immunologiquement naïfs, la MN est souvent caractérisée par l'apparition soudaine des manifestations cliniques. Certains oiseaux meurent brutalement, avant l'apparition des signes cliniques, alors que d'autres présentent des signes de maladie plus courants, tels que l'anorexie, les plumes ébouriffées et les ailes tombantes. Chez les pondeuses, le signe le plus marqué est la baisse de la production d'œufs ou l'arrêt total de la ponte. Les œufs sont souvent malformés, avec des coquilles minces et

Tableau 9.1 Évolution clinique de l'infection par le paramyxovirus aviaire de type 1 (APMV-1) chez les poulets (*Gallus gallus* var. dom.) (Version modifiée des travaux de Beard et Hanson, 1984), selon le pathotype et le tropisme du virus

	Vélogène		Mésogène	Lentogène	Entérique asymptomatique
	Viscérotrope	Neurotrope			
Diarrhée	+++	-	-	-	-
Détresse respiratoire	-	+++	++	(+)	-
Signes du système nerveux central	(++)	+++	(++)	-	-
Baisse de la production d'œufs	+++	+++	++	(+)	-
Morbidité	+++	+++	++	(+)	-
Mortalité	+++	+++	(+)	-	-

Gravité des signes observés : +++ grave, ++ intermédiaire, + bénin, () signes cliniques observés uniquement chez les oiseaux atteints ou les oiseaux jeunes, - absent

un albumen aqueux. Selon le tropisme de la souche incriminée, les manifestations cliniques apparaissent en majeure partie sur le tractus gastro-intestinal (souche dite vélogène viscérotrope, MNVV) et causent une entérite grave, caractérisée par une diarrhée, souvent de couleur verte. En revanche, dans les formes vélogènes neurotropes, on observe principalement une détresse respiratoire, suivie de troubles du système nerveux central (Figs 9.1-9.6). Pour les deux formes vélogènes, les taux de mortalité des oiseaux pleinement sensibles atteignent les 90-100 %. Certains virus vélogènes provoquent une maladie moins grave chez les dindes que chez les poulets.

En revanche les manifestations cliniques d'une infection par des virus mésogènes dépendent beaucoup de l'âge des animaux infectés. Chez les jeunes oiseaux, la morbidité au sein d'un troupeau peut

atteindre 100 %, alors que chez les poulets adultes en bonne santé, elle se situe entre 5 % et, exceptionnellement, 50 %. Les principaux signes cliniques de l'infection par un virus mésogène sont une baisse de la production d'œufs, des œufs de mauvaise qualité (sans coquille ou à coquille décolorée) (Figs 9.7, 9.8), ainsi qu'une diminution de la consommation de nourriture. Toutefois, la plupart des virus dits mésogènes ne sont pas d'origine sauvage. Il s'agit plutôt de virus vélogènes ayant été atténués par diverses techniques de laboratoire. Il existe des preuves démontrant que ces virus peuvent réintégrer le phénotype virulent après un passage sur poulets.

Les pathotypes lentogènes tels que B1 et La Sota, sont généralement non pathogènes chez les oiseaux adultes et sont utilisés comme vaccins atténués. S'ils sont administrés à des poulets de 1 à 7 jours,



Fig. 9.1 Poules pondeuses, infectées naturellement par un virus de la maladie de Newcastle (MN) appartenant au pathotype vélogène neurotrope et présentant des signes nerveux.



Fig. 9.2 Poule pondeuse, infectée naturellement par le virus MN appartenant au pathotype vélogène neurotrope et présentant des signes nerveux graves accompagnés de torticollis et de parésie.



Fig. 9.3 Poule pondeuse, infectée naturellement par le virus MN, appartenant au pathotype vélogène neurotrope et présentant un torticollis.



Fig. 9.4 Poule pondeuse en cage, infectée naturellement par le virus MN, appartenant au pathotype vélogène neurotrope et présentant des signes nerveux accompagnés de parésie.



Fig. 9.5 Poule pondeuse, infectée naturellement par le virus MN appartenant au pathotype vélogène neurotrope et présentant des signes nerveux accompagnés d'une incoordination des mouvements musculaires.



Fig. 9.6 Poulet infecté expérimentalement par le virus MN appartenant au pathotype vélogène neurotrope et présentant un torticollis et une paralysie des doigts. (Avec l'aimable autorisation du Dr Zenon Minta.)



Fig. 9.7 Œufs à coquille molle, de forme irrégulière et décolorés, produits par des poules atteintes de MN.

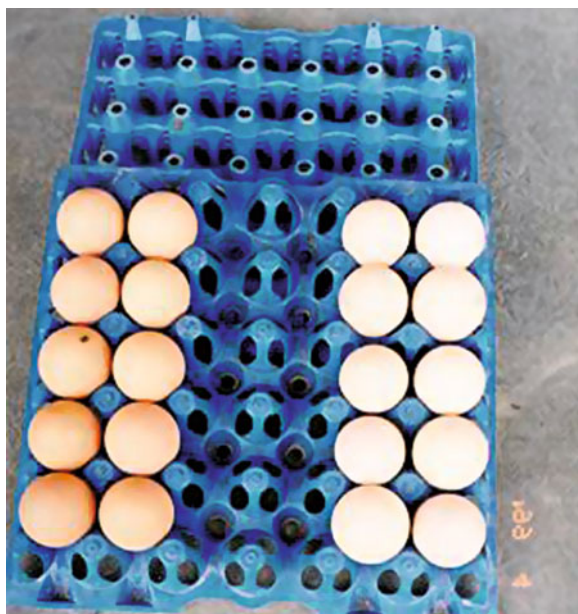


Fig. 9.8 Œufs décolorés produits par des poules atteintes de MN (à droite).

ces mêmes virus peuvent entraîner une diminution de la consommation alimentaire et des troubles respiratoires caractérisés par des éternuements et des crépitements (Alexander, 2003).

En sus de l'âge des animaux infectés, les co-infections par d'autres microorganismes dont *Mycoplasma*, *Escherichia coli* ou d'autres pathogènes viraux de type (metapneumovirus) APMV, peuvent entraîner une variabilité de l'évolution clinique de la MN ainsi que des signes cliniques plus prononcés (Gross 1961; Kim *et al.* 1978, Nakamura *et al.* 1994). Les conséquences

de l'infection par le virus MN sont également fortement influencées par le statut immunitaire de l'animal. Par exemple, chez les animaux immunodéficients infectés par des souches de MN de faible virulence, l'infection concomitante par d'autres virus (tels que le virus de la bursite infectieuse responsable de la maladie de Gumboro, le virus de l'anémie infectieuse du poulet, le virus de l'entérite hémorragique ou le virus de la maladie de Marek) peut conduire à une maladie clinique manifeste et à des pertes économiques liées à la diminution des performances et à la mortalité.

9.3 Autruches

Les autruches (*Struthio camelus*) sont considérées comme étant modérément sensibles à la MN. Des foyers ont été rapportés dans les zoos et les élevages d'autruches (Alexander 2000). Les signes cliniques de la maladie incluent le manque d'appétit, l'apathie, l'ataxie et le torticolis. Chez les animaux adultes, la MN dure environ de 3 à 16 jours (Kauker et Siegert 1957 ; Verwoerd 1995). Les manifestations cliniques sont prédominantes chez les oiseaux plus jeunes, âgés de 5 à 9 mois. Les signes cliniques sont ceux impliquant le système nerveux tels que la paralysie atonique du cou, le torticolis, les convulsions rythmiques des muscles du dos, l'œdème de la tête et la paralysie totale. Ils provoquent la mort d'environ 30 % des animaux infectés (Samberg *et al.* 1989). Des manifestations cliniques différentes ont été rapportées chez les poussins d'autruches élevés en cage, notamment la détresse respiratoire provoquée par une trachéite hémorragique (Huchzermeyer 1996).

9.4 Gibiers à plumes

Les cas de manifestations cliniques faisant suite à une infection naturelle ont rarement été rapportés chez les oiseaux de gibier ; et ce, malgré le fait que les perdrix et les faisans soient hautement sensibles à la MN (Aldous et Alexander 2008). Chez les faisans, les signes cliniques rapportés dans les foyers naturels sont très variables et ressemblent à ceux observés chez les poulets. La maladie peut se manifester sous une forme aiguë, apparaissant de façon soudaine et s'accompagnant de signes nerveux (incoordination, tremblements de la tête) et d'une mortalité élevée. Elle peut aussi se présenter sous une forme bénigne, avec pour seuls signes cliniques perceptibles la détresse respiratoire, la cécité et l'ataxie. La MN existe sous une forme subclinique (asymptomatique) ainsi que plusieurs formes intermédiaires. Les signes cliniques se traduisent par des ailes tombantes, de l'abattement, un manque d'appétit, une détresse respiratoire avec bec béant, de la toux, des éternuements, des gargarissements et des râles, ainsi qu'une diarrhée vert jaunâtre. Dans les élevages de pondeuses, des signes précoces de la maladie se traduisent souvent par une chute soudaine de la production d'œufs ainsi qu'une grande proportion d'œufs présentant des coquilles anormales (molles). Les oiseaux jeunes sont particulièrement sensibles, avec une mortalité pouvant être extrêmement élevée et des signes nerveux souvent permanents chez les survivants.

9.5 Canards, oies et cygnes

Certains oiseaux aquatiques sont connus pour être particulièrement résistants aux manifestations cliniques de la MN, malgré leur sensibilité à l'infection, mais celle-ci a parfois été associée à un état clinique bénin, voire sévère. Dans les foyers concernant des oies, des signes vont des plumes ébouriffées ou de l'abattement à une infection systémique sévère accompagnée d'anorexie, de diarrhée blanche, d'écoulements oculaire et nasal et de plaques rouges et œdémateuses chez certains oiseaux. La maladie se propage très rapidement et présente une létalité élevée. Certains oiseaux meurent en une nuit ; d'autres meurent peu après l'apparition des signes cliniques et d'autres encore après une évolution relativement longue de la maladie (allant de 3 à 12 jours après l'infection).

La maladie naturelle de canards domestiques n'est qu'exceptionnellement rapportée et s'accompagne de mortalité et de signes nerveux aigus (Kingston *et al.* 1978). Chez les Anatidés sauvages, l'infection naturelle conduisant à une maladie clinique n'a été que rarement citée. Bozorgmehri-Fard et Keyvanfar (1979) ont constaté des morts rapides chez des sarcelles capturées (*Anas crecca*) à partir desquelles le virus APMV-1 avait été isolé. Après infection naturelle par l'APMV-1, Estudillo (1972) a décrit des signes respiratoires, entériques et affectant le système nerveux central chez un cygne tuberculé (*Cygnus olor*) et un cygne trompette (*Cygnus buccinator*) ainsi que des signes respiratoires et affectant le système nerveux central chez une oie des neiges (*Chen caerulescens*) et une oie canadienne (*Branta canadensis*).

Chez des colverts adultes, les signes cliniques sont apparus 2 jours après l'inoculation expérimentale de la forme hautement virulente du virus MN, isolé à partir de poulets (Friend et Trainer 1972 ; Friend et Franson, 1999). Les colverts étaient initialement étendus sur le sternum, les pattes légèrement allongées sur les côtés. Ils devenaient ensuite progressivement incapables de se lever lorsqu'on les approchait et effectuaient un mouvement de pédalage des deux pattes, en tentant vainement de s'enfuir. La respiration de ces oiseaux était rapide et profonde. Les autres colverts étaient incapables de soutenir la tête. Un torticolis et un fléchissement des ailes sont apparus au quatrième jour, suivis d'une paralysie de l'une ou des deux pattes. Les tremblements musculaires étaient également de plus en plus perceptibles à ce stade.

9.6 Pigeons (*Columba livia*)

Chez les pigeons, les manifestations cliniques de l'infection par le virus MN sont très variables et dépendent principalement de l'âge et du statut immunitaire de l'oiseau, ainsi que de la pathogénicité de la souche virale responsable de l'infection. Les pigeons et les Colombiformes en général sont essentiellement infectés par l'APMV-1 variant appelé paramyxovirus de type 1 variant pigeon (PPMV-1). Ce virus est actuellement enzootique chez les populations de pigeons du monde entier. L'infection par le PPMV-1 doit toujours être envisagée lorsque des pigeons sont atteints de mortalité excessive ou de maladie bénigne à sévère. Les pigeons juvéniles sont très sensibles à l'infection. La morbidité et la mortalité peuvent parfois atteindre les 100 %, avec prédominance des signes nerveux. En revanche, les adultes peuvent connaître une guérison complète après 10-14 jours de maladie. Chez les oiseaux adultes, la morbidité est variable et se situe le plus souvent en dessous des 10 %. La mort survient à la suite d'une maladie chronique et d'une émaciation. L'infection subclinique semble également courante et contribue à la propagation du virus.

La période d'incubation est de 7-12 jours (Alexander *et al.* 1984) ; le virus est excrété dans les fèces dès le 2^e jour suivant l'infection (Alexander et Parsons 1984). L'infection peut se propager directement pendant la période d'excrétion ou indirectement à travers les matières contaminées (cages, véhicules de transport, matériel d'exposition).

Chez les oiseaux naïfs, les signes cliniques sont semblables à ceux de la forme neurotrope de la MN affectant les poulets. Les oiseaux atteints présentent,

initialement, des signes généraux tels qu'un mauvais état de santé, une diminution de la consommation d'aliment, une augmentation du besoin de boire (polydipsie), une augmentation de l'excrétion d'urée, une léthargie, une incapacité à voler et des plumes ébouriffées. Au cours des jours suivants, il y a apparition des signes cliniques des troubles nerveux : incoordination, démarche anormale, tremblements, parésie des pattes et/ou des ailes, fléchissement de la tête, torticolis et diarrhée verdâtre.

9.7 Oiseaux de compagnie

Chez les perroquets, les manifestations cliniques de l'infection par l'APMV-1 sont très variables et dépendent de l'espèce et du virus impliqué dans le foyer (Gerlach 1994 ; Kaleta et Baldhof 1988). Le temps d'incubation est généralement de 3-6 jours, mais peut se prolonger jusqu'à 14 jours.

Dans certains foyers, la mortalité peut atteindre les 100 %. Mais dans d'autres cas, elle peut ne pas dépasser 22 %. La morbidité, la mortalité et les manifestations cliniques sont très variables selon les différentes espèces (Erickson *et al.* 1977b ; Sallerman 1973). Les signes cliniques peuvent être non spécifiques, notamment l'abattement, l'apathie et les plumes ébouriffées, la diarrhée verdâtre, la polyurie ainsi que des signes ultérieurs d'une atteinte du système nerveux. Certains oiseaux de compagnie peuvent guérir de l'infection et il a été démontré qu'ils excrètent le virus pendant un intervalle de temps prolongé – parfois même pendant plus d'une année, chez certains psittacidés (Erickson 1977a).

Après infection expérimentale avec des titres élevés d'une souche hautement virulente chez les



Fig. 9.9 Canari (*Serinus canarius*) atteint par du virus MN virulent (MNV) et présentant de l'abattement et des plumes ébouriffées en phase aiguë de la maladie.



Fig. 9.10 Canari (*Serinus canarius*) atteint du virus MNV et présentant des signes nerveux.

poulets, les canaris (*Serinus canarius*) se sont montrés résistants à la maladie clinique (Terregino *et al.* 2004). Les signes cliniques, s'ils sont présents, peuvent inclure une prostration (Fig. 9.9) ainsi que des signes nerveux (incoordination, torticolis, allongement sur le dos) précédant la mort (Fig. 9.10).

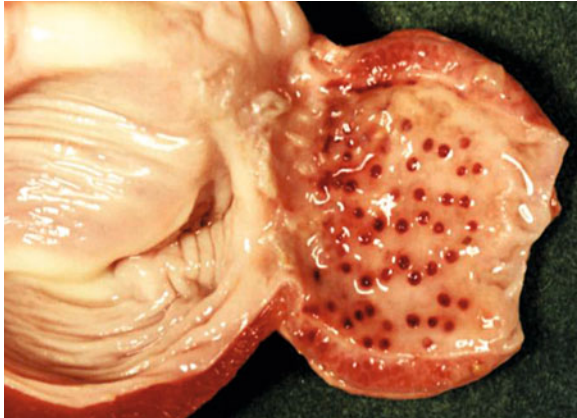


Fig. 9.11 Pétéchies autour des conduits de la zone glandulaire du proventricule. (Avec l'aimable autorisation de A. H. Zahdeh J.)



Fig. 9.12 Pintade, infectée naturellement par du virus MNV et présentant une pancréatite et des lésions hémorragiques nécrotiques au niveau de l'intestin.

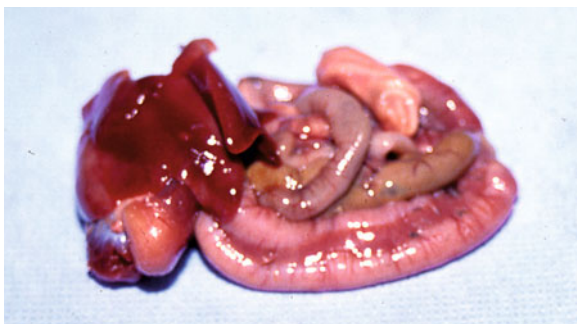


Fig. 9.13 Faisan, infecté naturellement par du virus MNV et présentant une pancréatite et une duodénite.

9.8 Lésions macroscopiques

De même que pour les signes cliniques, les lésions macroscopiques et les organes atteints des oiseaux infectés par le virus MN dépendent du pathotype du virus en cause, de l'hôte et de tous autres facteurs

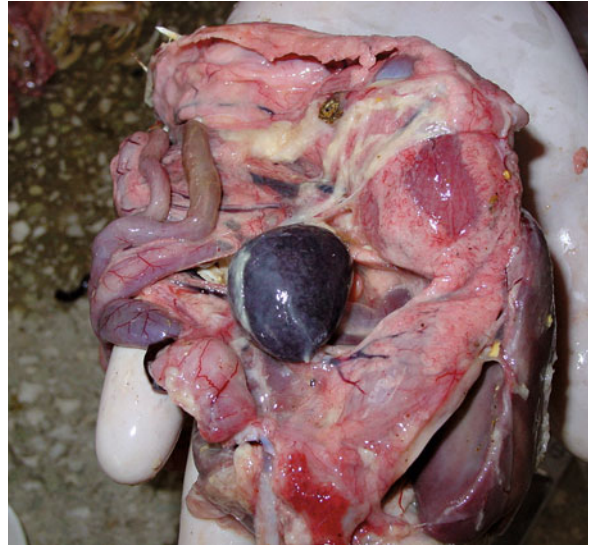


Fig. 9.14 Poulet de chair, infecté naturellement par du virus MNV et présentant une hypertrophie de la rate et une marbrure provoquée par la nécrose. (Avec l'aimable autorisation de Corrie Brown.)



Fig. 9.15 Poulet, infecté naturellement par du virus MNV et présentant des lésions hémorragiques au niveau des amygdales caecales, visibles à travers la paroi de la séreuse.



Fig. 9.16 Poulet, infecté naturellement par du virus MNV et présentant des lésions hémorragiques nécrotiques au niveau du tissu lymphatique intestinal.



Fig. 9.17 Poulet, infecté naturellement par du virus MNV et présentant des lésions hémorragiques nécrotiques au niveau du tissu lymphatique intestinal. (Avec l'aimable autorisation de Zenon Minta.)

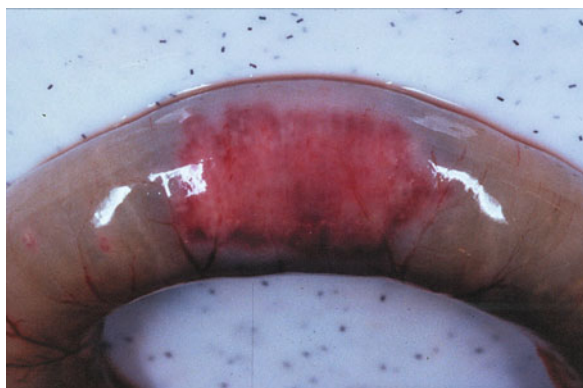


Fig. 9.18 Poulet, infecté expérimentalement par du virus MNV et présentant des lésions hémorragiques nécrotiques au niveau du tissu lymphatique intestinal et visibles à travers de la séreuse intestinale. (Avec l'aimable autorisation de Zenon Minta.)



Fig. 9.19 Pintade, infectée expérimentalement par du virus MNV et présentant des lésions hémorragiques nécrotiques du tissu lymphatique intestinal, visibles à travers la paroi intestinale.

déterminant la gravité de la maladie. Aucune lésion pathognomonique n'est associée à aucune variante particulière de la maladie. Les lésions macroscopiques peuvent également être inexistantes.

Suite à une atteinte par le virus MN virulent, les cadavres d'oiseaux agonisants sont généralement d'aspect fiévreux et déshydraté. Dans les formes aiguës de l'infection causée par ces virus, des hémorragies diffuses peuvent être les seules lésions manifestes. Les lésions hémorragiques associées à une infection par du virus MN virulent se situent souvent sur l'intestin, majoritairement au niveau de la muqueuse du proventricule (Fig. 9.11), du cæcum et de l'intestin grêle. Des foyers nécrotiques sont parfois observés sur le pancréas (Figs 9.12, 9.13). Des pétéchies et de petites ecchymoses sont sou-

vent présentes sur la muqueuse du proventricule, à proximité de la base des papilles, et sont concentrées autour des orifices postérieurs et antérieurs.

La rate, les plaques de Peyer, les amygdales cæcales et d'autres formations lymphoïdes (Fig. 9.14) situées principalement au niveau de la paroi intestinale, sont considérablement atteintes, d'où le terme viscérotrope attribué à cette forme de MN (Figs 9.15-9.17). Ces zones deviennent progressivement œdémateuses, hémorragiques, nécrotiques et ulcéreuses. Chez les poulets morts de MNV, les zones lymphoïdes peuvent parfois être observées sans ouverture des intestins (Figs 9.18-9.20).

Les ovaires peuvent devenir œdémateux, hémorragiques ou dégénérants. Chez les pondeuses, on observe fréquemment une péritonite avec ponte



Fig. 9.20 Poule pondeuse, infectée naturellement par du virus MNV et présentant des lésions hémorragiques nécrotiques du tissu lymphatique intestinal, visibles à travers la paroi intestinale.



Fig. 9.21 Poule pondeuse infectée par la MN et présentant une péritonite avec pont abdominal. (Avec l'aimable autorisation de Desiree Jansson.)

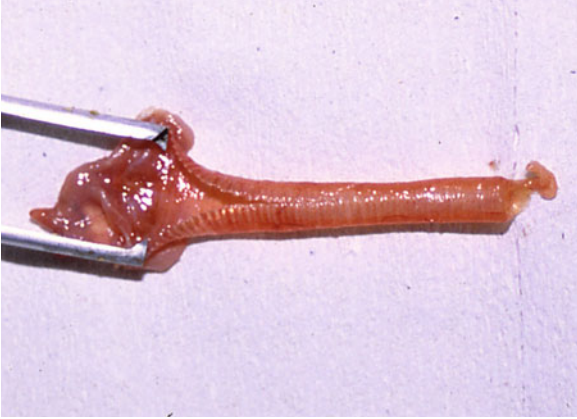


Fig. 9.22 Faisan, infecté naturellement par du virus MNV et présentant des hémorragies au niveau du larynx.

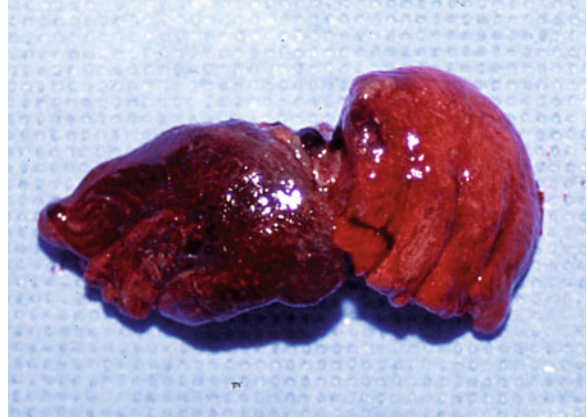


Fig. 9.23 Pintade, infectée naturellement par du virus MNV et présentant une pneumonie bilatérale accompagnée d'hémorragies.

abdominale (Fig. 9.21) causée par la MNVV ; les poules convalescentes pondent généralement des œufs rugueux et malformés.

Les lésions macroscopiques ne sont généralement pas présentes au niveau du système nerveux central des oiseaux infectés par le virus MN, indépendamment du pathotype et de l'espèce. Si la maladie se manifeste au niveau des voies respiratoires, les modifications pathologiques macroscopiques consistent principalement en une hémorragie de la muqueuse et une congestion importante de la trachée et des poumons (Figs 9.22, 9.23). L'aérosacculite peut être observée, même après infection par des souches de faible virulence, et favorise une infection bactérienne secondaire accompagnée d'un épaissement des sacs aériens et d'exsudats catarrhaux et caséux.

9.9 Directives pour la visite des élevages

Lors de l'investigation des foyers suspects, il est essentiel de recueillir le détail des antécédents cliniques et des observations effectuées sur le terrain. Les informations doivent inclure l'apparition et le type des signes cliniques, la mortalité et la morbidité, l'âge et l'espèce des oiseaux, ainsi que les procédures de gestion comprenant l'historique de la vaccination (voir aussi 6.4.2 et Annexe 2).

9.9.1 Résumé des principaux signes cliniques associés à l'infection par la MN

La période d'incubation de la MN suite à une exposition naturelle, varie de 2 à 15 jours (5-6 jours en moyenne). La vitesse à laquelle les signes apparaissent, s'il en existe, dépend du virus en cause, de l'espèce hôte, de son âge et de son statut immunitaire, de l'infection par d'autres organismes, des conditions environnementales, des types d'exploitations avicoles, du mode d'exposition et de la dose. Les signes cliniques observés sur le terrain sont variables et reflètent la virulence et le tropisme du virus impliqué, ainsi que l'espèce de l'hôte, son âge et son statut immunitaire (McFerran et McCracken 1988). Chez les oiseaux non vaccinés et infectés par des virus extrêmement virulents, la MN est suspectée dans tout élevage dans lequel des morts soudaines ou une mortalité élevée apparaissent à la suite d'une prostration, d'un manque d'appétit, de signes respiratoires ou entériques et d'une chute drastique de la production d'œufs. Malgré l'absence de tout autre signe clinique, la maladie peut apparaître subitement et la mortalité peut être élevée. Dans les foyers survenus chez les poulets infectés par un virus de pathotype vélogène viscérotrope (MNVV), les signes cliniques débutent souvent par une apathie, une augmentation de la cadence respiratoire et une faiblesse et se terminent par la prostration et la mort. Lors de la panzootie provoquée par ce type de virus de 1970-1973, la maladie fut caractérisée par des signes respiratoires sévères dans des pays tels que la Grande-Bretagne (Allan *et al.* 1978) et l'Irlande du Nord (McFerran et McCracken 1988). Ces signes étaient cependant absents dans d'autres pays. Ce type de MNVV peut provoquer un œdème péri-oculaire et de la tête. Une diarrhée verte est souvent observée chez les oiseaux qui ne meurent pas en début d'infection ; des tremblements musculaires, un torticolis, une paralysie des pattes et des ailes et de l'opisthotonos peuvent être observés avant la mort. Le taux de létalité atteint souvent les 100 % dans les lots de poulets pleinement sensibles.

La forme vélogène neurotrope de la MN (MNVN) a été principalement rapportée aux États-Unis. Chez les poulets, elle est caractérisée par l'apparition soudaine d'une maladie respiratoire sévère suivie de signes nerveux apparaissant un ou deux jours plus tard. La production d'œufs chute de façon drastique mais la diarrhée est généralement absente. La morbidité peut atteindre les 100 %. Chez les lots atteints, le taux de létalité est généralement beaucoup plus faible, bien que la mortalité puisse atteindre les 50 % chez les oiseaux adultes et les 90 % chez les jeunes poulets.

Dans les cas d'infection naturelle, les souches mésogènes du virus MN provoquent généralement des maladies respiratoires. Chez les oiseaux adultes, on peut observer une chute marquée de la production d'œufs qui se prolonge parfois pendant plusieurs semaines. Les signes nerveux sont rares. La mortalité chez les volailles est généralement faible, sauf chez les oiseaux très jeunes et sensibles. Mais elle peut être considérablement affectée par des conditions aggravantes.

Les virus lentogènes n'entraînent généralement pas de maladie chez les oiseaux adultes. Chez les oiseaux jeunes et pleinement sensibles, des problèmes respiratoires graves et souvent mortels surviennent à la suite d'une infection par les souches La Sota de plus forte pathogénicité, en particulier chez les oiseaux co-infectés par d'autres microorganismes. La vaccination ou la contamination de poulets de chair sur le point d'être abattus peuvent entraîner une colisepticémie ou une aéro-sacculite aboutissant à la saisie.

Chez d'autres hôtes, les signes cliniques peuvent différer largement de ceux observés chez les poulets. Puisque les manifestations cliniques de cette maladie sont très variables et qu'aucun signe ne peut être considéré comme pathognomonique, le diagnostic absolu dépend de l'isolement et de l'identification du virus causal.

9.10 Diagnostic différentiel

Aucun des signes cliniques ni des lésions décrites ci-dessus ne sont spécifiques de la MN. Tout diagnostic clinique sur le terrain doit donc obligatoirement être confirmé en laboratoire. Les signes cliniques et l'évolution de la MNVV peuvent ressembler fortement à ceux d'un grand nombre de maladies aviaires :

- Influenza aviaire (hautement pathogène, IAHP)
- Choléra des volailles
- Laryngotrachéite (forme aiguë)
- Variole aviaire (forme diphtérique)
- Ornithose (psittacose ou chlamydiophylose) (psittacidés et pigeons)
- Bronchite infectieuse
- Maladie de Pacheco du perroquet (psittacidés)
- Infections de certains psittacidés par les paramyxovirus aviaires de types 3 et 5
- Bursite infectieuse (maladie de Gumboro) (souches très virulentes)
- Salmonellose (pigeons)

- Autres infections septicémiques (*Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*)
- Empoisonnement aigu
- Erreurs de gestion (privation d'eau, d'air et de nourriture)

Références

- Aldous EW, Alexander DJ (2008) Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): a review. *Vet J* 175(2):181-185
- Alexander DJ (2000) Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*) - A review. *Avian Pathol* 29(2):95-100
- Alexander DJ, Senne DA (2008) Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and Pneumovirus infections. In: Saif Ym (ed) *Diseases of poultry*, 12th ed. Iowa State University Press, pp 75-100
- Alexander DJ, Parsons G (1984) Avian paramyxovirus type 1 infections of racing pigeons: 2 pathogenicity experiments in pigeons and chickens. *Vet Rec* 114(19):466-469
- Alexander DJ, Wilson GW, Thain JA, Lister SA (1984) Avian paramyxovirus type 1 infection of racing pigeons: 3 epizootiological considerations. *Vet Rec* 115(9):213-216
- Allan WH, Lancaster JE, Toth B (1978) Newcastle disease vaccines – Their production and use. *FAO Animal Production and Health Series No. 10*. FAO: Rome, Italy
- Beard CW, Hanson RP (1984) Newcastle Disease. In: “Diseases of Poultry” (Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW ed), 8th ed, Iowa State University Press: Ames, IA, pp 452-470
- Bozorgmehri-Fard MH, Keyvanfar H (1979) Isolation of Newcastle disease virus from teals (*Anas crecca*) in Iran. *J Wildl Dis* 15(2):335-337
- Erickson GA, Maré CJ, Gustafson GA *et al.* (1977a) Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle disease virus and pet birds of six species. I. Clinical and serologic responses, and viral excretion. *Avian Dis* 21(4):642-654
- Erickson GA, Maré CJ, Gustafson GA *et al.* (1977b) Interactions between viscerotropic velogenic Newcastle disease virus and pet birds of six species. II. Viral evolution through bird passage. *Avian Dis* 21(4):655-669
- Estudillo J (1972) A Newcastle disease outbreak in captive exotic birds. *Proc. 21st West. Poultry Dis. Conf.*, University of California, pp 70-73
- Friend M, Franson JC (1999) *Field manual of wildlife diseases*. US Geological Survey, 001
- Friend M, Trainer DO (1972) Experimental Newcastle disease studies in the Mallard. *Avian Dis* 16(4):700-713
- Gerlach H (1994) Viruses. In: *Avian Medicine: principles and application*. Eds: Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR, Lake Worth, FL: Wingers Publ. Inc.: pp 862-948
- Gross WB (1961) The development of “air sac disease”. *Avian Dis* 5:431-439
- Huchzermeyer FW (1996) Newcastle Disease in ostriches in South Africa. *Proc. Improving our understanding of rataties in a farming environment*. Ed. Deeming DC, Manchester, England, pp 55-66
- Kaleta EF, Baldauf C (1988) Newcastle disease in free-living and pet birds. In: *Newcastle disease* (Alexander DJ ed). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 197-246
- Kauker E, Siegert R (1957) Newcastle virus – Infektion beim afrikanischen Strauß (*Struthio camelus*), Zwerggänsegeier (*Pseudogyps africanus* Salvad.) und Bunttukan (*Ramphastos dicolorus*). *Monatshefte für Tierheilkunde*, 9:64-68
- Kim SJ, Spradbrow PB, MacKenzie M (1978) The isolation of lentogenic strains of Newcastle disease virus in Australia. *Aust Vet J* 54(4):183-187
- Kingston DJ, Dharsana R, Chavez ER (1978) Isolation of a mesogenic Newcastle diseases virus from an acute disease in Indonesian ducks. *Trop Anim Health Prod* 10(3):161-164
- McFerran JB, McCracken RM (1988) Newcastle disease. In “Newcastle Disease” (Alexander DJ ed), Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, pp 161-183
- Nakamura K, Ueda H, Tanimura T, Noguchi K (1994) Effect of mixed live vaccine (Newcastle disease and infectious bronchitis) and *Mycoplasma gallisepticum* on the chicken respiratory tract and on *Escherichia coli* infection. *J Comp Path* 111(1):33-42
- Sallermann U (1973) Untersuchungen über die Newcastle-Krankheit beim Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*) und die Möglichkeit einer Immunprophylaxe. *Vet Diss, Gießen* 1973
- Samberg Y, Hadash DU, Perelman B, Meroz M (1989) Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*): field case and experimental infection. *Avian Pathology* 18:221-226
- Terregino C, Cattoli G, Vascellari M, Capua I (2004) Evaluation of efficacy of the vaccination against Newcastle disease in canary birds (*Serinus canarius*). *Proceedings of the Fifty-Third Western Poultry Disease Conference* March 7-9, 2004. Sacramento, California, pp 96-97
- Verwoerd DJ (1995) Velogenic Newcastle disease epidemic in South Africa. Part II: ostriches, waterfowl, exotic bird collections and wild birds. *S Af Vet Med* 8:44-49

Méthode conventionnelle de diagnostic de l'infection par le virus de la maladie de Newcastle

10

Calogero Terregino et Ilaria Capua

10.1 Isolement du virus sur œufs de poule embryonnés

L'isolement du virus s'effectue selon le protocole établi par l'Organisation mondiale pour la santé animale (OIE) et selon les normes européennes (OIE, 2008 ; UE, 92/66). Il peut être réalisé sur œufs de poule embryonnés ou sur culture cellulaire. La procédure d'isolement viral sur œufs de poule embryonnés est identique à celle décrite pour l'influenza aviaire (IA), au chapitre 7.

- Un échantillon produisant un résultat positif lors du test d'hémagglutination rapide doit faire l'objet de tests supplémentaires incluant le titrage de l'activité hémagglutinante (HA). Cette procédure permet de confirmer et d'évaluer l'HA : conditions nécessaires à l'identification de l'HA lors du test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA). Si un laboratoire n'est pas en mesure d'effectuer le test IHA, le liquide allantoïque hémagglutinant doit être expédié à un laboratoire national ou international de référence afin de confirmer le diagnostic.

10.2 Cultures cellulaires

Les souches de virus de la maladie de Newcastle (ND) peuvent se multiplier dans une large gamme de cultures cellulaires d'origine aviaire ou non aviaire. Les cultures cellulaires les plus largement utilisées incluent : les hépatocytes d'embryons de poulet (HEP), les fibroblastes d'embryons de poulet (FEP), les cellules rénales de singe vervet d'Afrique (Vero) et les cellules de réticulum d'embryon de poulet (CER). La croissance virale entraîne généralement des altérations du tapis cellulaire. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet cytopathique (ECP). Du fait de certaines propriétés du virus ND, la multiplication virale provoque une perturbation du tapis cellulaire par

la formation de syncytiums. Il s'agit de grandes cellules plurinucléées résultant de la fusion de plusieurs cellules. Dans les cellules d'embryon de poussin, la formation de plages de lyse a lieu uniquement pour les virus vélogènes et mésogènes ; sauf lorsque le milieu de culture est additionné d'ions Mg^{2+} , de diéthylaminoéthyl-dextran (DEAE) ou de trypsine.

Certaines souches de paramyxovirus de type 1 (PP-MV-1) du pigeon sont difficiles à isoler sur œufs de poule embryonnés, mais se développent bien sur HEP. Par conséquent, en cas de suspicion de contamination de l'échantillon par le virus PPMV-1, il faut tenter d'isoler le virus sur les deux substrats.

Le titre viral obtenu sur culture cellulaire est généralement très bas. Il est donc nécessaire d'effectuer un passage des isolats sur œufs de poule embryonnés avant de caractériser le virus.

Une description détaillée du test d'hémagglutination sur boîtes de Pétri (test d'hémagglutination rapide) est donnée au chapitre 7, page 79.

10.3 Caractérisation du virus de la maladie de Newcastle par des méthodes sérologiques

On découvre souvent des isolats de virus de la maladie de Newcastle dans les échantillons soumis aux laboratoires de virologie aviaire. Ces isolats comportent des virus virulents responsables de maladies sur le terrain et des virus non virulents utilisés comme vaccins vivants ou naturellement présents chez les oiseaux. Il est donc essentiel que les laboratoires d'analyse diagnostique soient équipés pour identifier les isolats de ND et les différencier des autres agents hémagglutinants. Les liquides allantoïques présentant une activité hémagglutinante doivent faire l'objet d'un test IHA. L'activité hémagglutinante virale des virus cultivés sur œufs de poule peut provenir d'un des neuf sérotypes de

paramyxovirus aviaires ou d'un des 16 sous-types d'hémagglutinine d'influenza de type A connus pour infecter les oiseaux. L'identité du virus peut être confirmée par un test IHA réalisé à l'aide d'antisérums polyclonaux spécifiques. Si l'isolat et l'antisérum sont homologues, l'activité hémagglutinante du virus est inhibée. Cependant, l'interprétation des résultats doit être effectuée avec précaution puisque des réactions croisées peuvent se produire entre virus appartenant à des sérotypes différents. Par exemple, lors de tests IHA réalisés à l'aide d'antisérums polyclonaux, on rapporte que le virus ND (APMV-1) a démontré un certain degré de réactivité croisée avec plusieurs autres sérotypes de paramyxovirus aviaires, notamment des isolats d'APMV-3 provenant de psittacidés. Le risque d'effectuer un mauvais diagnostic peut être éliminé par l'utilisation d'un éventail de sérums et d'antigènes de référence.

La confirmation du diagnostic de la ND est basée sur la caractérisation par le test IHA réalisé à l'aide de sérums de sous-types de paramyxovirus aviaires de référence tel que décrit au chapitre 7.

10.4 Tests sérologiques destinés à être utilisés pour la détection d'anticorps spécifiques du virus de la maladie de Newcastle

10.4.1 Introduction

La détection d'anticorps spécifiques du virus ND est un test de routine des laboratoires de virologie aviaire. En général, les tests sérologiques sont réalisés afin d'évaluer la réponse immune à l'administration d'un vaccin ou de détecter une séroconversion survenue après infection naturelle. Cette dernière peut être vérifiée par la détection d'anticorps chez des oiseaux naïfs (non vaccinés) ou par l'augmentation du titre d'anticorps (d'au moins quatre fois) chez des oiseaux vaccinés.

L'analyse quantitative la plus couramment utilisée est le test IHA réalisé selon la même procédure que celle décrite pour l'IA sauf qu'ici l'antigène de référence contient des virus APMV-1. Le test IHA est également considéré comme étant la technique de référence pour la validation de tout autre test sérologique.

10.4.2 Test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

Pour une description détaillée, voir le chapitre 7 (test IHA de l'IA)

10.4.3 Évaluation de la pathogénicité par les méthodes conventionnelles

10.4.3.1 Classification basée sur les signes cliniques

Cinq groupes de souches d'APMV-1 ont été différenciés en fonction des signes cliniques observés chez les poulets exempts d'agents pathogènes spécifiques (EOPS) infectés expérimentalement (Beard et Hanson, 1984).

Les souches virulentes provoquant une mortalité élevée accompagnée de lésions hémorragiques du tube digestif sont dites vélogènes viscérotropes (VVND), alors que les souches responsables d'une mortalité élevée accompagnée de signes nerveux et respiratoires sont dites vélogènes neurotropes (NVND). Les souches mésogènes se caractérisent par le fait qu'elles provoquent des signes respiratoires et nerveux chez les animaux infectés, mais avec une mortalité généralement faible. Les souches lentogènes provoquent, typiquement, une infection des voies respiratoires bénigne ou inapparente, alors que les souches avirulentes à tropisme intestinal entraînent une infection intestinale inapparente.

10.4.3.2 Délai moyen de l'effet léthal et formation des plages de lyse

Une estimation de la virulence basée sur l'effet léthal variable des virus sur les embryons de poulet a été initialement décrite par Hanson et Brandly (1955). Le délai moyen de l'effet léthal est basé sur l'expérience selon laquelle les virus virulents tuent plus rapidement les embryons que ceux ayant une virulence plus faible. Les souches vélogènes tuent les embryons en moins de 60 heures, les souches mésogènes en 60 à 90 heures et les souches lentogènes en plus de 90 heures (Alexander 1988). Actuellement, la détermination du délai moyen de l'effet léthal n'est pas considérée comme étant un test fiable de caractérisation des isolats de virus ND associés aux épidémies. Elle ne figure pas dans la directive 92/66/CEE.

La capacité de l'APMV-1 à former des plages de lyse peut être recherchée sur des cellules primaires de FEP ou sur des cultures de cellules pulmonaires ou rénales. La taille, la morphologie et la couleur de la plage de lyse sont liées au degré de virulence. Pour les souches lentogènes, l'ajout du DEAE, des ions magnésium ou de la trypsine est nécessaire à la formation de plages de lyse.

10.4.3.3 Indices de pathogénicité par voie intracérébrale

Le test le plus sensible et le plus largement utilisé pour mesurer la virulence est l'index de pathogénicité par voie intracérébrale (IPIC) chez les poulets d'un jour.

Procédure

1. Diluer le liquide allantoïque infecté fraîchement récolté (activité hémagglutinante de titre $> 2^4$) à une concentration de 1/10 dans une solution saline

isotonique stérile (sans addition d'antibiotiques).

2. Injecter 0,05 mL de virus dilué par voie intracérébrale chez chacun des poussins d'un jour (c'est-à-dire 24 à 40 heures après l'éclosion). Les poussins doivent avoir éclos à partir d'œufs provenant d'un groupe de volailles EOPS.
3. Les oiseaux sont examinés à intervalles de 24 h pendant 8 jours.
4. À chaque observation, chaque oiseau est noté : 0 = normal, 1 = malade, 2 = mort.
5. L'index est calculé comme indiqué dans l'exemple suivant. Une méthode simple d'enregistrement des résultats et de calcul des indices est indiquée dans le tableau 10.1.

Tableau 10.1 Détermination de l'index de pathogénicité intracérébrale (IPIC)

Signes cliniques	Nombre de jours après inoculation								Nombre total de points
	Nombre de poulets présentant des signes spécifiques								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Normal	10	4	2	0	0	0	0	0	$16 \times 0 = 0$
Malade	0	6*	5	6	2	0	0	0	$19 \times 1 = 19$
Mort	0	0	3	4	8	10	10	10	$45 \times 2 = 90$
									TOTAL = 109/80
									IPIC = 1,36

10 oiseaux observés pendant 80 jours = 80 observations.

Index = note moyenne par oiseau et par observation = $109/80 = 1,36$.

Tout APMV-1 obtenant une valeur de 0,7 ou plus lors d'un test IPIC est considéré comme étant un virus ND virulent.

L'IPIC est la note moyenne par oiseau et par observation sur une période de 8 jours. Les isolats les plus virulents ont un IPIC proche de 2,0. Les virus lentogènes et asymptomatiques ont des valeurs comprises entre 0,0 à 0,6.

Références

- Alexander DJ (1988) Newcastle disease virus - An avian paramyxovirus. In: Newcastle Disease, Alexander DJ ed., Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, pp 11-22
- Beard CW, Hanson RP (1984) Newcastle Disease. In: Diseases of Poultry, Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW *et al.* ed., 8th ed., Iowa State University Press: Ames, IA, pp 452-470
- CEC (1992) Council Directive 92/66/EEC of 14 July 1992 introducing Community measures for the control of Newcastle disease. Official Journal of the European Communities L 260
- Hanson RP, and Brandly CA (1955) Identification of vaccine strains of Newcastle disease virus. Science 122(3160): 156-157
- OIE (2008) Newcastle Disease. World Organisation for Animal Health Manual of Diagnostic tests vaccines for terrestrial animals, 6th ed. Chapter 2.3.14. OIE Paris, pp 576-589

11.1 Introduction

Au cours de la dernière décennie, de nombreux protocoles ont été publiés concernant la détection par RT-PCR du paramyxovirus aviaire de type 1 (APMV-1). Une revue technique décrivant les protocoles conventionnels de RT-PCR en point final a été présentée il y a quelques années (Aldous *et al.*, 2001). Plus récemment, des protocoles de PCR en temps réel (rPCR) ont été publiés, utilisant des sondes hydrolytiques, SybrGreen ou des amorces LUX (Wise *et al.* 2004 ; Pham *et al.* 2005 ; Antal *et al.* 2007). Ce chapitre présente les protocoles utilisés par l'IZSVe.

Pour des informations détaillées concernant le type d'échantillon destiné aux analyses, la préparation de l'échantillon et l'extraction de l'ARN, voir la partie précédente traitant de l'influenza aviaire.

11.2 Détection et typage de l'APMV-1 par RT-PCR en point final et analyse par restriction enzymatique

11.2.1 Protocole 1

Ce protocole de RT-PCR en une étape a été modifié à l'IZSVe et repose sur la série d'amorces décrite par Creelan *et al.* (2002). Dans ce protocole, l'amplification des fragments d'acide nucléique spécifique de l'APMV-1 est suivie d'une digestion enzymatique (analyse par restriction enzymatique, ARE) à l'aide de *Bgl*I, permettant la détection et le typage des souches selon leur degré de virulence. L'article original compare ce protocole à l'isolement viral et fait état d'une sensibilité relative de 73,44 % dans le cas des échantillons cliniques ; sensibilité pouvant s'élever jusqu'à 91,30 % au cas par cas (Creelan *et al.* 2002).

Du fait de la petite taille de l'amplicon, il est recommandé de visualiser les résultats de RT-PCR sur gel SDS-PAGE coloré à l'argent ou sur gel d'agarose à 2-3 %.

RT-PCR en une étape (thermocycleur AB 9700) (RT-PCR Superscript en une étape avec Taq Platinum ; Invitrogen, # 10928-042 ou -034)

Cible : Gène F

Échantillon : 5 µL d'ARN dans un volume réactionnel total de 45 µL

Amorces

Directe NDV-F 4829 : 5'-GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG-3'

Inverse NDV-R 5031: 5'-TCATTGGTTGCRGCAATGCTCT-3'

Protocole

Réactif ^a	Concentration finale	Réaction 1 x (µL)
Eau exempte de RNase	/	16
Tampon PCR 2 x (MgSO ⁴ 2,4 mM; dNTP 1,6 mM)	1X	25
Amorce NDVF 4829	0,2 µM	1,0
Amorce NDVF 5031	0,2 µM	1,0
Mélange d'enzymes (RT et Taq)	/	1
Volume réactionnel total		45
Vortexer le mélange pendant quelques secondes.		
Répartir des parties aliquotes de 45 µL dans des tubes PCR de 0,2 mL.		
Ajouter l'ARN		5
Volume final :		50

^aConcentration de la solution mère

Conditions du processus cyclique

	95 °C	95 °C		72 °C	72 °C	
45 °C	2 min	15 s	48 °C	30 s	7 min	4 °C
30 min			30 s			∞
			40 cycles			

Détection : Gel SDS-PAGE à 7 % coloré à l'argent ou gel d'agarose à 2 %.

Fragment amplifié attendu : 202 pb.

Analyse par restriction enzymatique (ARE)

Purifier l'ADNc produit à l'aide d'un kit commercial en suivant les instructions du fabricant (Kit High Pure de Roche, pour la purification des produits de PCR).

Procéder à la digestion du produit de la PCR (5 µL dans un volume final de 50 µL) à l'aide de 10 U de BglII (Roche, Allemagne; # 621641) et du tampon approprié (Tampon H de Roche), à 37 °C et pendant 2 heures 30.

Visualiser les résultats après électrophorèse sur gel.

Résultats attendus

Motif de restriction de l'APMV-1 lentogène : 2 bandes d'environ 135 et 67 pb.

Motif de restriction de l'APMV-1 mésogène et vélogène : 1 bande d'environ 202 pb (c'est-à-dire pas de digestion).

11.3 Détection et typage de l'APMV-1 par RT-PCR en point final

Les protocoles suivants (2 et 3) sont utilisés à l'IZSv pour le géotypage et le pathotypage des isolats d'APMV-1. Ils associent l'amplification par RT-PCR et le séquençage génétique et peuvent aussi être utilisés

pour confirmer la présence d'APMV-1 dans le liquide allantoïdien. L'utilisation directe de ces protocoles sur les échantillons de diagnostic n'a jamais été totalement évaluée. Les protocoles 2 et 3 font intervenir différentes séries d'amorces. Ces protocoles réunis permettent l'amplification des souches représentatives de toutes les lignées génétiques d'APMV-1 décrites jusqu'ici.

11.3.1 Protocole 2

RT-PCR NOH en une étape (thermocycleur AB 9700) (Kit RT-PCR en une étape ; Qiagen) pour la détection de l'ARN APMV-1 dans le liquide allantoïdien d'œufs de volaille embryonnés

Amorces

Directe NOH-For 5' TACACCTCATCCCAGACAGG 3'

Inverse NOH-Rev 5' AGTCGGAGGATGTTGGCAGC 3'

Protocole

Réactif ^a	Concentration finale	Réaction 1 × (μL)
Eau exempte de RNase	/	26,8
Tampon PCR 5×	1×	10
Mélange de dNTP 10 mM	0,2 mM	1
Amorce NOH-For 100 μM	1 μM	0,5
Amorce NOH-Rev 100 μM	1 μM	0,5
Inhibiteur de RNase 40 U/μL	8U	0,2
Mélange enzymatique pour RT-PCR en une étape		1
Volume réactionnel total		40
ARN		10
Volume final :		50

^aConcentration de la solution mère

Conditions du processus cyclique

	94 °C	94 °C		68 °C	68 °C	
50 °C	15 min	30 s	55 °C	1 min	7 min	4 °C
30 min			1 min			∞
			35 cycles			

Détection : Gel SDS-PAGE à 7 % coloré à l'argent ou gel d'agarose à 2 %.

Fragment amplifié attendu : environ 300 pb

11.3.2 Protocole 3

RT-PCR H en une étape (thermocycleur AB 9700) (kit principal de PCR pour ARN, GeneAmp Gold, Applied Biosystems # 4308207) pour la détection d'ARN APMV-1 dans le liquide allantoïdien d'œufs de volaille embryonnés

Amorces

Directe H-For 5' ATGCCCAAAGACAAAGAGCAA 3'

Inverse H-Rev 5' TACTGCTGTCGCTACACCTAA 3'

Pré-RT : 10 µL d'ARN à 60 °C pendant 10 min

Protocole

Réactif ^a	Concentration finale	Réaction 1 × (µL)
Eau exempte de RNase	/	17,9
Tampon PCR 5×	1×	10
MgCl ₂ 25 mM	1,25 mM	2,5
Mélange de dNTP 10 mM	0,8 mM	4
Amorce NDH-for 12,5 µM	0,25 µM	1
Amorce NDH-H-rev 12,5 µM	0,25 µM	1
DTT 100 mM	5 mM	2,5
enzyme RT 50 U/µL	15 U/50 µL	0,3
Inhibiteur de RNase 20 U/µL	10 U/50 µL	0,5
AmpliTaq Gold 5 U/µL	1,5 U/50 µL	0,3
Volume réactionnel total		40
ARN		10
Volume final :		50

^aConcentration de la solution mère

Conditions du processus cyclique

	95 °C	94 °C		72 °C	72 °C	
42 °C	10 min	45 s	58 °C	30 sec	10 min	4 °C
60 min			30 sec 35 cycles			∞

Détection : Gel SDS-PAGE à 7 % coloré à l'argent ou gel d'agarose à 2 %.

Fragment amplifié attendu : environ 300 pb

11.4 Détection de l'APMV-1 par RT-PCR qualitative en temps réel, en une étape

11.4.1 Protocole 4

RT-PCR en temps réel en une étape (kit QuantiTect Multiplex RT-PCR 2X, # 204643) pour la détection d'ARN APMV-1 dans les échantillons cliniques

Cible : Gène matrice

Échantillon : ARN 5 µL dans un volume réactionnel de 20 µL

Amorces et sonde (Wise et al. 2004)

APMV1 F 5'-AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC-3'

APMV1 R 5'-CCT GAG GAG AGG CAT TTG CTA-3'

Sonde APMV1 5'-[FAM] TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC [TAMRA]

Protocole

Réactif ^a	Concentration finale	Réaction 1×(µL)
Eau exempte de RNase	/	4,9
Amorce APMV IF 10 µM	400 nM	1
Amorce APMV 1R 10 µM	400 nM	1
2× Mélange mère pour RT-PCR	1×	12,5
Sonde FAM APMV1 10 µM	160 nM	0,4
Mélange enzymatique		0,2
Volume réactionnel total		20
ARN		5
Volume final		25

^aConcentration de la solution mère

Conditions du processus cyclique

	95 °C	94 °C	
50 °C	15 min	45 s	60 °C
20 min			45 s
		40 cycles	

Références

- Antal M, Farkas T, Germán P *et al.* (2007) Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction detection of Newcastle disease virus using light upon extension fluorogenic primers. *J Vet Diagn Invest* 19(4):400-404
- Aldous EW, Alexander DJ (2001) Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1) *Avian Pathol* 30:117-128
- Creelan JL, Graham DA, McCullough SJ (2002) Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol* 31(5):493-499
- Pham HM, Konnai S, Usui, T *et al.* (2005) Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. *Arch Virol* 150(12):2429-2438
- Wise MG, Suarez DL, Seal BS *et al.* (2004) Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 42(1):329-338

Règles générales de décontamination après une épizootie d'influenza aviaire ou de maladie de Newcastle

12

Maria Serena Beato et Paola De Benedictis

12.1 Introduction

La mise en application rapide de mesures de biosécurité strictes représente la première étape de prévention et de contrôle de l'introduction des virus de l'influenza aviaire (IA) ou de la maladie de Newcastle (MN). Les deux composantes de la biosécurité sont : la bioexclusion et la biocontention. La bioexclusion englobe les mesures visant à exclure tout agent infectieux des locaux contaminés. Elle nécessite la prévention des contacts directs et indirects avec les volailles, les animaux infectés ou les matières contaminées. La biocontention regroupe les mesures visant à contenir le virus au sein des locaux contaminés, là où le premier diagnostic a été obtenu. Lors du processus de biocontention, il est nécessaire de décontaminer la ferme infectée (EFSA 2005). La propagation secondaire de l'IA et de la MN s'effectue principalement par le biais d'activités humaines telles que les déplacements des personnels, des véhicules, des équipements et d'autres matériels contaminés. De nouveaux foyers peuvent apparaître à la suite du repeuplement en oiseaux, dans les établissements n'ayant pas été correctement désinfectés. Par conséquent, l'infection persistera dans la population aviaire si la décontamination des locaux, des chaussures, des vêtements, des paniers, des équipements fermiers et des autres matériels n'est pas effectuée correctement. Les préjudices causés à l'industrie avicole et la menace pour la santé publique ne seront donc pas écartés. Le nettoyage et la désinfection doivent donc être considérés comme des composantes essentielles des programmes de maîtrise de l'IA et de la MN. La décontamination est la combinaison des processus physique et chimique permettant de tuer ou d'éliminer les microorganismes pathogènes. Elle est essentielle à l'éradication de la maladie. La décontamination fait intervenir une étroite collaboration

entre les propriétaires des exploitations et le personnel impliqué dans les procédures. Les facteurs naturels tels que le temps, la déshydratation, la chaleur et la lumière, favorisent la décontamination. La plupart des désinfectants ont une efficacité réduite en présence de matières grasses et de matière organique. Un nettoyage préliminaire est donc obligatoire avant toute désinfection, afin de réaliser une décontamination chimique efficace.

12.2 Choix du désinfectant

Lors de la mise en place d'un programme de désinfection, de nombreux facteurs doivent être pris en compte afin d'atteindre l'objectif de décontamination de la zone infectée et de limiter, en même temps, la propagation de l'infection aux élevages non infectés. La connaissance des caractéristiques des agents infectieux joue un rôle clé dans le choix du désinfectant. Les virus de l'IA et de la MN se multiplient et sont excrétés à des concentrations élevées par leurs espèces hôtes, et persistent dans l'environnement (Beard et Hanson 1984; De Benedictis *et al.* 2007). Néanmoins, selon la classification de Noll et Youngner (1959), leur résistance aux désinfectants courants est relativement faible. Les virus de l'IA et de la MN sont tous deux des virus enveloppés, de taille moyenne et à ARN simple brin (sb). Ils font partie des virus de la catégorie A (Noll et Youngner 1959).

Cependant, la planification d'un programme de désinfection doit aussi tenir compte d'autres facteurs, notamment les propriétés des désinfectants, les facteurs externes influençant l'activité des désinfectants et les caractéristiques des locaux faisant l'objet de la décontamination. Le choix du désinfectant approprié repose sur son efficacité prouvée envers les virus de l'IA et de la MN.

L'évaluation doit également inclure la « durabilité » du désinfectant sous certaines conditions (notamment le pH et la température pour une efficacité optimale, la stabilité en présence de matières organiques ou d'eau dure, le temps de contact et la sécurité du personnel). Les produits doivent être utilisés à une concentration dont l'efficacité contre l'agent sélectionné est prouvée. La plupart des désinfectants nécessitent un temps de contact d'au moins 30 min, en fonction des conditions environnementales. La toxicité de certains produits chimiques réduit l'éventail de choix. Les composés à toxicité élevée doivent être évités. Les composés de faible toxicité peuvent être utilisés sous contrôle. Il est particulièrement important que les membres du personnel soient formés aux procédures de désinfection, afin de parvenir à des résultats optimaux et d'éviter des conséquences néfastes pour les opérateurs, les équipements et l'environnement. La corrosivité peut être réduite par dilution du composé, tout en tenant compte de la concentration minimale nécessaire au maintien d'une activité viricide. Dans la plupart des cas, les principaux facteurs limitants sont le coût et la disponibilité du produit désinfectant au niveau local.

Les agents neutralisants les plus efficaces contre les virus de la catégorie A, dont le virus de l'IA et de la MN, sont les détergents, les alcalis, les agents oxydants et les aldéhydes (Ausvetplan 2007). L'utilisation de savons et de détergents n'est recommandée que lors des procédures de nettoyage qui précèdent la décontamination proprement dite. Les alcalis sont des décontaminants chimiques idéaux pour les stabulations animales, les cours, les drains, les fosses septiques et les zones de recueil des eaux usées. L'hydroxyde de sodium, la soude caustique et le carbonate de sodium utilisés pour le lavage sont des produits d'utilisation courante peu coûteux, et exerçant une action de saponification sur les matières grasses et organiques. En revanche, les agents oxydants ne sont pas recommandés pour les procédures de décontamination. L'efficacité de la javel domestique (hypochlorite de sodium) et de l'hypochlorite en poudre diminuent considérablement en présence de matière organique. Ces composés sont également chimiquement instables et se décomposent rapidement à des températures supérieures à 15 °C. Les produits commerciaux sont très efficaces, bien que coûteux, et doivent être utilisés selon les instructions du fabricant. Parmi les aldéhydes, le glutaraldéhyde est efficace, stable et partiellement actif en présence de matière organique, bien que légèrement corrosif pour les métaux. Malgré ses points positifs, le glutaraldéhyde présente un

coût élevé pour une désinfection à grande échelle.

Le formaldéhyde est encore utilisé pour la décontamination de l'air. De nombreux paramètres doivent cependant être évalués afin d'obtenir une décontamination complète et efficace. Ces paramètres comprennent la concentration du gaz, la température, l'humidité, le temps de contact et l'uniformité de la répartition (voir annexe A pour les détails pratiques de l'utilisation du formaldéhyde).

Pour atteindre une efficacité optimale du processus de décontamination, les autres facteurs externes devant être pris en considération sont la teneur en calcium de l'eau utilisée pour la préparation de la solution désinfectante et la température ambiante. Tous deux influent sur l'efficacité du désinfectant. Les désinfectants sont généralement plus efficaces à des températures élevées et atteignent une efficacité optimale au-delà de 20 °C (par exemple, la gamme de température optimale pour l'activité du formaldéhyde se situe entre 24 °C et 38 °C) (Samberg et Meroz 1995). Certains produits efficaces contre l'IA ont été testés en association avec des composés antigels avec conservation de leur activité (Davison *et al.* 1999). L'efficacité de certains désinfectants peut diminuer au cours de l'hiver ou lorsque la température

Tableau 12.1 Choix de désinfectants/produits chimiques et procédures utilisées pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle (modifié selon Ausvetplan 2007)

Élément destiné à être désinfecté	Désinfectant/produit chimique/procédure
Oiseau vivant	Abattre humainement
Carcasses	Enfouir, brûler ou envoyer à l'équarrissage
Habitation pour animaux/équipement	Savons et détergents, agents oxydants, alcalis
Alentours	N/A
Humains	Savons et détergents, acide citrique
Eau	
- Réservoirs	Si possible, les évacuer dans les pâturages
- Digues	Les évacuer dans les pâturages, si cela est faisable. Autrement N/A.
Équipement électrique	Formaldéhyde
Nourriture	Enfouir, brûler
Effluent, fumier	Enfouir ou brûler, appliquer les alcalis ou les acides
Habitations humaines	Savons et détergents, agents oxydants
Appareils, véhicules	Savons et détergents, alcalis
Vêtements	Savons et détergents, agents oxydants, alcalis
Avions	Savons et détergents, agents oxydants

Tableau 12.2 Produits chimiques disponibles pour les procédures de désinfection et recommandations principales concernant leur utilisation (modifié à partir de De Benedictis *et al.* 2007). Les produits recommandés sont surlignés en gras

Produit chimique	Concentration recommandée	Mode d'action	Temps de contact recommandé	Usage recommandé	Restrictions	Autres informations
Savons et détergents		Pouvoir surfactant envers les composés lipidiques	10 min	Au cours du nettoyage		Utilisé également avec des désinfectants
Alcalis		Dénaturation protéique			L'activité augmente à température élevée ; non efficace à température ambiante	
Hydroxyde de sodium (soude caustique)	2-5 % pour les vêtements 10 % à 60 °C pour les sols		10 min	Sols et vêtements	Ne pas utiliser en présence d'aluminium et d'alliages dérivés	Ne pas laisser en contact avec les tissus organiques
Carbonate de sodium	10 %		30 min	En présence de concentrations élevées de matières organiques	Thermolabile ; sensible à la lumière	
Hydroxyde de calcium	3 %			Murs, sols		
Acides		Inhibition des réactions enzymatiques ; dénaturation des protéines et des acides nucléiques				
Acide chlorhydrique (acide inorganique)	2-5 %		10 min	Sols	Ne pas utiliser pour la désinfection des métaux	
Acide citrique (acide organique)	0,2 %		30 min	Vêtements et corps		
Composés chlorés		Dénaturation des protéines et oxydation			Corrosif ; inhibé par les matières organiques et un pH basique	Peu coûteux et non toxique
Hypochlorite de calcium	2-3 %		10-30 min	Sols, vêtements		
Hypochlorite de sodium (javel domestique)	2-3%		10-30 min	Équipement		
Agents oxydants		Activité dénaturante sur les lipides et l'ADN			Efficacité diminuée en présence de composés organiques ; corrosif	
Peroxyde d'hydrogène	3-6 %					Rincer après usage
Aldéhydes		Alkylation des groupements amino et sulphydryles des protéines et de l'azote des purines			Efficacité diminuée en présence de composés organiques ; corrosif	

(suite)

Tableau 12.2 (suite)

Produit chimique	Concentration recommandée	Mode d'action	Temps de contact recommandé	Usage recommandé	Restrictions	Autres informations
Formol	8 %		10-30 min		Gaz toxique ; instable	Efficace en présence de propylène et de glycérol
Glutaraldéhyde	1-2 %		10-30 min		pH 7,5-8,5 : légèrement corrosif envers les métaux ; ne pas utiliser sur du plastique ou du caoutchouc	Irritant pour les yeux, le nez et la gorge ; rincer après usage
Formaldéhyde	40 %		15-24 h			
Composés phénolés		Inactivation du système enzymatique et perte des métabolites à travers la paroi cellulaire			Irritation causée par l'activité résiduelle : rincer après usage	Efficace en présence de matière organique ; peu coûteux
Acide crésolique	2 %			Sols		Coût élevé
Phénols de synthèse	2 %		10 min	Sols		
Cristaux de phénol	0,4-0,2 %		12-18 h			
Composés d'ammonium quaternaire		Actif envers les groupements -NH ₄ ⁺		Usage personnel	Ne pas utiliser avec de l'eau dure, > 32 F° ; efficace en présence de composés antigels	Un nettoyage méticuleux des surfaces est recommandé avant l'usage
Alcools		Dénaturent les protéines en présence de H ₂ O		Vêtements et équipements	Ne pas utiliser avec du plastique ou du caoutchouc	Inflammable et volatile
Éthanol	70 %		5-15 min	Associé à d'autres composés dans les gels désinfectants pour les mains		Utilisé également en association avec d'autres molécules ou en tant que solvant dans les solutions désinfectantes

ambiante est basse. Tout produit destiné à être utilisé dans de telles conditions doit donc impérativement conserver son efficacité à basse température ou maintenir son activité en association avec un produit antigel.

Les tableaux 12.1 et 12.2 présentent un sommaire des désinfectants à utiliser lors des procédures de décontamination.

12.3 Procédures de décontamination

Une évaluation correcte des zones contaminées et une connaissance approfondie des caractéristiques de l'agent infectieux sont des conditions nécessaires à l'obtention d'une décontamination efficace des exploitations. La disponibilité d'équipements, de désinfectants et de personnels appropriés pour mener

à bien ces tâches est également indispensable. En guise de mesure préliminaire de bonne pratique, tous les extracteurs d'air des bâtiments concernés doivent être éteints en cas d'apparition d'un foyer dans un élevage intensif de volaille. Cette opération est de la plus haute importance, afin d'éviter la dissémination incontrôlée de l'agent infectieux par les aérosols (Ausvetplan 2007).

Toute stratégie de décontamination comporte :

- l'évaluation de l'exploitation ;
- la désinfection préliminaire ;
- le nettoyage initial ;
- la désinfection totale suivie d'inspections y compris la désinfection du personnel quittant les zones contaminées, ainsi que des zones et des appareillages infectés. Une attention particulière doit être portée aux zones à haut risque de contamination, telles que les effluents animaux et la nourriture pour animaux, qui doit être détruite.

Le nettoyage et la désinfection des locaux contaminés doivent être effectués de manière systématique, de l'arrière vers l'avant et du haut vers le bas de la ferme. La méthode toit-mur-sol doit être respectée dans chaque bâtiment. Une fois la désinfection terminée, le bâtiment doit être condamné à l'aide d'un ruban de signalisation afin d'éviter la recontamination de la zone décontaminée (De Benedictis *et al.* 2007 ; Ausvetplan 2007).

La désinfection préliminaire doit être entreprise immédiatement après confirmation de la maladie. Elle diminuera ainsi la quantité et la répartition de l'agent infectieux au cours du tri et de l'élimination. Cette désinfection préliminaire doit être effectuée dans toute zone contaminée, en portant une attention particulière aux sites de tri et d'élimination. En particulier, le site de tri doit être constamment désinfecté à chaque pause au cours de la journée (Ausvetplan 2007).

Une procédure de nettoyage doit être entreprise après l'abattage et l'élimination, afin d'éliminer tout fumier, saleté, débris et objet contaminé ne pouvant être désinfectés, notamment le matériel isolant, le bois, la nourriture contaminée et la litière. L'utilisation d'eau et de désinfectant doit être évitée à ce stade, afin de diminuer le volume et le poids des matières destinées à être éliminées (nettoyage à sec). Après l'élimination, toutes les surfaces doivent être grattées, frottées, puis aspergées d'eau à faible pression et de détergent, afin de supprimer toute contamination visible. Les carrelages doivent être brisés et immergés dans du désinfectant (nettoyage en phase humide). L'activité viricide de la plupart des désinfectants est partiellement ou totalement inhibée par la matière organique. Un nettoyage approfondi constitue donc une étape initiale essentielle pour une désinfection efficace.

Au cours des procédures de désinfection totale, l'objectif devrait être l'inactivation de toutes les particules infectieuses. Afin d'empêcher tout contact avec les volailles non infectées, les équipements portables (plateformes, mangeoires, rouleaux à œufs, tapis roulants et collecteurs d'œufs) doivent être nettoyés puis désinfectés à l'intérieur du bâtiment. Les tuyauteries doivent être lavées à l'eau sous haute pression puis toutes les tuyauteries doivent être remplies d'une solution aqueuse de désinfectant, pendant au moins 48 h. Elles doivent ensuite être rincées à l'aide d'un jet d'eau supplémentaire. Les tuyauteries démontables doivent être nettoyées individuellement à l'aide de produits nettoyants recueillis directement dans des récipients de confinement. Pour la décontamination des tuyaux en fer, il est recommandé d'appliquer une température élevée et, si les normes de sécurité le permettent, de les traiter à la flamme.

L'efficacité de la décontamination est évaluée par une inspection approfondie. Les aspects importants qu'il est nécessaire de vérifier sont les suivants :

- élimination totale de tout matériel en bois contaminé ne se prêtant pas au nettoyage et à la désinfection ;
- pas de matière organique laissée à l'arrière des appareils ou des installations ;
- pas d'encroûtement visible sur aucune des surfaces exposées ;
- destruction de toute nourriture contaminée ;
- nettoyage efficace et désinfection de tous les sites extrêmement contaminés (sites de tri et d'élimination) ;
- évacuation de tout liquide désinfecté dans les drains ou dans les fosses sceptiques ;
- conditions de vide sanitaire, et panneaux d'avertissements maintenus, en particulier au niveau des entrées et des sorties.

La deuxième désinfection est un renouvellement de la première et peut être commencée environ 14 jours après avoir complété la première désinfection. L'inspection finale est effectuée de la même manière que pour la première inspection. La main-d'œuvre ne doit être évacuée des locaux qu'au cas où l'inspection donne des résultats positifs et qu'il n'y a aucun doute quant à son efficacité et à son exhaustivité. S'il subsiste le moindre degré d'incertitude, la procédure doit être renouvelée. L'efficacité de la procédure de désinfection peut être vérifiée par l'introduction d'animaux sentinelles ou le prélèvement d'écouvillonnages dans l'environnement, en vue de tentatives d'isolement viral.

12.4 Décontamination individuelle

Au cours d'un foyer d'IA ou de MN, les hommes agissent comme des transporteurs mécaniques et disséminent le virus. Il est donc nécessaire que tous les membres du personnel participant aux procédures de décontamination changent de vêtements, utilisent des chaussures et des blouses jetables avant d'entrer dans l'élevage et prennent une douche en quittant les locaux contaminés. Le travail dans des locaux en contact ou contaminés entraîne inévitablement une contamination individuelle importante, en particulier lors des inspections physiques des animaux vivants, sur les sites de tri et d'élimination des carcasses et lors du ramassage du fumier, de la litière et des détritiques. Un site de décontamination individuelle (SDI) doit être installé à proximité de la sortie d'un local contaminé (LI) et être déplacé vers l'intérieur de ce local, si cela s'avère nécessaire. Le SDI doit être placé à l'extrémité de la zone définie comme étant contaminée, afin d'éviter une contamination secondaire des personnes quittant le SDI. Le SDI doit être facile à désinfecter et posséder une surface imperméable ; autrement, la partie sol peut être couverte d'un revêtement en plastique de grande taille. Avant le début de toute procédure, un désinfectant efficace doit être appliqué, généralement par pulvérisation. Afin d'éviter la recontamination des zones propres, il est essentiel d'utiliser une eau propre et de disposer d'un bon système d'évacuation. Si l'on ne dispose pas d'un système d'évacuation adéquat, une fosse peut être utilisée comme alternative, afin de s'assurer qu'aucun effluent ne s'écoule au-delà du site de décontamination. Les procédures de décontamination individuelle doivent être suivies à la lettre par l'ensemble du personnel quittant les LI. De l'eau savonneuse tiède doit être disponible à l'entrée du SDI, pour le lavage des cheveux, du visage et de la peau. Le pH de la solution aqueuse peut être modifié par addition de carbonate de sodium ou d'acide citrique, afin d'augmenter son action antivirale. Tous les objets contaminés doivent être stockés dans des sacs à ordures en plastique épais. Les sacs en plastique sont désinfectés par pulvérisation de leurs surfaces externes. Cette procédure permet d'éviter une contamination plus importante du personnel quittant les LI et allant brûler ou enfouir les déchets ou nettoyer et désinfecter les objets non jetables. Si elles sont disponibles, les blouses jetables sont préférées aux vêtements. Les blouses en plastique doivent d'abord être lavées sous faible pression afin d'éliminer les matières grossières. Un soin particulier doit être porté au nettoyage de l'arrière, du dessous du col, de la fermeture éclair et des poches. Les blouses en coton et les blouses en plastiques pulvérisées sont enlevées

et placées dans du désinfectant. Les sous-vêtements doivent aussi être placés dans du désinfectant, en particulier si l'on utilise des blouses en coton. Dans ce cas, il faut également procéder au nettoyage de l'intégralité du corps. Les bottes doivent être récurées, en particulier les semelles. Le personnel quittant le SDI doit traverser les différentes zones, procéder au traitement des bottes, puis les enlever et porter des chaussures de ville. Le personnel est encouragé à poursuivre une deuxième phase de nettoyage, une fois rentré chez lui. Il est obligatoire d'éviter les contacts directs ou indirects avec d'autres animaux sensibles, d'autres lieux ou d'autres exploitations avicoles, pendant au moins 3 jours. Les blouses désinfectées doivent être placées dans un sac en plastique. L'extérieur du sac doit être désinfecté et le sac rangé à la limite externe de la zone, en vue du ramassage. Les objets éliminés doivent être autoclavés ou traités par la blanchisserie d'un hôpital.

Sur les exploitations où l'IA ou la MN sont suspectées, les visiteurs doivent aussi être considérés comme étant contaminés. Ils doivent rester de préférence dans la zone suspectée, jusqu'à la confirmation du foyer et le début des procédures de décontamination. Au cas contraire, des désinfectants domestiques d'usage courant doivent être utilisés afin de minimiser le risque de transmission de la maladie. Les informations suivantes doivent alors être enregistrées et les conseils suivants doivent être donnés :

- nom et adresse des personnes concernées ;
- évaluer le degré d'exposition et de contact avec l'agent suspecté de la maladie ;
- conseiller un changement de vêtements, si cela est possible ;
- recommander de mettre les vêtements suspects – eu égard à leur possible contamination – dans un sac en plastique, en vue d'un traitement approprié ;
- à défaut de désinfectants approuvés, les produits chimiques domestiques efficaces sont les suivants :
 - soude domestique destinée au lavage (10 volumes dans 100 volumes d'eau chaude) ;
 - savon et eau chaude pour le nettoyage à la brosse ;
 - javel domestique concentrée (1 volume dans 3 volumes d'eau, correspondant à 2-3 % de chlore disponible). Ceci n'est pas recommandé pour la décontamination de la peau.

12.5 Décontamination des véhicules et des voitures

Tous les véhicules entrant dans les LI, ainsi que leurs chauffeurs, sont porteurs d'un risque de dissémination

de la maladie. Aucun véhicule ne doit quitter le LI avant d'avoir été décontaminé. Du reste, tous les véhicules ayant été en contact avec les agents infectieux avant l'apparition du foyer doivent être retracés afin d'éviter une infection secondaire ou une propagation incontrôlée de l'infection. Une station de lavage de voitures est idéale pour la décontamination des véhicules. Elle présente l'avantage de faciliter le lavage du châssis des véhicules et permet ainsi le nettoyage de la partie la plus contaminée du véhicule.

Tout tapis en caoutchouc doit être enlevé et nettoyé au désinfectant. Le tableau de bord, le volant, le frein à main, le levier de vitesse et les sièges doivent être essuyés à l'aide d'un désinfectant approprié. Le contenu du coffre doit être enlevé et essuyé à l'aide d'un désinfectant approprié, l'intérieur du coffre doit être essuyé au désinfectant. Les roues, les passages de roue et le châssis de la voiture doivent être aspergés de désinfectant. Plutôt que de laver à grande eau, il est préférable de nettoyer en utilisant du désinfectant ou du savon et de l'eau, tout en brossant pour déloger la saleté incrustée et les matières organiques.

Tous les débris solides doivent être enlevés du véhicule. Les véhicules de transports d'animaux sont ensuite immergés dans du désinfectant à l'aide d'un détergent, puis découpés jusqu'au métal ou au bois nu. Les roues extérieures doubles et les roues de secours doivent être enlevées pour permettre une décontamination efficace des moyeux ainsi que l'inspection des supports des roues de secours. Toutes les matières fécales et litière animales doivent être enlevées. Toute matière organique doit être considérée comme contaminée puis désinfectée et brûlée ou enterrée. Tous les appareils ou installations doivent être démontés afin de s'assurer que les matières contaminées ont été éliminées. Toutes les surfaces doivent être nettoyées, puis désinfectées. Les roues, les passages de roue, la carrosserie et le châssis doivent être débarrassés des débris puis désinfectés. La cabine du chauffeur et les couchettes doivent également être désinfectées.

12.6 Élimination des carcasses

Cette partie du chapitre décrit brièvement puis résume les principales méthodes d'élimination des carcasses d'animaux. Une bibliographie intéressante et spécialisée est disponible, basée sur l'expérience acquise sur le terrain lors de la gestion de foyers tels que le foyer d'IA survenu en 1984 en Virginie (États-Unis)

et le foyer de fièvre aphteuse survenu en 2001 au R-U (Berglez 2003 ; Agence pour l'environnement du R-U, 2001). Les lecteurs doivent tenir compte du fait que toutes ces informations doivent être mises en application de manière flexible, car l'élimination des carcasses fait partie d'un plan de gestion des cas d'urgence basé sur des options d'élimination spécifiques. Les décideurs doivent être au courant des diverses technologies d'élimination, comprendre leur mode opératoire et être conscients des équipements nécessaires, des coûts, de l'impact sur l'environnement et des détails logistiques concernant chaque technologie. Cette expertise est obtenue par la formation d'une équipe d'experts *ad hoc*.

Le principal objectif de l'élimination des carcasses et des produits animaux est de limiter la propagation de la maladie. Dans cette optique, l'élimination des carcasses doit être considérée comme une composante essentielle des programmes de maîtrise et d'éradication des maladies animales. Le maintien des normes de biosécurité et la diminution des risques de propagation de la maladie nécessitent une connaissance de l'épidémiologie de l'agent infectieux ; cette connaissance influencera le choix des méthodes d'élimination. Indépendamment de la méthode choisie, l'élimination rapide et la répartition des déchets selon leur potentiel d'infectivité sont d'une importance capitale.

Les méthodes utilisées pour l'élimination des animaux et produits animaux, ainsi que le choix des sites d'élimination, doivent être fondés sur les principes ci-dessous. Un processus décisionnel intégrant ces principes doit être entrepris avant l'adoption d'un plan d'action particulier (Ausvetplan 2007) :

- prévention de la propagation de la maladie ;
- rapidité ;
- rentabilité ;
- exigences des législations locales ;
- sécurité de la communauté ou de l'opérateur ;
- conditions environnementales locales et disponibilité des ressources.

La désignation d'une équipe d'experts peut être envisagée pour analyser la situation sur le terrain et afin de guider le processus décisionnel. Ce processus produira des recommandations permettant la mise en œuvre de la meilleure solution applicable au niveau local.

Après l'élimination des carcasses, les facteurs à long terme doivent être envisagés et planifiés, notamment la maintenance, la surveillance et la réhabilitation des sites d'élimination. Les carcasses peuvent être enterrées, incinérées, compostées ou partir à l'équarrissage.

12.6.1 Ensevelissement

Il existe trois techniques d'ensevelissement : (1) l'ensevelissement en tranchées, (2) l'enfouissement et (3) les sites d'ensevelissement en masse.

12.6.1.1 L'ensevelissement en tranchées

Cette démarche comprend l'excavation d'une tranchée, la disposition des carcasses à l'intérieur de celle-ci et l'utilisation du matériel excavé pour les recouvrir. Ce procédé est largement utilisé car il nécessite peu d'expertise. Il est relativement peu coûteux puisque la plupart des équipements nécessaires sont aisément disponibles. L'ensevelissement en tranchée est généralement adopté dans les fermes ou sur le terrain, pour les mortalités quotidiennes. Il est probablement plus discret que les autres méthodes telles que l'incinération à ciel ouvert. Les estimations du coût interne de l'ensevelissement en tranchée peuvent être très différentes en situation d'urgence. Lorsque cette méthode d'élimination est choisie, il est nécessaire de déterminer si le site est adapté à l'ensevelissement. Le choix du site, et par conséquent son utilisation à des fins d'ensevelissement, dépend des propriétés du sol, de la topographie, des propriétés hydrologiques, de la proximité des plans d'eau et des zones publiques, des chaussées, des lignes municipales et privées ainsi que de l'accessibilité. Les inconvénients de cette méthode incluent la contamination potentielle de l'environnement, en particulier celle de l'eau. Les régions où la nappe phréatique est profonde et où le sol est relativement imperméable conviennent à l'élimination par ensevelissement en tranchées. Cette méthode constitue un moyen « d'oublier » les carcasses (NABC 2004) pendant qu'elles se décomposent, mais elle ne garantit pas l'élimination de l'agent infectieux. En effet, il a été démontré que le résidu se trouvant dans un site d'ensevelissement peut persister pendant plusieurs années (NABC 2004) de telle sorte que l'élimination finale des carcasses demeure un processus à long terme.

L'utilisation de l'ensevelissement en tranchées pour l'élimination des carcasses a été adoptée lors du foyer apparu en 1984 en Virginie, aux États-Unis (Mixston 2003). 5 700 tonnes de carcasses (soit 5 170 953 kg) furent alors éliminées. Le coût a été évalué à 25 dollars par tonne (Berglez 2003). L'ensevelissement sur le terrain fut la première méthode utilisée et sélectionnée pour l'élimination de 85 %

des carcasses. Vers la fin du foyer, les tranchées furent normalisées à une largeur de 20 pieds (6 m), une profondeur de 10 pieds (3 m) et une longueur permettant de loger les carcasses. Ceci correspondait à environ 20 pieds cube pour 800 livres (environ 363 kg) de carcasses de volailles.

12.6.1.2 Les sites d'enfouissement

Les sites d'enfouissement ont été largement utilisés en tant que moyen d'élimination des carcasses, dans le cadre de nombreux efforts d'éradication de la maladie, notamment dans les foyers d'IA survenus en 1984 et 2002 en Virginie (Berglez 2003) et les foyers de MN apparus en 2002 en Californie du Sud (Riverside County Waste Management Department 2003). Les avantages de cette méthode incluent :

- la double utilité des sites d'enfouissement, qui peuvent être autorisés à accepter les déchets animaux ;
- les installations présentes sur les lieux ;
- la capacité importante ;
- l'existence antérieure des sites et leur disponibilité immédiate ;
- le fait que des mesures de protection de l'environnement aient déjà été sélectionnées et mises en place.

Les inconvénients sont les suivants :

- ces sites peuvent ne pas être situés à proximité de la source de déchets dont on veut disposer. Les vecteurs de la maladie risquent alors de se propager lors du transport des carcasses (ce problème est commun à toutes les méthodes d'élimination hors site) ;
- l'engagement à entretenir le site doit être pris sur le long terme, donc coûteux sur une période prolongée ;
- le processus ne génère pas de sous-produit utilisable ;
- les sous-produits primaires résultant de la décomposition des déchets enfouis sont le lixiviat et les gaz.

Le lixiviat est défini comme étant un « liquide ayant filtré ou ayant été produit à partir des déchets solides, et contenant des matières solubles en suspension ou miscibles, extraites de ces déchets » (US EPA 1995). La quantité de lixiviat produite dépend de la quantité de liquide initialement contenue dans les déchets (lixiviat primaire) et du volume des précipitations qui pénètrent le site d'enfouissement à travers la bâche ou qui tombent directement sur les déchets (lixiviat secondaire) (US EPA 1995). La composition du lixiviat dépend du stade de décomposition (phase acétique vs phase méthanogène). Si le lixiviat n'est pas correctement géré, il peut s'échapper du site d'enfouissement et entraîner la pollution de l'environnement. Les gaz provenant de l'enfouissement

sont généralement composés de 50 % de méthane et de 50 % de dioxyde de carbone et proviennent de la décomposition anaérobie de la matière organique enfouie. S'ils sont laissés tels quels, les gaz enfouis peuvent se décharger dans l'atmosphère ou migrer sous terre. Des systèmes de contrôle actif ont été employés, utilisant des puits ou des tranchées de récupération de gaz ainsi que des pompes à vide pour le contrôle de la migration des gaz enfouis.

Les sites d'enfouissement modernes de type D sont conçus pour empêcher les fuites de lixiviat en dehors du site. Les points clés de ces sites d'enfouissement sont le revêtement intérieur en matière composite, les systèmes de contention du lixiviat et les systèmes de récupération des gaz.

Durant le foyer d'IA survenu en 1984 en Virginie, environ 15 % des carcasses de volailles furent éliminées dans des sites d'enfouissement (Berglez 2003). Le site d'enfouissement utilisé à ce moment-là était un dépôt non réglementé et posait un problème de contamination potentielle des eaux souterraines et de surface. Ces préoccupations écologiques n'eurent pour seul effet qu'un usage restreint du site. Les sites d'enfouissement commerciaux jouèrent un rôle plus important dans le foyer de 2002, en Virginie. 16 900 tonnes de carcasses furent éliminées lors de ce foyer, dont 85 % dans des sites d'enfouissement (Berglez 2003). Le transport des déchets se révéla être le principal obstacle.

En octobre 2002, un foyer de MN était confirmé dans un troupeau de basse-cour du sud de la Californie et se répandit à d'autres élevages, principalement des lots de basse-cour. Environ 3 160 000 oiseaux furent évacués de 2 148 locaux, au cours de l'éradication. La principale méthode utilisée pour l'élimination des carcasses était les sites d'enfouissement. Le coût fut estimé à environ 40 \$ par tonne (Hickman 2003). Au cours de ce foyer, le département de gestion des déchets du comté de Riverside avait mis au point une vidéo de formation sur la façon correcte de manipuler les déchets contaminés ; elle était destinée aux opérateurs travaillant sur les sites d'enfouissement (Riverside County Waste Management Division 2003).

12.6.1.3 Ensevelissement en masse

Les sites d'ensevelissement en masse peuvent traiter un grand nombre de carcasses.

Ces sites intègrent des systèmes de collecte, de traitement et d'élimination du lixiviat et des gaz. Les sites d'ensevelissement en masse eurent un

rôle clé dans le foyer de fièvre aphteuse survenu en 2001, au Royaume-Uni. C'est de cet épisode que fut tirée la majeure partie de l'information concernant cette méthode. Comme le montre l'expérience du Royaume-Uni, il est essentiel d'effectuer une évaluation du site avant de commencer son développement, afin de minimiser les difficultés opérationnelles. La surface totale de terrain nécessaire dépend du volume des carcasses et de l'espace requis pour les opérations. L'avantage principal de l'ensevelissement en masse est la possibilité de se débarrasser d'un grand nombre de carcasses. Cependant, l'expérience du Royaume-Uni a provoqué des réactions négatives de la part du public envers cette méthode. Parmi les inconvénients de l'ensevelissement en masse, les principaux enjeux sont les coûts élevés à long terme de la surveillance et de la gestion des installations.

12.6.1.4 Autres remarques

Pour toutes les techniques d'enfouissement décrites, la situation géographique des sites doit être enregistrée de manière précise. Le choix du site doit tenir compte des considérations suivantes : accès au site, environnement (nappe phréatique, proximité des municipalités, etc.) et construction (stabilité du sol, nécessité de clôtures et de rebords, etc.) (Ausvetplan 2007). De plus, une inspection régulière du site est recommandée, dans une optique de prévention des problèmes et afin de restituer le site dans son état initial. Une sélection appropriée du site influencera le temps de décomposition des carcasses d'animaux enfouies, puisque ce temps dépend de la température, de l'humidité, de la profondeur d'ensevelissement ainsi que du type de sol et de son drainage.

L'impact de l'ensevelissement des volailles sur l'environnement a été mal étudié et doit faire l'objet d'études plus poussées (Freedman & Fleming 2003). L'impact principal de l'ensevelissement en masse sur l'environnement est associé au risque de contamination potentielle des eaux souterraines par les produits chimiques provenant des carcasses en décomposition. Deux rapports se référant aux techniques d'ensevelissement des oiseaux ont fourni des preuves de ces éventualités. Glanville (1993, 2000) a évalué la quantité et le type de contaminants libérés à partir de deux puits peu profonds contenant 6 200 livres de carcasses de dindes. Des taux élevés d'ammoniac, de particules dissoutes totales, de demande biochimique en oxygène (DBO) et de chlorure furent observés dans le puits de surveillance le plus proche du site d'ensevelissement.

Ritter et Chirnside (1995, 1990) ont examiné l'impact des fosses d'élimination d'oiseaux morts sur la qualité des eaux souterraines. Sur une période de surveillance de 3 ans, certaines fosses avaient affecté la qualité des eaux souterraines et l'azote posait davantage de problème que la contamination bactérienne.

12.6.2 Incinération

De manière générale, l'incinération a joué un rôle important dans l'élimination des carcasses. Cependant, la conscience croissante des problèmes de santé publique et les progrès technologiques ont entraîné une diminution de son utilisation. Il existe trois types de techniques d'incinération : (1) l'incinération en plein air, (2) l'incinération en installation fixe et (3) l'incinération à rideau d'air (NABC 2004).

12.6.2.1 Incinération à ciel ouvert

Dans de nombreux pays, l'incinération des carcasses à ciel ouvert, y compris sur des amas de combustibles tels que les bûchers, a été remplacée par d'autres méthodes d'élimination. Le volume de cendre produite peut être énorme (NAO 2002) et comporte un risque potentiel de contamination des eaux souterraines et du sol par les hydrocarbures servant de combustible (Crane 1997).

L'incinération à ciel ouvert n'est pas autorisée dans tous les pays ou régions. Dans la plupart des cas, il faut obtenir l'autorisation des autorités locales. En situation d'urgence déclarée pour l'élimination des carcasses d'animaux, il pourrait être possible de passer outre la politique locale (Ellis 2001). L'incinération à ciel ouvert est la plus longue des trois méthodes d'incinération. La durée du processus dépend de l'espèce animale brûlée. Selon Berglez (2003), plus le pourcentage de graisse animale est important, plus la carcasse brûlera efficacement.

L'incinération à ciel ouvert entraîne une sensibilisation importante du public, engendrant souvent une image négative de la gestion d'un foyer. Au moment de la sélection du site, il est essentiel de communiquer d'abord avec les communautés locales à propos des projets d'incinération à ciel ouvert (Wid-drington FMD Liaison Committee).

12.6.2.2 Incinérateurs à installations fixes

Ce sont les petits incinérateurs utilisés dans les fermes, les petites et grandes installations d'incinération, les

fours crématoires et les incinérateurs de centrales électriques (NABC 2004).

Par opposition à l'incinération à ciel ouvert, l'utilisation d'incinérateurs fixes permet une élimination hautement contrôlée et confinée. Les incinérateurs fixes sont généralement alimentés au diesel, au gaz naturel ou au propane. De nombreux incinérateurs sont équipés de brûleurs post-combustion, qui brûlent totalement les gaz hydrocarbonés. Comparée à l'incinération à ciel ouvert, la cendre produite est considérée sans danger et peut être rejetée sur les sites d'enfouissement (Ahlvers 2003). Les incinérateurs fixes conviennent mieux à l'élimination de petites quantités de matières. Leur manque de mobilité les rend moins pratiques (Ausvet-plan 2007).

12.6.2.3 Incinération à rideau d'air

L'incinération à rideau d'air est une technologie relativement nouvelle pour l'élimination des carcasses. Cette technologie fait intervenir un ventilateur soufflant une masse d'air à travers un collecteur et générant ainsi un milieu turbulent dans lequel l'incinération est considérablement accélérée, jusqu'à six fois plus vite qu'une incinération à ciel ouvert (NABC 2004 ; Ford 1994). Les ventilateurs propulsent de l'air à haute vitesse dans une boîte en métal réfractaire ou dans une fosse d'incinération. Les matériaux requis pour le système à rideau d'air sont le bois (notamment des palettes, selon un rapport bois/carcasse variant entre : 1:2 et 2:1), du carburant pour le feu et un ventilateur à rideau d'air (Ford 2003). Les installations à rideau d'air peuvent être de tailles variables et être construites en tant qu'unités mobiles. Elles présentent d'autres avantages tels que le fait d'être conçues pour atteindre des températures très élevées entraînant une combustion extrêmement efficace, qui fournit une meilleure maîtrise du feu et une économie de carburant plus importante que celles obtenues avec les bûchers (Ausvetplan 2007). Cependant, elles nécessitent une surveillance active au cours de l'opération ainsi qu'un site approprié pour la construction de la fosse.

12.6.2.4 Autres remarques

L'expérience a montré que certains inconvénients peuvent être observés lors de l'incinération, tels que le fonctionnement au cours d'inversions atmosphériques (quotidiennes ou liées à un front climatique) ; il en

a résulté une fumée et une odeur persistantes ainsi qu'une probabilité élevée que les équipements prennent feu et que surviennent d'autres défaillances. Des sources d'appoint d'équipements de réserve doivent être répertoriées et une surveillance étroite de l'air est nécessaire afin de garantir la sécurité des habitants de la région (Flory *et al.* 2006). Toutes les techniques décrites présentent un risque d'incendie et produisent des cendres.

12.6.3 Compostage

Le compostage est un processus naturel, au cours duquel les microorganismes décomposent la matière biologique en présence d'oxygène et la transforment en produit stable et sans risque (Ausvetplan 2007 ; NABC 2004 ; Mukhtar *et al.* 2004). Il a été démontré que le compostage aérobie est une technologie d'élimination de grande valeur. Le compostage des carcasses présente de nombreux avantages, allant d'un impact réduit sur l'environnement à la génération d'un sous-produit de valeur et à la destruction des pathogènes.

Le processus de compostage comporte deux étapes. Au cours de la première phase, la température augmente, les tissus mous se décomposent et les os entrent en décomposition. Cette phase peut durer de 3 semaines à 3 mois (Haug 1993). Pendant la deuxième phase, il y a décomposition des matières restantes, principalement des os. Le compost se transforme en une terre noire (humus), contenant principalement des bactéries non pathogènes et des nutriments nécessaires aux végétaux. Cette phase dure environ un mois. La fin de la deuxième phase est caractérisée par une température interne de 25-30 °C. Cette phase nécessite un transfert du tas de compostage de la fosse primaire vers une fosse secondaire.

Au cours du compostage des carcasses d'animaux, les microorganismes transforment le corps de l'animal mort et les substrats carbonés en un mélange stable de biomasse bactérienne et d'acides organiques (Keener *et al.* 2000). Les systèmes de compostage de carcasses nécessitent et dépendent de la disponibilité des matières carbonées. Les sources de carbone peuvent inclure les litières des volailles, le fumier, la paille provenant des champs de céréales et d'autres sous-produits tels que les coquilles de cacahuètes. Plusieurs ratios de matières carbonées et de déchets animaux sont recommandés dans la bibliographie. Le plan Ausvetplan (2007) recommande une proportion de 3 pour 1 (w/w). Selon la NABC (2004), un mélange de 50/50 (w/w)

peut être utilisé comme base de compostage. En règle générale, la proportion est définie selon le rapport carbone sur azote (C/N). Une proportion de 1:1 des substrats carbonés par rapport aux déchets animaux a été proposée pour des matières ayant un rapport C/N élevé (tel que la sciure de bois), 2:1 pour des matières ayant un rapport C/N moyen (tel que la litière) et 4 : 1 pour des matières ayant un rapport C/N faible (comme la paille) (NABC 2004). Le tableau 12.3 résume les conditions recommandées pour un compostage actif.

Des agents d'étoffement sont également utilisés lors du processus de compostage car ils fournissent des nutriments au système et maintiennent une bonne aération du tas de compost (porosité de 25-35 %), tout en prévenant le tassement. La proportion proposée de l'agent d'étoffement par rapport aux carcasses devrait conduire à une densité brute ne dépassant pas 600 kg/m³.

Bien que les critères de sélection d'un site varient selon les législations locales, certaines caractéristiques doivent toujours être prises en compte. Un site de compostage doit se situer dans une région bien drainée, au moins 90 cm au-dessus du niveau de la nappe phréatique et à au moins 90 m des ressources en eau. Le site doit également contenir une pente adéquate (1-3 %) permettant un drainage correct. Le ruissellement provenant des installations de compostage doit donc être recueilli et dirigé loin des installations de production (NABC 2004).

12.6.3.1 Compostage par andains et en fosse

Ces deux techniques de compostage ont des directives communes, malgré le fait que des principes de gestion différents puissent être requis.

Le compostage par andains (Fig. 12.1) doit être placé au point le plus haut sur le site identifié. Un revêtement en plastique recouvrant la base de l'andain est nécessaire à la protection contre l'humidité. Ce revêtement doit ensuite être complètement recouvert de matières destinées au co-compostage (telles que la sciure de bois ou la paille) ; jusqu'à une épaisseur de 30 cm pour les carcasses de petite taille. Une couche d'agent d'étoffement (litière) est alors placée par-dessus, afin d'absorber l'humidité provenant des carcasses et de maintenir une porosité adéquate. Pour les carcasses de petite taille, l'agent d'étoffement doit avoir une épaisseur de 0,5 pied (15 cm) (NABC 2004). Une couche de carcasses doit ensuite être placée au-dessus de la couche d'agent d'étoffement. Pour les

carcasses de petite taille, la première couche d'animaux peut être recouverte de matières destinées au co-compostage, puis d'une deuxième couche de carcasses. Après le processus de disposition en couches, tout l'andain doit être recouvert d'une couche épaisse de matière agissant comme filtre biologique (sources de carbone/agents d'étoffement) Pour cette méthode de construction, les dimensions approximatives de l'andain fini sont les suivantes (pour les carcasses de petite taille) : largeur du fond : 3,6 m, largeur du haut : 1,5 m, hauteur : 1,8 m.

Le compostage en fosse convient parfaitement à l'élimination des carcasses de petite taille. La capacité requise pour la fosse dépendra du type de matière utilisée pour le co-compostage. Une fosse d'environ 10 m³ est nécessaire pour 1 000 kg de carcasses. Les fosses peuvent être construites à partir de n'importe quel matériau, tel que le bois ou le béton. Un moyen simple et économique de construire une fosse consiste à utiliser de grandes bottes rondes, placées bout à bout afin de former une structure à trois côtés (composteurs à bottes). Les fosses peuvent être recouvertes ou non d'une dalle, bien que ceci puisse s'avérer efficace dans les régions pluvieuses, réduisant alors le ruissellement potentiel provenant du tas. Si les parois de la fosse sont en béton, l'épaisseur recommandée est de 15 cm. La hauteur doit se situer entre 1,5 et 1,8 m et la largeur ne doit pas dépasser 2,4 m.

L'avant de la fosse est conçu pour permettre un chargement facile des carcasses, assurant ainsi que les carcasses ne dépassent pas une hauteur d'environ 1,5 m.

Le processus de compostage en fosse comporte deux étapes : la première consiste essentiellement à disposer une base de litière (40–50 cm) dans la fosse, 2 jours avant d'y mettre les carcasses, afin qu'elle soit préchauffée. Avant d'introduire les carcasses, il faut enlever 15 cm de litière préchauffée puis placer les carcasses sur la litière restante. Ceci permettra l'absorption des fluides, empêchant ainsi les fuites. Les carcasses sont ensuite complètement recouvertes par la litière restante préchauffée. Ensuite, les carcasses sont disposées en couches, en plaçant une couche épaisse de matière servant de source de carbone entre les couches de carcasses. Une couche finale de sciure de bois (60 cm) doit être placée par dessus. La deuxième phase du processus consiste à déplacer le tas dans une fosse secondaire et à le recouvrir d'un minimum de matière de co-compostage. La matière est humidifiée afin de permettre au tas de se réchauffer afin d'obtenir un produit final acceptable.

La réussite du compostage dépend de facteurs déterminants : le temps, la porosité, l'aération et surtout la température. Bien que les températures élevées favorisent une décomposition rapide et une élimination efficace des pathogènes, des températures excessivement élevées peuvent inactiver les enzymes recherchées. Le temps nécessaire à l'achèvement du processus de compostage dépend de nombreux facteurs. En général, le temps de compostage est plus court dans les climats chauds que dans

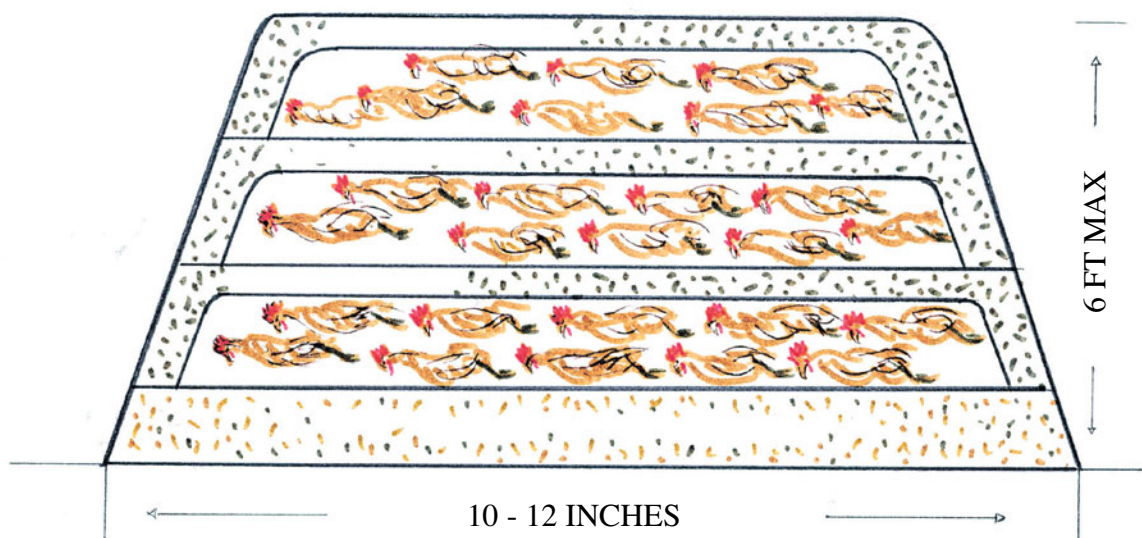


Fig. 12.1 Coupe transversale du compostage des carcasses dans un andain (Carr *et al.* 1998). Si la paille est utilisée, en placer une couche de 3-4 pouces par-dessus la sciure de bois ou la litière. La quantité de sciure de bois peut être diminuée à 4-6 pouces. (Avec l'aimable autorisation d'Amelio Meini.)

Tableau 12.3 Taux de mortalité des volailles et poids de calcul (adapté de l'OSUE, 2000)^a

Espèce de volaille et stade moyen	Poids individuel en kg (lb) ^a	Taux de perte de volailles (%) ^c	Durée de vie du troupeau (jours)	Poids de calcul en kg (lb) ^d
Poulet de chair	1,8-3,6 (4-8)	4,5-5	42-49	Jusqu'à 3,6 (jusqu'à 8)
Poules pondeuses	2,0 (4,5)	14	440	2,0 (4,5)
Poules reproductrices	1,8-3,6 (4-8)	10-12	440	3,6 (8)
Dindes femelles	6,8-11,4 (15-25)	6-8	95-120	11,4 (25)
Dindes mâles	11,4-19,1 (25-42)	12	112-140	15,9 (35)
Dindes destinées à remplacer les reproductrices	6,8 ; 0-13,6 (15; 0-30)	5-6	210	9,1 (20)
Dindes reproductrices	12,7-13,6 (28-30)	5-6	180	13,6 (30)
Dindes, mâles reproducteurs	31,8-36,4 (70-80)	30	180	34,1 (75)

^a Origine NABC (2004).^b Poids moyen utilisé pour le calcul de la mortalité annuelle en livres.^c Pour les animaux adultes, le pourcentage de perte correspond à un taux annuel sur le nombre moyen de têtes par élevage.^d Poids de calcul utilisé pour calculer les durées des cycles de compostage.

les climats plus froids. La taille de l'animal influe également sur le temps requis.

Pour des carcasses de petite taille telles que les volailles, le temps approximatif au bout duquel les tas sont transférés de la phase primaire à la phase secondaire est de 7-10 jours (NABC 2004). Murphy et Carr (1991) ont observé que le compostage des carcasses de poulets de chair nécessitait deux périodes consécutives de 7 jours pour que les carcasses soient réduites à des résidus osseux. L'annexe C comporte une description du calcul des paramètres corrects pour une installation de compostage efficace pour les volailles. Murphy et Carr (1991) et Keener et Elwell (2000) ont développé un modèle basé sur une formule mathématique pour le calcul des volumes de compostage. Les tableaux 12.3 et 12.4 présentent le poids de calcul utilisé pour calculer les durées des cycles de compostage pour les volailles.

12.6.3.2 Autres remarques

Les leçons tirées des foyers d'IA de 2002 aux États-Unis suggèrent que les facteurs importants pour la réussite du compostage en interne sont une implication active des exploitations avicoles dans la gestion du processus, la formation d'une équipe d'experts, la disponibilité de matières carbonées et de litière, l'identification des sources de carbone et d'eau et l'identification rapide des équipes d'intervention formées et équipées pour le compostage des troupeaux dans les 24 h qui suivent la confirmation de l'infection par un virus IA ou MN (Flory *et al.* 2006). L'expérience des États-Unis a montré que le compostage en interne est préférable aux autres

Table 12.4 Conditions recommandées pour le compostage actif (Rynk 1992)

Rapport carbone sur azote (C/N) ^b	20:1-40:1
Teneur en eau	65 %
Concentration en oxygène ^c	> 5 %
Taille des particules (diamètre en pouces)	0,5-2
Porosité du tas	> 40 % ^d
Densité brute	474-711 kg/m ³ (800-1200 lb/yard ³)
pH	5,5-9
Température (°F)	110-150

^a Bien que ces recommandations concernent le compostage actif, les conditions situées en dehors de ces fourchettes peuvent aussi bien produire la réussite des résultats.^b Base de poids (w:w) Des rapports C/N > 30 minimisent les odeurs potentielles.^c Une probabilité croissante d'odeurs importantes survient à une concentration en oxygène d'environ 3 % ou moins. Le maintien des conditions d'oxydation est la clé de la minimisation des odeurs.^d Selon les matériaux spécifiques, la taille du tas et/ou les conditions météorologiques.

méthodes d'élimination. Les principaux inconvénients de cette méthode incluent la nécessité d'une gestion à long terme et le risque que comporte le transport des matières carbonées en dehors du site, avec un risque potentiel de propagation secondaire de l'agent infectieux par les véhicules de transport. Dans certaines conditions atmosphériques, une odeur déplaisante peut persister pendant des périodes prolongées.

12.6.4 Équarrissage

L'équarrissage est le nom donné au processus qui consiste à faire cuire et à stériliser les déchets non comestibles. Ce processus a été plus précisément défini comme étant la séparation des matières grasses des tissus animaux par application de chaleur, afin d'éliminer l'eau, de stériliser les produits finis et de produire de la farine de viande et d'os (FVO) à partir d'animaux morts ou de déchets associés aux opérations d'abattage (Kamur 1989). L'appellation technique de la farine de viande produite à partir de l'équarrissage des déchets de volailles est : farine de sous-produits avicoles et de plumes hydrolysées (PBHFM), ou plus simplement farine de viande. La farine de viande contient 60 % de protéines et 20-22 % de matières grasses.

L'équarrissage nécessite des températures élevées et de la pression, pour convertir les carcasses animales en produits économiques sans risques, nutritifs et de valeur (UK-DEFRA 2000). L'équarrissage permet de convertir les carcasses animales en trois principaux produits finis : la farine de carcasses, les matières grasses liquéfiées et l'eau. Les principaux procédés d'équarrissage des carcasses comprennent la réduction de la taille, la cuisson et la séparation des matières grasses, de l'eau et des matières protéiques. Les processus d'équarrissage peuvent être classés en « comestibles » et « non comestibles » (NACB 2004). Lors de l'équarrissage comestible, les sous-produits des carcasses sont réduits en petits morceaux et désintégrés par cuisson, produisant de l'humidité et du suif ou de la graisse comestibles. L'équarrissage non comestible convertit les matières protéiques, grasses et kératinisées en suif, farine de carcasse (utilisée dans la nourriture pour bétail, le savon et la production d'acides gras) et engrais. Les matières premières sont déshydratées et cuites ; la graisse et les protéines sont ensuite séparées. Les deux processus d'équarrissage diffèrent pour ce qui est des matières premières et des produits finis. Il existe plusieurs systèmes d'équarrissage, dont deux sont résumés plus bas.

« L'équarrissage humide » fait intervenir l'ajout d'humidité aux matières premières au cours du processus de cuisson. Bien que cette méthode produise du suif de bonne qualité, elle est moins fréquemment utilisée en raison de sa consommation élevée en énergie et des effets défavorables sur la qualité de la graisse (Ockerman et Hansen 2000). Il a été rapporté que l'eau accumulée dans ce système nécessite de l'énergie supplémentaire afin de s'évaporer. Il en résulte des matières résiduelles appelées « liqueur collante » (Romans *et al.* 2001).

La méthode plus récente de « l'équarrissage à sec » utilise la chaleur générée par la condensation de la vapeur. Cette chaleur est appliquée à des vannes agitatrices afin d'obtenir une distribution uniforme de la chaleur. Ceci permet de réduire le temps nécessaire à la cuisson des carcasses. La chaleur indirecte appliquée à ce système permet de convertir l'humidité contenue dans les carcasses en vapeur. Au cours de ce processus, la production de farine de viande est plus importante que celle obtenue par équarrissage humide.

Les deux systèmes, humide et sec, peuvent être convertis en système en lot, comportant plusieurs unités de cuisson (généralement 2 à 5). La plupart des techniques d'équarrissage utilisent un cuiseur en continu, de telle sorte que toutes les étapes d'équarrissage sont effectuées simultanément et l'une à la suite de l'autre (EPAA 2002). Le système nécessite peu ou pas d'intervention manuelle. Les produits finis sont générés à un rythme constant en utilisant de la vapeur indirecte.

Le temps requis pour le processus d'équarrissage dépend surtout de la température et de la pression de l'air. L'augmentation de ces deux paramètres diminue automatiquement le temps d'équarrissage. La pression de l'air influe sur la qualité des produits sortants. Les avantages et les inconvénients des processus d'équarrissage sont énumérés par Flory *et al.* (2006).

Avantages :

- L'industrie avicole possède quelques-unes des usines d'équarrissage, ce qui lui procure une meilleure maîtrise du processus d'élimination.
- La gestion à long terme n'est pas nécessaire.
- Pas d'impact sur l'environnement.
- Le produit fini est utilisable (marché incertain).
- S'il n'existe pas de marché pour le produit, les protéines équarries peuvent être transportées vers un site d'enfouissement dans le respect de la biosécurité.

Inconvénients :

- Les usines d'équarrissage sont souvent situées à proximité des entreprises avicoles. Toutes les sources possibles de transmission de la maladie doivent donc être identifiées et maîtrisées.
- La capacité de l'usine pourrait ne pas convenir.
- En raison de l'amélioration des exigences en matière de biosécurité, il pourrait être nécessaire de consacrer une usine uniquement à l'équarrissage des carcasses atteintes d'IA, pendant toute la durée du foyer. Ceci pourrait ne pas s'avérer économiquement faisable pour un foyer limité.
- Les intégrateurs ne pouvant pas procéder à l'équarrissage seraient à la merci d'une compagnie d'équarrissage privée.

- Les coûts de l'équarrissage sont incertains et peuvent augmenter de façon drastique lors d'un foyer. Les aspects suivants doivent être pris en compte afin de déterminer si l'équarrissage est bien la méthode la plus appropriée pour l'élimination des oiseaux contaminés par le virus de l'IA :
- Des discussions doivent être organisées entre les compagnies d'équarrissage et l'industrie avicole, avant la survenue d'un foyer.
- La plupart des installations d'équarrissage sont privées (c'est-à-dire qu'elles n'appartiennent pas à l'industrie avicole) et ne sont pas autorisées à accepter du matériel contaminé par le virus de l'IA ou de la MN.

Annexe A : Détails pratiques pour la décontamination au formaldéhyde

Le formaldéhyde ne peut être utilisé sans risque que dans certains environnements et entre les mains d'opérateurs expérimentés. Une décontamination efficace au formaldéhyde nécessite la combinaison propice de paramètres tels que la concentration gazeuse, la température, l'humidité relative et le temps de contact. La plupart des protocoles recommandent des concentrations de 2-10 g/m³ de formaldéhyde et une humidité relative de 70-90 %, à une température de 20 °C et sur des intervalles de 15-24 h. Les ventilateurs électriques devraient favoriser une dispersion homogène du gaz au sein de l'espace clos, là où ils sont présents. Bien qu'une humidité relative élevée soit nécessaire à une activité optimale, l'eau ne doit pas être présente sous forme liquide car elle entraînerait la dissolution du gaz et diminuerait sa concentration dans la phase gazeuse. Il est donc difficile de définir les conditions d'humidité relatives requises, en dehors des conditions de laboratoire contrôlées. Une température contrôlée de manière uniforme est également essentielle pour une décontamination efficace. Si la température des parois du conteneur ou des murs du bâtiment chute au cours de la décontamination, le formaldéhyde se polymérise sur ces parois et formera un précipité de paraformaldéhyde pulvérulent, qui réduit l'efficacité de l'opération et pose des problèmes de toxicité résiduelle. De telles conditions se produisent vraisemblablement dans les bâtiments ou les véhicules des fermes, lors des décontaminations effectuées la nuit.

La fumigation doit être effectuée à la fin du protocole de désinfection, afin d'optimiser l'effet viricide du formaldéhyde. La production du gaz peut être obtenue par addition d'une solution de formol (20 mL/m³) à du

permanganate de potassium (16 g/m³). Il s'ensuit une réaction vive, produisant de la chaleur et une ébullition. Cette réaction présente un danger potentiel pour un opérateur inexpérimenté. Les locaux doivent être préparés à l'avance, afin que l'opérateur puisse mélanger les ingrédients et quitter rapidement les lieux. Il doit porter des vêtements de protection et un masque respiratoire recouvrant complètement le visage. Le formaldéhyde étant un gaz très toxique, il doit être entièrement retenu dans l'espace traité puis neutralisé de manière efficace avant l'exposition, par réaction avec de l'ammonium gazeux obtenu en chauffant du carbonate d'ammonium. Les masques respiratoires et les équipements spéciaux sont indispensables à la maîtrise du formaldéhyde résiduel.

Annexe B : Techniques de destruction sans cruauté des animaux

La méthode d'abattage choisie doit être celle qui garantit un volume d'abattage élevé, quelles que soient les conditions météorologiques. Tous les oiseaux devant être tués dans le cadre du contrôle de maladies, doivent être manipulés avec le même soin et le même souci de leur bien-être que s'il s'agissait d'oiseaux destinés à la consommation. L'abattage effectué à des fins de contrôle de maladies ainsi que la vaccination, doivent être exécutés uniquement par des personnes correctement formées. Les formations doivent être dispensées lorsqu'il n'y a pas de foyer de maladies, de telle sorte que des personnes efficaces et bien formées soient disponibles à l'apparition d'un foyer. Les ressources doivent être mises à disposition pour la création d'un groupe de facilitateurs formés au tri en urgence de grandes quantités d'oiseaux. Il est conseillé de faire participer les communautés fermières locales, en dehors des périodes de crise, à l'élaboration de plans destinés à chaque exploitation ou type d'exploitation. De cette façon, dans l'éventualité d'un foyer de maladie telle que l'IA, le processus d'abattage sera optimal et comportera un minimum de souffrance pour les animaux. La taille, la structure et la physiologie des oiseaux sont très variables. De nombreuses espèces nécessitent une manipulation experte au cours de l'euthanasie. Il est donc recommandé de procéder au préalable à une planification et une consultation méticuleuses. S'il existe un risque de propagation du virus aux oiseaux sauvages ou captifs, le bien-être de ces oiseaux doit être sauvegardé.

Le gazage au dioxyde de carbone (CO₂) ou l'overdose de barbituriques sont généralement les méthodes privilégiées pour l'euthanasie. Pour les petits nombres d'oiseaux (notamment les oiseaux

d'agrément et les pigeons), la méthode privilégiée peut être la dislocation du cou (à l'aide de forceps ou à mains nues) ou l'injection de barbituriques.

L'euthanasie des casoars, des émeus, des autruches, des brols et des autres oiseaux rares ou difficiles, requiert l'assistance d'un expert. Pour les grands oiseaux, les options préférées sont l'injection létale (pour les oiseaux captifs) et les armes à feu (pour les oiseaux vivant en plein air). Les embryons se développant dans des œufs fécondés peuvent être tués par refroidissement à +4 °C, pendant 4 h. Pour les nombres importants d'oiseaux des unités avicoles commerciales, la méthode privilégiée est le gazage au CO₂. Les oiseaux peuvent être attrapés par des équipes de 10-15 travailleurs (de préférence des équipes de ramassage expérimentées). Les poussins sont attrapés facilement sous les lampes de chauffage. Ils sont ensuite transportés dans des poubelles en plastique, jusqu'aux bennes à ordures pour le gazage au CO₂. Les poulets de chair peuvent être conduits vers la zone de ramassage, ou ils seront attrapés puis placés directement dans les bennes.

Les oiseaux de volière sont plus difficiles à attraper et la progression sera plus lente. Les bennes doivent être remplies jusqu'à un certain niveau (entre 70 et 90 %), afin que la couche restante de CO₂ puisse tuer efficacement la dernière couche d'oiseaux et que le camion ne soit pas surchargé. La benne est ensuite scellée et transportée au site d'élimination. Une attention particulière doit être portée à la vérification qu'aucun oiseau n'est encore vivant lors de l'évacuation dans la fosse d'ensevelissement.

Les méthodes suivantes d'abattage des volailles pour la maîtrise de l'IA sont recommandées par le comité Santé et bien-être animal de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA).

- Les oiseaux sont placés dans des conteneurs adaptés, y compris les zones bien réglementées d'un bâtiment ; ces conteneurs contiennent des mélanges appropriés de gaz inertes, par exemple de l'argon mélangé à un maximum de 2 % d'oxygène.
- Les oiseaux sont placés dans un conteneur approprié rempli de 4-6 % de monoxyde de carbone pur, pour une durée d'au moins 6 minutes. Des mesures de protections appropriées doivent être mises en place pour les opérateurs humains.
- À l'exception des canards et des oies pour lesquels le CO₂ ne doit pas être utilisé, les oiseaux ne doivent pas être exposés à plus de 30 % de CO₂ mélangé à du gaz inerte tel que l'azote ou l'argon et à 2 % d'oxygène au plus.
- L'utilisation d'appareil d'insensibilisation électrique portatif, de matériel d'abattage de volailles ou de

pistolet à projectile captif est autorisée, à condition que la mort de chaque animal puisse être confirmée.

- Les oiseaux individuels peuvent être injectés avec des barbituriques ; cette méthode ne peut cependant pas être pratiquée pour les nombres importants d'oiseaux. Pour ce qui est des volailles de moins d'une semaine, les poussins peuvent être jetés dans un macérateur qui les tue instantanément.

Certaines méthodes ne sont pas autorisées, notamment mettre les oiseaux dans des sacs en plastique et les brûler ou les gazer au cyanure d'hydrogène, au monoxyde de carbone impur ou à des concentrations élevées en CO₂. Il n'est pas non plus autorisé de gazer des bâtiments entiers sans délimitation appropriée de la zone occupée par le gaz, ni d'injecter tout produit chimique à l'exception des barbituriques.

Annexe C : Paramètres de calcul pour une installation de compostage efficace des volailles

La formule proposée par Murphy et Carr (1991) est basée sur le concept selon lequel la capacité des systèmes de fosse pour le compostage des volailles dépend du poids vivant théorique de l'élevage. Les auteurs décrivent un modèle selon lequel la capacité maximum de volailles mortes, pour la première phase de compostage, est estimée en se basant sur l'âge et le poids marchand des oiseaux (voir exemple 1 ci-après) :

Capacité quotidienne de compostage = poids vivant théorique de l'élevage/400

Poids vivant théorique de l'élevage = capacité de l'élevage × poids marchand

Keener et Elwell (2000) ont développé des modèles basés sur les résultats d'expériences menées sur un système de fosse de compostage pour volailles (poulets de chair). Ils ont attribué un coefficient volumétrique spécifique de 0,0125 m³/kg de mortalité/cycle de croissance (0,20 pieds³/livre mortalité/cycle de croissance) pour le calcul des volumes primaire, secondaire et de stockage (V1, V2, et V3, respectivement). Comme cela a été évoqué précédemment, les temps de compostage des phases primaire, secondaire et de stockage (T1, T2 et T3, respectivement) sont influencés par divers facteurs internes au tas de compostage et ne sont pas égaux les uns aux autres. En se basant sur les informations précédentes, les auteurs ont proposé les modèles suivants pour le calcul du temps et du volume de compostage nécessaires pour les phases primaire, secondaire et de stockage :

$T1 = (7,42) (W1) 0,5 \geq 10$, jours (5) $V1 \geq (0,0125) (PQM) (T1)$, m³
 $T2 = (1/3) (T1) \geq 10$, jours (7) $V2 \geq (0,0125) (PQM) (T2)$, m³
 $T3 \geq 30$, jours (9) $V3 \geq V2$ ou $V3 \geq (0,0125) (PQM) (T3)$, m³

W1 étant le poids moyen de mortalité en kg et PQM étant la perte quotidienne moyenne ou le taux de mortalité en kg/jour.

Exemple 1 : Calcul du compostage en fosse des carcasses de volailles

L'exemple suivant est basé sur la méthode de Murphy et Carr (1991).

Information disponible

- Exploitation avicole de 100 000 oiseaux de poids marchand égal à 4,5 livres (2,02 kg), dans laquelle les carcasses sont destinées au compostage en fosse.
- 0,45 kg (1 livre) de matière de compostage nécessite un volume d'environ 0,027 m³ (1 pied³).
- Capacité quotidienne de compostage = poids vivant théorique de l'élevage/400.
- Poids vivant théorique de l'élevage = capacité de l'élevage \times poids marchand.

Capacité quotidienne de compostage

La capacité quotidienne de compostage = 100 000 (oiseaux) \times 4,5 (livres/oiseaux)/400 (jours) = 1 125 livres/jour (506,25 kg/jour) ou environ 1 125 pieds³/jour

Nombre de fosses proposés et dimensions

En se basant sur les données expérimentales de Murphy et Carr (1991), les dimensions les plus appropriées pour une fosse sont une longueur de 7 pieds, une largeur de 5 pieds et une hauteur de 5 pieds. Par conséquent :

- N (nombre de fosses de traitement primaire) = (capacité de compostage) / (L \times W \times H d'une fosse primaire).
- $N = (1,125 \text{ pied}^3/\text{jour}) / (7 \text{ pieds} \times 5 \text{ pieds} \times 5 \text{ pieds}) = 6$ fosses de traitement primaire/jour.
- Les six fosses peuvent être disposées dans n'importe quelle configuration répondant aux besoins d'une situation particulière.
- Longueur totale = $(1,125 \text{ pied}^3) / (7 \text{ pieds} \times 5 \text{ pieds}) = 32$ pieds (9,64 m).

- Surface totale = 7 pieds \times 32 pieds = 214 pieds² (19,26 m²).
- Surface de chaque fosse primaire = 214 pieds²/6 = 35 pieds² (3,21 m²).

Exemple 2 : Exemple de calcul du compostage en fosse des carcasses de volailles

L'exemple suivant est basé sur la méthode de Murphy et Carr (2000).

Information disponible

Exploitation avicole ayant un poids marchand moyen de 1,36 kg (3 livres) et une PQM de 13,6 kg/jour (30 livres/jour), où les carcasses sont destinées au compostage en fosse.

$T1 = (7,42) (W1) 0,5 \geq 10$, jours $V1 \geq (0,0125) (\geq (PQM) (T1))$, m³

$T2 = (1/3) (T1) \geq 10$, jours $V2 \geq 0,0125) (PQM) (T2)$, m³

$T3 \geq 30$, jours $V3 > V2$ $V3 \geq (0,0125) (PQM) (T3)$, m³

Relation entre volume, largeur et longueur de la fosse, avec une profondeur ou une hauteur constante de 1,5 m (5 pieds).

Temps et volume de compostage pour les phases primaire, secondaire et de stockage

L'information requise à partir des équations ci-dessus est la suivante :

$T1 = (7,42) (1,36) 0,5 \geq 10$ jours, $T2 (1/3) (T1) \geq 10$ jours et $T3 \geq 30$ jours,

$V1 \geq (0,0125) (\geq 13,6) (10) = 1,70 \text{ m}^3$, $V2 \geq 0,0125) (13,6) (10) = 1,70 \text{ m}^3$ et

$V3 \geq 3 V2$ (recommandé comme paramètre de calcul) = 3 (1,70) = 5,10 m³.

Nombre de fosses nécessaires et dimensions associées

Le volume de la fosse le plus proche de la valeur calculée de 1,7 m³ est de 2,26 m³ (80 pieds³), soit une mini-fosse de dimensions 1,22 m \times 1,22 m \times 1,52 m (4 pieds \times 4 pieds \times 5 pieds).

Il faut, par conséquent, deux fosses primaires ayant chacune une surface de 1,22 m \times 1,22 m = 1,5 m² (16 pieds²) ou un total de 3 m² (32 pieds²), et une fosse secondaire de 1,50 m² (16 pieds²).

La surface de stockage du produit fini est : 5,10 m³ / 1,5 m = 3,36 m².

Références

- Ahlvers (2003) Personal communication to Justin Kastner regarding Kansas State University College of Veterinary Medicine incinerator: Dennis Ahlvers (Physical Plant Supervisor, Kansas State University)
- Ausvetplan Australian Veterinary Emergency Plan, Version 3.1, 2006. Disease Strategy. Avian influenza. Interim Draft
- Ausvetplan Australian Veterinary Emergency Plan, Version 3.1, 2006. Disease Strategy. Newcastle disease
- Ausvetplan Australian Veterinary Emergency Plan. Operational Procedures Manual Disposal, Version 3.0, 2007. Carcass Disposal: A Comprehensive Review
- National Agricultural Biosecurity Center Consortium US-DA APHIS Cooperative Agreement Project Carcass Disposal Working Group, August 2004
- Ausvetplan Australian Veterinary Emergency Plan. Operational Procedures Manual, Version 3.0, 2006. Destruction of animals: A manual of techniques of humane destruction
- Ausvetplan Australian Veterinary Emergency Plan. Operational Procedures Manual, 2000. Decontamination
- Ausvetplan Australian Veterinary Emergency Plan. Persistence of Disease Agents in Carcasses and Animal Products. Report for Animal Health Australia, by Scott Williams. Consulting Pty Ltd Revised - December 2003
- Beard CW, Hanson HP (1984) Newcastle Disease. In: Diseases of poultry. Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, Yoder HW (eds), 8th ed, Ames, I A: Iowa State University Press, pp. 452-470
- Berglez B (2003) Disposal of poultry carcasses in catastrophic avian influenza outbreaks: A comparison of methods (technical report for Master of Public Health). Chapel Hill: University of North Carolina
- Carr L, Broide HL, John HM *et al.* (1998) Composting catastrophic event poultry mortalities. Maryland: University of Maryland & Maryland Cooperative Extension. Retrieved April 21, 2003, from <http://www.agnr.umd.edu/MCE/Publications/Publication.cfm?ID=35>
- Crane N (1997) Animal disposal and the environment. State Veterinary Journal 7(3):3-5
- Davison S, Benson CE, Ziegler AF, Eckroade RJ (1999) Evaluation of disinfectants with the addition of antifreezing compounds against non pathogenic H7N2 avian influenza virus. Avian Dis 43(3):533-537
- De Benedictis P, Beato MS, Capua I (2007) Inactivation of avian influenza viruses by chemical agents and physical conditions: a review. Zoonoses Public Health 54(2):51-68
- EFSA (2005) Animal health and welfare aspects of Avian Influenza. The EFSA Journal 266:1-21
- Ellis D (2001) Carcass disposal issues in recent disasters, accepted methods, and suggested plan to mitigate future events (applied research project for Master of Public Administration). San Marcos, Texas: Texas State University - San Marcos (formerly Southwest Texas State University)
- EPAA European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (2002) Abattoirs: air emission control. Retrieved June 19, 2003, from <http://www.epa.nsw.gov.au/mao/abattoirs.htm>
- Flory GA, Peer RW, Bendfeldt ES (2006) Evaluation of Poultry Carcass Disposal Methods Used During an Avian Influenza Outbreak in Virginia in 2002. Virginia Department of Environmental Quality
- Ford G (2003) Disposal Technology Seminar on Air-Curtain Incineration. Kansas City, Missouri: Midwest Regional Carcass Disposal Conference
- Ford WB (1994) Swine carcass disposal evaluation using air curtain incinerator system, model TCh.2. ?Incineration 25:359 (Foreign Animal Disease Report, 22-2; reprinted by Air Burners, LLC, at http://www.airburners.com/DATAFILES_Tech/ab_swine_report.pdf). Washington: USDA Animal and Plant Health Inspection Service
- Freedman R, Fleming R (2003) Water quality impacts of burying livestock mortalities. Livestock Mortality Recycling Project Steering Committee, August 2003, Ridgetown, Ontario, Canada. Available at http://www.ridgetownc.on.ca/research/documents/fleming_carcassburial.pdf
- Glanville TD (1993) Groundwater impacts of on farm live-stock burial. Iowa Groundwater Quarterly 4:21-22
- Glanville TD (2000) Impact of livestock burial on shallow groundwater quality. Paper presented at ASAE Mid-Central Meeting, St. Joseph, Missouri (No. MC00-116)
- Haug RT (1993) The practical handbook of compost engineering. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, Press, Inc
- Hickman M (2003) Disposal of END waste in southern California by landfill. Kansas City, Missouri: Midwest Regional Carcass Disposal Conference
- Keener HM, Elwell DL, Monnin MJ (2000) Procedures and equations for sizing of structures and windrows for composting animal mortalities. Applied Engineering in Agriculture 16(6):681-692
- Mukhtar S, Auvermann BW, Heflin K, Boriack CN (2003) A low maintenance approach to large carcass composting. Paper written for presentation at the 2003 ASAE Annual International Meeting, Las Vegas, Nevada. Paper Number: 032263

- Murphy DW, Carr LE (1991) Composting dead birds. Extension Sections in Departments of Poultry Science and Agricultural Engineering, University of Maryland at College Park. Fact sheet 537. Retrieved on April 11, 2003 from <http://www.agnr.umd.edu/MCE/Publications/Publication.cfm?ID=145&cat=3>
- NABC National Agricultural Biosecurity Center Consortium. USDA APHIS Cooperative Agreement Project. Carcass Disposal Working Group, August 2004. Carcass Disposal: A Comprehensive Review
- NAO National Audit Office (2002) The 2001 outbreak of foot and mouth disease. London: UK. National Audit Office
- Noll H, Youngner JS (1959) Virus-lipid interactions. II. The mechanism of adsorption of lipophilic viruses to water-insoluble polar lipids. *Virology* 8(3):319-343
- Ockerman HW, Hansen CL (2000) Rendering: Animal by-product processing and utilization. Washington, DC: CRC Press LLC
- Osue (2000) Ohio's livestock and poultry mortality composting manual. Columbus, Ohio, USA: The Ohio State University Extension, available at <http://www.oardc.ohio-state.edu/ocamm/Keener-Maine%20Mortality%20Paper%205-24-05.pdf>
- Ritter WF, Chirnside AE (1990) Dead bird disposal and ground-water quality. Proceedings of the 6th International Symposium on Agricultural and Food Processing Wastes, Chicago, Illinois, pp 414-423
- Ritter WF, Chirnside AE (1995) Impact of dead bird disposal pits on ground-water quality on the Delmarva Peninsula. *Bioresource Technology* 53:105-111
- Riverside County Waste Management Department. Landfill fees. Retrieved September 10, 2003, from http://www.rivcowm.org/landfill_fees_02.htm
- Romans JR, Costello WJ, Carlson CW *et al.* (2001) Packing house by-products. In: *The Meat We Eat*. Danville, Illinois: Interstate Publishers, Inc
- Rynk R (1992) On-farm composting handbook. Ithaca, New York: Northeast Regional Agricultural Engineering Service
- Samberg Y, Meroz M (1995) Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Rev Sci Tech* 14(2):365-380
- UK Environment Agency (2001) The environmental impact of the foot and mouth disease outbreak: an interim assessment
- US EPA. 40 CFR Part 258 - Criteria for municipal solid waste landfills
- US EPA. Office of Solid Waste and Emergency Response. (1995). Decision-makers' guide to solid waste management (Vol. 2). Washington
- UKDEFRA United Kingdom Department for Environment Food and Rural Affairs (2000). The BSE Inquiry: The Report. Vol. 13: Industry Processes and Controls. Ch. 6: Rendering. Annex B: Manufacturing process of rendering. Retrieved June 10, 2003, from <http://www.bseinquiry.gov.uk/report/volume13/chapterj.htm>
- Widdrington FMD, Liaison Committee. Submission to Northumberland FMD Inquiry

Sites Internet

Organisations

Organisation mondiale de la santé animale (OIE)
www.oie.int

- Remise à jour concernant l'influenza aviaire hautement pathogène chez les animaux
- www.oie.int/download/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm
- Influenza aviaire
- www.oie.int/eng/info_ev/en_AI_avianinfluenza.htm

Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)
www.fao.org

- Préparation à l'influenza aviaire hautement pathogène
- www.fao.org/docs/eims/upload/200354/HPAI_manual_en.pdf
- EMPRES (Système de prévention d'urgence pour les ravageurs et les maladies transfrontières des animaux et des plantes)
- www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/home.asp
- Influenza aviaire
- www.fao.org/avianflu/en/index.html

Organisation mondiale de la santé (OMS)

- Influenza aviaire
- www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html

Centre de prévention des maladies (CDC)
www.cdc.gov

- Grippe pandémique
- www.pandemicflu.gov

Comité Santé et bien-être animal de la communauté européenne
www.europa.eu

- Influenza aviaire
- ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/index_en.htm
- 2004/402/EC: Décision de la commission du 26 avril 2004 portant approbation des plans de contingence destinés à la maîtrise de l'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle
eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CEL_EX:32004D0402:EN:NOT

Centre européen de prévention et de contrôle
des maladies (ECDC)
www.ecdc.eu.int

- Influenza aviaire
www.ecdc.eu.int/Health_topics/Avian_Influenza/Avian_Influenza.html

Centre de recherche et de politique concernant
les maladies infectieuses
www.cidrap.umn.edu

- Influenza aviaire
<http://www.cidrap.umn.edu/cidrap/content/influenza/avianflu/index.html>

Autorité européenne de sécurité des aliments
(EFSA)
www.efsa.europa.eu

- Influenza aviaire et aliments
http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_AvianAndFoodFAOs.htm

Grippe en chine et Centre d'information
sur la grippe (FIC)

- <http://www.flu.org.cn/en/default.html>

Réseaux

Réseaux d'expertise de l'OIE et de la FAO
concernant l'influenza animale

<http://www.offlu.net>

FAO – CIRAD - Wetlands international

<http://wildbirds-ai.cirad.fr>

FluTrop-Recherche sur l'influenza aviaire
dans les pays tropicaux

<http://avian-influenza.cirad.fr>

Réseau mondial de surveillance de l'influenza
aviaire

<http://www.gains.org/>

Bases de données génétiques

Ressources ayant trait au virus de l'influenza

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>

Initiative mondiale de partage des données
concernant l'influenza (GISAID)

<http://www.gisaid.org>

Services de notification de courriel

Avian influenza Intelink Digest

<http://www.intelink.gov>

ProMed-mail

<http://www.promedmail.org>

Annexe

Check list pour la visite de locaux suspects

1

Manuela Dalla Pozza

Kit du vétérinaire officiel (VO)

1. Formulaire d'enquête épidémiologique
2. Équipement nécessaire pour la visite clinique et protocoles d'échantillonnage :
 - a. 2 combinaisons jetables
 - b. 5 paires de pédisacs jetables
 - c. 2 paires de gants en caoutchouc et 5 paires de gants en latex
 - d. coiffes et masques faciaux jetables
 - e. lunettes de protection
 - f. serviettes en papier
 - g. 5 récipients étanches
 - h. 5 sacs en plastique étanches et imperméables
 - i. torche électrique
 - j. solution désinfectante
 - k. 2 stylos et un bloc-note
 - l. 100 seringues de 2,5 mL avec aiguilles
 - m. 100 petits sacs en plastique mince
 - n. 2 paires de ciseaux chirurgicaux
 - o. 2 paires de forceps
 - p. ruban adhésif
 - q. 2 feutres
 - r. 1 récipient thermique
 - s. 5 blocs réfrigérants congelés

Au moins deux de ces kits doivent être prêts et disponibles à tout moment, dans les quartiers généraux du VO.

Kit du vétérinaire de laboratoire (VO)

- a. 1 récipient thermique
- b. 4 paires de forceps
- c. 2 paires de ciseaux chirurgicaux
- d. 1 couteau
- e. ruban adhésif
- f. étiquettes
- g. 100 seringues de 2,5 mL avec aiguilles
- h. écouvillons stériles
- i. 50 tubes à essais contenant du milieu de transport viral
- j. 10 récipients étanches
- k. 2 combinaisons jetables
- l. 5 paires de pédisacs jetables
- m. 5 paires de gants en latex
- n. coiffes et masques faciaux jetables
- o. lunettes de protection
- p. 10 sacs poubelle noirs
- q. 50 élastiques
- r. solution désinfectante en brumisateur
- s. récipient en carton

Annexe

Formulaire d'enquête épidémiologique sur les foyers d'influenza aviaire et de maladie de Newcastle

Giuseppe Dalla Pozza

2

Date/...../.....

Dr Numéro de téléphone

Numéro d'enregistrement de suspicion/Numéro d'enregistrement de confirmation.....

Nom de l'exploitation

Adresse..

CAP/Zip/code postal

Province/État/Pays Numéro de téléphone

Code de l'élevage ou numéro d'identification ☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

Propriétaire.....

Compagnie

Adresse du propriétaire Numéro de téléphone

Information fournie par

Vétérinaire de l'élevage Dr..... Présent NON ☐ OUI ☐

COUVOIR D'ORIGINE

Couvoir de l'exploitation NON ☐ OUI ☐

Exploitation Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Code ☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

Numéro de téléphone Fax

Informations concernant l'élevage

Type d'établissement

- ☐ Élevage commercial intensif (locaux intérieurs/environnement contrôlé)
☐ Élevage commercial extensif (accès aux installations extérieures/environnement naturel)
☐ Éleveur/commerçant indépendant
☐ Rural/basse-cour

Catégorie/chaîne de production

Pondeuses d'œufs de consommation ☐

Type de production :

Grands-parentaux/reproducteurs primaires ☐

Reproducteurs parentaux ☐

Poulettes élevage ☐

Pondeuses ☐

Configuration entrant-sortant OUI ☐ NON ☐

Volailles de chair ☐

Type de production :

Grands-parentaux/reproducteurs primaires ☐

Reproducteurs parentaux (filiale chair) ☐

Poulettes élevage ☐

Catégorie chair (*poulet de chair*) ☐

Système d'élevage

Abris	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	N°
Tunnels	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	N°

Fournisseur d'aliment pour animaux :

Aliment traité à la chaleur	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	
Pâtée	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	

Si oui, origine de la pâtée :

Stockage de la nourriture :

Boîte <input type="checkbox"/>	Sac <input type="checkbox"/>	Monticule libre <input type="checkbox"/>
--------------------------------	------------------------------	--

Type de système de ventilation :

Statique

Dynamique

Artificielle

Système d'élevage en plein air	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	m ²
Filets anti-oiseaux	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	

Possibilité de contact avec des oiseaux sauvages :

NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	Espèce
	
	

Opérations de débécquage :

Date D//.....

Réalisé par : Membres de la famille ☐ Personnel employé ☐ Personnel externe ☐ Autre ☐

Remarques

.....

.....

Autres oiseaux présents sur le site (captifs ou vivant en plein air)

NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	Espèce
	
	

Présence d'étangs

ou de lacs :	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	
Autres réservoirs d'eau	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	(spécifier)

Alimentation en eau :

Canalisations	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	
Puits peu profond	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	
Puits profond	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	

Système d'ensemble de lacs (nom) :

Stockage de l'eau :

À l'extérieur	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	
À l'intérieur	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	
Couvert	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	

Présence de porcs

NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	N°	
Autres animaux	NON <input type="checkbox"/>	OUI <input type="checkbox"/>	(spécifier)

Remarques

.....

Données relatives à l'introduction et à la propagation de l'infection :
les informations nécessaires aux points 1-3 ci-dessous doivent être recueillies
pour tous les déplacements d'animaux ou de personnes et doivent être répétées
pour chaque évènement à risque potentiel.

1. Déplacements d'oiseaux

a) Introduction d'oiseaux à partir d'autres établissements/couvoirs/élevages NON ☐ OUI ☐

(à partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques)

Date/...../..... N° Espèces Ferme ☐ Couvoir ☐

Nom de l'exploitation..... Code

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Plaque d'immatriculation du véhicule

b) Introduction d'oiseaux en provenance d'expositions/marchés/foires NON ☐ OUI ☐

(À partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques)

Date/...../..... N° Espèces

Origine : Foire ☐ Marché ☐ Exposition ☐

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

c) Sortie d'oiseaux/œufs en direction d'autres établissements/couvoirs/abattoirs NON ☐ OUI ☐

(À partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques ainsi que la date à laquelle l'élevage a été mis sous restriction)

Date/...../..... N° Espèces

Destination : Autre élevage ☐ Couvoir ☐ Abattoir ☐ Autre

Nom de l'exploitation..... Code

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

d) Sortie d'oiseaux/œufs en direction d'autres foires/marchés/expositions NON ☐ OUI ☐

(À partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques ainsi que la date à laquelle l'élevage a été mis sous restriction)

Date/...../..... N° Espèces

Destination : Foire ☐ Marché ☐ Exposition ☐ Autre

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

2. Déplacements de personnes : modes d'introduction ou de propagation possibles de l'infection

(À partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques ainsi que la date à laquelle l'élevage a été mis sous restriction)

NON ☐ OUI ☐

Date/...../..... Nom de famille et prénom

- ☐ Vétérinaire ☐ Technicien
☐ Équipe de vaccination ☐ Personne effectuant le débecquage
☐ Autre éleveur ☐ Commerçant
☐ Autre (spécifier)

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

..... Numéro de téléphone

Élevage visité précédemment : Nom

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Date/...../.....

3. Déplacement de mammifères (influenza aviaire uniquement)

Introduction de mammifères en provenance de fermes/marchés/expositions NON ☐ OUI ☐

(À partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques)

Date/...../..... N° Espèces Foire ☐ Marché ☐ Exposition ☐

Nom de l'exploitation.....

Code

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Plaque d'immatriculation du véhicule de transport d'animaux

Déplacement de mammifères vers d'autres destinations (fermes/abattoirs) NON ☐ OUI ☐

(À partir de 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques ainsi que la date à laquelle la ferme a été mise sous restriction)

Date/...../..... N° Espèces

Ferme ☐ Abattoir ☐ Autre

Nom de l'exploitation.....

Code

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Plaque d'immatriculation du véhicule de transport d'animaux

a) Contacts indirects avec d'autres établissements avicoles NON ☐ OUI ☐

(Utilisation conjointe d'équipement, de véhicules, d'aliment pour animaux et de personnel, 21 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques ainsi que la date à laquelle l'élevage a été mis sous restriction)

Date du contact/...../.....

Nom de l'exploitation..... Code ☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Espèce élevée Numéro

☐ Véhicule mis en commun

☐ Aliment mis en commun

☐ Équipement mis en commun

☐ Personnel commun

☐ Récupération/recyclage de la litière

☐ Autre (spécifier)

b) Autres élevages appartenant au même propriétaire NON ☐ OUI ☐

Nom de l'élevage ou de l'exploitation..... Code ☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Espèce élevée Numéro

Vide ☐ Plein ☐

c) Élevages avicoles situés à proximité du foyer NON ☐ OUI ☐

Nom de l'élevage ou de l'exploitation..... Code ☐☐☐ ☐☐ ☐☐☐☐

Adresse

CAP/Zip/code postal Province/État/Pays

Distance en mètres

Vide ☐ Plein ☐

Données anamnestiques

Mortalité hebdomadaire

NB : données concernant les taux de mortalité enregistrés à partir de 6 semaines avant l'apparition des premiers signes cliniques

Dates		Nombre d'animaux morts
À partir du	Jusqu'au	

NB : Le registre des mortalités hebdomadaires de l'élevage doit être accessible et signé par l'éleveur et le vétérinaire officiel.

Remarques :

.....

.....

Date d'apparition des signes cliniques de l'influenza aviaire/...../.....

Signes cliniques observés par l'éleveur :

.....

.....

.....

Nombre total d'oiseaux (morts ou vivants)	Nombre d'oiseaux malades (au moment de la mise en œuvre des mesures de restriction)	Nombre d'oiseaux morts (au moment de la mise en œuvre des mesures de restriction)	Nombre d'oiseaux éliminés

NB : cette information doit faire référence aux données recueillies au moment où la ferme a été mise sous restriction ; la mortalité et la morbidité étant uniquement liées à la suspicion d'influenza aviaire.

Programme de vaccination

Vaccination des oiseaux

 NON ☐ OUI ☐

Date de la vaccination	Type de vaccin ^a	Nom commercial	Voie d'administration

^aVivant ou inactivé

Personnel vaccinant :

 Membres de la famille ☐ Employés ☐ Personnel externe ☐ Autre ☐

Remarques

Administration de médicaments

 Durant les 15 derniers jours : NON ☐ OUI ☐ (spécifier)

1 ^{er} jour	Fin d'administration	Type de médicament	Nom commercial	Voie d'administration

Personnel ayant administré le médicament :

 Membres de la famille ☐ Employés ☐ Personnel externe ☐ Autre ☐

Remarques

Signes nerveux

Tremblements	<input type="checkbox"/>	Ataxie	<input type="checkbox"/>	Parésie	<input type="checkbox"/>
Mouvements circulaires	<input type="checkbox"/>	Cécité	<input type="checkbox"/>	Incoordination	<input type="checkbox"/>
Décubitus	<input type="checkbox"/>	Paralyse	<input type="checkbox"/>	Torticolis	<input type="checkbox"/>

Troubles locomoteurs

Ailes tombantes	<input type="checkbox"/>	Démarche normale	<input type="checkbox"/>
-----------------	--------------------------	------------------	--------------------------

Détails :

Troubles vasculaires/cutanés

Œdème	<input type="checkbox"/> (indiquer où)	Cyanose	<input type="checkbox"/>
Hémorragies	<input type="checkbox"/>	Pâleur	<input type="checkbox"/>

Autres :MALADIE SUSPECTÉE : ☐ Maladie de Newcastle ☐ Influenza aviaire**Formulaire d'observation macroscopique (à remplir pour chaque espèce atteinte)**Rhinite et sinusite ☐Trachéite *catarrhale* ☐*hémorragique* ☐Aéro-sacculite ☐Pneumonie ☐Entérite *catarrhale* ☐*hémorragique* ☐Pancréatite ☐Hémorragies *épicaide* ☐*endocarde* ☐*proventricule* ☐*follicules ovariens* ☐*rein* ☐*foie* ☐*proventricule* ☐*amygdale cæcale* ☐*Plaques de Peyer* ☐*muscles* ☐Nécrose *rein* ☐*foie* ☐*pancréas* ☐*rate* ☐État général *bon* ☐*en dessous de la moyenne* ☐*mauvais* ☐

Autre

Remarques

.....

.....

Signature

.....

Vérification :

- Registre des mortalités quotidiennes
- Registre des productions d'œufs
- Registre des consommations d'aliment pour animaux
- Données concernant le gain de poids moyen
- Informations concernant la consommation d'eau
- Enregistrement des déplacements à l'intérieur et à l'extérieur de l'élevage

William G. Dundon

Introduction

L'influenza aviaire (IA) est une maladie des oiseaux hautement contagieuse. Les virus de l'IA ne se transmettent pas facilement à l'homme, malgré leurs similarités avec les virus grippaux humains. Cependant, ils ont été transmis à l'homme de manière sporadique et dans des circonstances spécifiques :

- contact direct avec des oiseaux malades ou morts ;
- contact avec des surfaces contaminées par des substances excrétées (fèces) et/ou des sécrétions provenant d'oiseaux contaminés ;
- contact des muqueuses orale, oculaire ou nasale avec des aérosols contaminés ;
- consommation de viande crue ou de sang d'oiseaux contaminés.

Par conséquent, les problèmes de biosécurité du personnel en contact avec le virus relèvent de la plus haute importance. Le personnel courant un risque d'exposition au virus peut être classé en deux catégories. La première regroupe les personnes impliquées dans la maîtrise des foyers et l'éradication de l'IA et dont les tâches comprennent le tri des oiseaux contaminés, l'élimination des carcasses et le nettoyage et la désinfection des locaux. La deuxième catégorie inclut le personnel travaillant en laboratoire et impliqué dans la réception et le traitement de prélèvements et d'échantillons contaminés, contenant le virus. Les précautions recommandées pour la biosécurité des deux catégories sont énumérées ci-dessous.

Catégorie 1 : personnel sur le terrain

Recommandations

- Le nombre de personnes impliquées dans les opérations de dépeuplement/éradication doit être maintenu à un minimum.

- Plus un foyer d'IA est contrôlé de façon rapide et efficace dans un lot contaminé, plus le risque de propagation au personnel est faible.
- Il est indispensable que le personnel soit au courant et adopte les précautions de biosécurité permettant de réduire le risque d'une propagation plus importante du virus, de leur propre contamination et de celle des autres.
- Le personnel doit être informé du fait qu'il est interdit de fumer et de manger sur les lieux de travail et qu'il faut éviter de se toucher le nez, la bouche et les yeux lorsque les mains sont potentiellement contaminées.
- Après une opération de dépeuplement/éradication, tous les équipements de protection utilisés par le personnel doivent être convenablement éliminés ou correctement nettoyés et désinfectés.

Équipement de protection personnelle

Le personnel à risque d'infection ou se trouvant en contact direct avec des oiseaux potentiellement infectés, doit porter les équipements de protection personnelle suivants :

- blouses protectrices jetables à manches longues et tablier imperméable ;
- coiffes/charlottes jetables ;
- bottes en caoutchouc ou en polyuréthane lavables et désinfectables ou pédisacs jetables ;
- gants en caoutchouc lavables et désinfectables ; gants jetables en nitrile (latex synthétique). Des gants en coton peuvent être portés à l'intérieur pour éviter l'irritation des mains du fait de l'usage prolongé de gants synthétiques. Les gants doivent être immédiatement remplacés s'ils présentent des signes d'usure et de détérioration. Les gants doivent être enlevés avec précaution et sans toucher les surfaces contaminées ;

- un masque facial protecteur jetable FFP2D (ou un masque équivalent) s'ajustant correctement sur le visage ;
- une visière protégeant des éclaboussures provenant de matériel contaminé ;
- des lunettes de protection.

Après utilisation, il faut enlever l'équipement et se laver et se désinfecter les mains dans l'ordre suivant :

1. Gants
2. Bouses
3. Lavage et désinfection des mains
4. Lunettes de protection
5. Visière et masque facial
6. Lavage et désinfection des mains

Dans les étapes 3 et 6, le personnel doit se laver les mains avec du savon et de l'eau pendant au moins 15-20 secondes, après avoir enlevé les équipements de protection personnelle.

Considérations de santé

- Lorsque cela est possible, le personnel non vacciné doit être vacciné contre le virus de la grippe saisonnière en cours, afin de réduire la possibilité de double infection et de réassortiment entre les virus humain et aviaire.
- Pendant toute la durée du contact direct avec les volailles contaminées ou leurs sécrétions, le personnel doit recevoir quotidiennement un médicament antiviral approprié et pendant les 5-7 jours suivant le dernier jour d'exposition potentielle au virus.
- Le personnel doit être prévenu de surveiller sa santé et de signaler tout signe clinique incluant la fièvre, les difficultés respiratoires et/ou la conjonctivite, pendant 1 semaine suivant l'exposition potentielle au virus.

Catégorie 2 : personnel de laboratoire

- La sécurité du laboratoire est la responsabilité de tous les directeurs et employés de laboratoire. Les travailleurs individuels sont responsables de leur propre sécurité et de celle de leurs collègues.
- Les bonnes pratiques de laboratoire sont indispensables à la sécurité et dépendent du risque associé au matériel infectieux manipulé.

Les échantillons cliniques d'origine animale provenant de cas suspects d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) peuvent être testés par PCR sous

hotte de sécurité biologique de classe II, dans le respect des pratiques de biosécurité standard de niveau 2 (BSL-2). Des tests commerciaux de détection d'antigènes destinés à tester l'influenza peuvent également être réalisés sous niveau 2. Les échantillons peuvent également être emballés et expédiés aux laboratoires de diagnostic, en vue d'analyses plus approfondies dans des laboratoires BSL 2.

Les virus de l'IAHP doivent être manipulés en conditions de laboratoire sous un niveau de biosécurité 3+ (BSL3+). Les manipulations impliquant la croissance de l'agent pathogène doivent donc être effectuées en laboratoire BSL 3+ et dans le respect des pratiques opératoires BSL 3+. Celles-ci incluent une entrée par un SAS à double porte dont l'accès est contrôlé, un vestiaire et une douche, l'usage de respirateurs, la décontamination de tous les déchets et une douche prise par l'ensemble du personnel (voir ci-dessous).

NB : lorsque les laboratoires ne sont pas conformes aux conditions de confinement BSL 2, les échantillons provenant de cas suspects ou confirmés d'IAHP doivent être envoyés à des laboratoires de référence correctement équipés en vue d'analyses plus approfondies.

Une liste des directives devant être prises en considération dans les laboratoires BSL 2 et 3 est présentée ci-dessous. Ces directives sont adaptées à partir du *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 5^e édition, Fév 2007 (<http://www.cdc.gov/OD/ohs/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm>).

Directives concernant le travail en laboratoires de sécurité biologique de niveau 2

- Le niveau 2 de biosécurité se rapporte aux manipulations d'agents présentant un risque potentiel modéré pour le personnel et l'environnement.
- Le personnel de laboratoire doit avoir une formation spécifique pour la manipulation des agents pathogènes.
- L'accès au laboratoire doit être limité lorsque des manipulations y sont effectuées.
- Les objets tranchants contaminés doivent être manipulés avec une extrême précaution, y compris les aiguilles et les seringues, les lames, les pipettes, les tubes capillaires et les scalpels. La verrerie brisée ne doit pas être manipulée directement avec les mains, mais doit être éliminée mécaniquement à l'aide d'une brosse et d'une pelle à poussière, de pinces ou de forceps. Les récipients contenant des aiguilles contaminées, des équipe-

ments tranchants et de la verrerie brisée doivent être décontaminés avant d'être jetés.

- Les procédures au cours desquelles des aérosols ou éclaboussures infectieux risquent d'être générés, doivent être réalisées sous hotte de sécurité biologique et en minimisant leur formation.
- Le personnel doit se laver les mains après avoir manipulé du matériel viable, après avoir enlevé les gants et avant de quitter le laboratoire.
- Il est interdit de manger, de boire, de fumer, de manipuler des verres de contact et d'utiliser des produits cosmétiques sur les lieux de travail.
- Le pipetage à la bouche doit être particulièrement proscrit.
- Les surfaces de travail doivent être décontaminées après le travail et immédiatement après tout renversement ou éclaboussure de matériel viable. Des désinfectants efficaces doivent être utilisés contre les agents concernés.
- Toutes les cultures, les solutions mères et autres déchets règlementés doivent être décontaminés avant d'être éliminés par une méthode de décontamination autorisée, telle que l'autoclavage. Les matériels destinés à être décontaminés hors du laboratoire doivent être placés dans un récipient résistant et étanche, qui sera fermé pour transport hors du laboratoire.
- Un écriteau indiquant le risque biologique doit être affiché à l'entrée du laboratoire lorsque des agents étiologiques y sont utilisés. Les informations appropriées doivent inclure les agents utilisés, le niveau de biosécurité, les immunisations requises, le nom et le numéro de téléphone de l'enquêteur, tout équipement de protection personnelle devant être porté au laboratoire et toute procédure requise pour quitter le laboratoire.
- Un manuel de biosécurité spécifique au laboratoire doit être préparé par le directeur du laboratoire. Le personnel doit être informé des risques particuliers et doit lire et suivre les instructions concernant les pratiques et les procédures.
- Le directeur du laboratoire doit s'assurer que le personnel du laboratoire reçoive une formation appropriée concernant les risques potentiels associés au travail concerné ainsi que les précautions nécessaires à la prévention des expositions.
- Les cultures, les tissus, les échantillons de fluides corporels ou les déchets potentiellement infectieux doivent être placés dans un récipient doté d'un couvercle anti-fuites lors de la collecte, des manipulations, du traitement, du stockage, du transport et de l'expédition.
- Les équipements contaminés doivent être décontaminés en conséquence, avant d'être envoyés pour réparation ou maintenance ou avant d'être conditionnés pour le transport.
- Les renversements et accidents entraînant une exposition ouverte aux matériels infectieux doivent immédiatement être signalés au directeur du laboratoire. L'évaluation médicale, le suivi et le traitement sont fournis en cas de nécessité et consignés par écrit.
- L'utilisation de hottes de sécurité biologique de classe II correctement entretenues est préférable dans les cas suivants :
 - procédures comportant un risque de production d'aérosols infectieux ou d'éclaboussures, centrifugation, broyage, mixage, agitation ou mélange vigoureux, désintégration aux ultrasons, ouverture de récipients contenant du matériel infectieux et dont les pressions internes peuvent être différentes de la pression ambiante, et récolte de tissus contaminés, à partir de tissus animaux ou d'œufs de poule embryonnés ;
 - utilisation de concentrations élevées ou de volumes importants d'agents infectieux. De tels matériels peuvent être centrifugés au laboratoire s'il l'on utilise des têtes de rotor scellées ou des coupelles de sécurité pour centrifugeuse et à condition que ces têtes ou ces coupelles soient ouvertes uniquement sous hotte de sécurité biologique.
- Il est nécessaire d'utiliser des équipements de protection du visage (lunettes, masques, écran facial ou autre protection anti-éclaboussure) pour la manipulation d'agent infectieux en dehors de la hotte de sécurité biologique,
- Les blouses de laboratoires, les chasubles, les sarraus ou les uniformes conçus pour un usage en laboratoire, doivent être portés au sein du laboratoire. Ces vêtements de protection doivent être enlevés et laissés au laboratoire avant de se rendre dans des zones n'appartenant pas au laboratoire. Tous les vêtements de protection doivent être éliminés à l'intérieur du laboratoire, ou blanchis par l'institution.
- Il faut porter des gants s'il y a possibilité que les mains entrent en contact avec du matériel potentiellement infectieux et des surfaces ou des équipements contaminés. Il peut être nécessaire de porter deux paires de gants. Les gants doivent être jetés lorsqu'ils sont contaminés et enlevés après la manipulation de matériels infectieux ou si l'intégrité du gant est compromise. Les gants jetables ne doivent être ni lavés, ni réutilisés. Les

surfaces « propres » (claviers, téléphones) ne doivent pas être touchées par des mains gantées. Il est nécessaire de se laver les mains après avoir enlevé les gants.

Agencement d'un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2

- Pour le lavage des mains, chaque laboratoire doit être équipé d'un évier « mains libres » ou à fonctionnement automatique.
- Le laboratoire doit être conçu pour un nettoyage facile.
- Les paillasses doivent être imperméables à l'eau et résistantes à la fois à la chaleur modérée et aux solutions utilisées pour la décontamination des plans de travail et des équipements.
- Les espaces situés entre les paillasses, les hottes et les équipements doivent être accessibles au nettoyage. Les chaises et autres meubles du laboratoire doivent être couverts d'une matière autre que le tissu et qui puisse être facilement décontaminée.
- Les hottes de sécurité biologique doivent être installées de telle sorte que les fluctuations de l'alimentation en air de la pièce et celles de l'extracteur d'air n'entraînent pas un fonctionnement des hottes de sécurité biologique hors des paramètres de confinement. Les hottes de sécurité biologique doivent être situées loin des portes et des fenêtres, afin de maintenir les paramètres de flux d'air des hottes pour le confinement.
- La station de lavage des yeux doit être facile d'accès.
- L'éclairage doit convenir à toutes les activités et éviter les réflexions et les éblouissements qui pourraient gêner la vue.
- Si le laboratoire a des fenêtres s'ouvrant sur l'extérieur, celles-ci doivent être munies de moustiquaires.

Directives pour le travail en laboratoires de sécurité biologique de niveau 3

Le niveau 3 de sécurité biologique est applicable lorsqu'il y a manipulation d'agents pouvant provoquer une maladie grave ou potentiellement mortelle en cas d'exposition par inhalation. Le personnel de laboratoire doit avoir reçu une formation spécifique pour la manipulation des agents pathogènes et potentiellement mortels.

- Toutes les procédures impliquant la manipulation de matériels infectieux doivent être effectuées à l'intérieur de hottes de sécurité biologique ou par

du personnel portant des vêtements et des équipements de protection personnelle appropriés.

- L'air extrait du laboratoire doit être évacué vers l'extérieur à travers des filtres Haute efficacité pour les particules aériennes (HEPA).
- Un système de chauffage, ventilation et climatisation (CVC) maintenant une pression négative dans le laboratoire doit être présent. Des alarmes sonores doivent être installées afin d'avertir le personnel en cas de défaillance du système CVC ou d'écart par rapport aux paramètres d'origine.
- L'accès au laboratoire doit être limité lorsque des manipulations sont en cours.
- Le personnel doit se laver les mains après avoir manipulé du matériel infectieux, après avoir enlevé les gants et en quittant le laboratoire.
- Il est interdit de manger, de boire, de fumer, de manipuler des verres de contact et d'utiliser des produits cosmétiques dans le laboratoire. Les personnes portant des verres de contact au laboratoire doivent également porter des lunettes de protection ou un écran facial.
- Le pipetage à la bouche doit être strictement interdit.
- Les objets tranchants contaminés doivent être manipulés avec une extrême précaution, y compris les aiguilles et les seringues, les lames, les pipettes, les tubes capillaires et les scalpels. La verrerie brisée ne doit pas être manipulée directement avec les mains, mais doit être éliminée mécaniquement à l'aide d'une brosse et d'une pelle à poussière, de pinces ou de forceps. Les récipients contenant des aiguilles contaminées, des équipements tranchants et de la verrerie brisée doivent être décontaminés avant d'être jetés. Le matériel en plastique doit être remplacé, autant que possible, par du matériel en verre.
- Toutes les procédures doivent être effectuées avec soin afin de minimiser la production d'aérosols.
- Les plans de travail doivent être décontaminés immédiatement après tout renversement de matériel contaminé et à la fin de la journée de travail.
- Toutes les cultures, les solutions mères et autres déchets réglementés doivent être décontaminés avant d'être éliminés par une méthode de décontamination autorisée, telle que l'autoclavage. Les déchets infectieux provenant des laboratoires de sécurité biologique de niveau 3 doivent être décontaminés avant d'être enlevés et éliminés hors site.
- Lorsque du matériel infectieux ou des animaux contaminés sont présents dans le laboratoire, un panneau d'avertissement portant le symbole universel de risque biologique doit être installé

sur toutes les portes d'accès des laboratoires et des salles contenant des animaux. Le panneau d'avertissement contre le risque biologique doit comporter l'identification de l'agent pathogène, le nom et le numéro de téléphone du directeur du laboratoire ou des autres personnels responsables et indiquer toute exigence spécifique pour l'entrée dans ce laboratoire, notamment la nécessité d'immunisations, de respirateurs ou d'autres mesures de protection personnelle.

- Le directeur du laboratoire doit préparer un manuel de biosécurité spécifique au laboratoire. Le personnel doit être informé des risques particuliers et doit lire et suivre les instructions concernant les pratiques et les procédures.
- Le personnel du laboratoire et le personnel assistant doivent recevoir une formation appropriée sur les risques potentiels associés au travail concerné, ainsi que les précautions nécessaires pour prévenir les expositions.
- Le directeur du laboratoire doit s'assurer qu'avant de travailler avec des microorganismes à un niveau 3 de sécurité biologique, tout le personnel démontre une maîtrise des pratiques et techniques microbiologiques standard ainsi que des pratiques et fonctionnements propres au laboratoire lui-même.
- Toutes les manipulations ouvertes impliquant des matériels infectieux doivent être effectuées sous hotte de sécurité biologique. Le travail en récipients ouverts ne doit pas être effectué sur paillasse.
- Les équipements de laboratoire et les plans de travail doivent être régulièrement décontaminés à l'aide d'un désinfectant efficace après avoir travaillé avec du matériel infectieux et en particulier après des renversements, des éclaboussures et d'autres contaminations par des matériels infectieux.
- Les équipements contaminés doivent donc être décontaminés avant d'être enlevés de l'installation pour réparation, maintenance ou emballage en vue du transport.
- Les cultures, les tissus, les échantillons de fluides corporels ou les déchets doivent être placés dans un conteneur anti-fuites durant la collecte, le traitement, le stockage, le transport et l'expédition.
- Tous les déchets potentiellement contaminés (gants, blouses) provenant des laboratoires, doivent être décontaminés avant d'être jetés ou réutilisés.
- Les renversements et accidents entraînant une exposition ouverte ou potentielle aux matériels infectieux, doivent être immédiatement signalés au directeur du laboratoire. Une évaluation médicale, un suivi et un traitement appropriés doivent

être fournis et consignés par écrits.

- Le personnel doit porter des vêtements de protection lorsqu'il se trouve dans le laboratoire. Ces vêtements incluent les robes à face rigide ou kimono, les blouses stériles ou les sarraus. Les vêtements de protection ne doivent pas être portés en dehors du laboratoire. Les vêtements réutilisables doivent être décontaminés avant d'être blanchis.
- Les gants doivent être portés pour la manipulation de matériels infectieux, d'animaux contaminés et d'équipement contaminé. Il est recommandé de changer souvent de gants et de se laver les mains lors de ces changements. Les gants jetables ne doivent pas être réutilisés.
- Toutes les manipulations de matériels infectieux, les analyses *post-mortem* d'animaux contaminés, les récoltes de tissus ou de fluides à partir d'animaux contaminés ou d'œufs de poule embryonnés, etc. doivent être effectués sous hotte de sécurité biologique de classe II ou III.

Agencement d'un laboratoire de sécurité biologique niveau 3

- L'accès au laboratoire doit être restreint. L'entrée au laboratoire à partir des corridors d'accès doit se faire à travers un ensemble de deux portes rabattantes. Les portes doivent être verrouillables.
- Chaque pièce du laboratoire doit contenir un évier « mains libres » ou à fonctionnement automatique pour le lavage des mains. L'évier doit se situer à proximité de la porte de sortie.
- Dans les zones où sont manipulés des agents de sécurité biologique de niveau 3, les faces internes des murs, des sols et des plafonds doivent être conçues pour un nettoyage et une décontamination faciles. Les joints doivent être scellés. Les murs, les plafonds et les sols doivent être lisses, imperméables aux liquides et résistants aux produits chimiques et aux désinfectants utilisés normalement en laboratoire.
- Toutes les fenêtres du laboratoire doivent être fermées et scellées.
- Un mode de décontamination de tous les déchets de laboratoire doit être disponible dans l'installation et doit être utilisé de préférence au sein du laboratoire (notamment autoclave, désinfection chimique ou incinération).
- Un système produisant un flux d'air directionnel doit être utilisé. Un tel système attire de l'air dans le laboratoire, des zones « propres » vers les zones

« contaminées ». L'air extrait ne doit être circulé vers aucune autre zone du bâtiment. L'air extrait vers l'extérieur doit être dispersé loin des zones occupées et les admissions d'air doivent être filtrées à l'aide de filtres HEPA.

- Les centrifugeuses à flux continu ou les autres équipements susceptibles de produire des aérosols doivent être maintenus à l'intérieur de dispositifs qui extraient l'air à travers des filtres HEPA, avant de le laisser passer dans le laboratoire.
- Une station de lavage des yeux doit être aisément disponible à l'intérieur du laboratoire.
- L'éclairage doit convenir à toutes les activités et éviter les réflexions et les éblouissements qui pourraient gêner la vue.

Décontamination des plans de travail

- La concentration du désinfectant de laboratoire d'usage courant doit être de 1 g/L de chlore (0,1 %), par exemple de la javel domestique diluée au 1/50^e.
- La concentration d'un désinfectant de laboratoire plus puissant doit être de 5 g/L de chlore (0,5 %), par exemple de la javel domestique diluée au 1/10^e. Ce désinfectant doit être utilisé pour les éclaboussures comportant un risque biologique ou contenant de grandes quantités de matière organique.
- Les solutions de javel doivent être préparées sur place, avec un temps de contact d'au moins 10 min.

William G. Dundon

Solution de tampon phosphate (PBS)

Pour 1 litre

1. Mélanger:
 - 0,2 g KH_2PO_4
 - 2,9 g $Na_2HPO_4 + 2H_2O$:
 - 0,2 g KCl
 - 8 g $NaCl$
2. Ajuster le pH à 7,2-7,4 en utilisant du HCl.
3. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1 000 mL.
4. Autoclaver à 121 °C pendant 20 min.
5. La solution peut être conservée à + 4 °C pendant un maximum d'1 an.

Solution de tampon phosphate (PBS) + Albumine bovine (0,05 %)

1. Ajouter 0,25 g d'albumine bovine pour 500 mL de PBS.
2. La solution peut être conservée à +4 °C pendant un maximum d'une semaine.

PBS + Antibiotiques

Ajouter au PBS :

- 10 000 UI de pénicilline/mL
- 10 mg de streptomycine/mL
- 5 000 UI de nystatine/mL
- 250 µg de sulfate de gentamycine /mL

Réactifs destinés au test d'inhibition de la neuraminidase (IN)

Fétuine standard

Pour 1 litre

1. Ajouter de l'eau distillée à 48 g de fétuine, jusqu'à 1 000 mL.
2. Diluer cette solution au 1/2 dans du PBS (pH 5,9) contenant 6 mM de $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$, avant usage.

0,025 M de périodate de sodium dans 0,125 N d'acide sulfurique

Pour 500 mL

1. Ajouter 2,67 g de périodate de sodium à 500 mL d'une solution de H_2SO_4 à 0,125 N.
2. Bien mélanger.

2 % (w/v) d'arsenite de sodium dans du HCl à 0,5 N

Pour 100 mL

1. Ajouter 2 g d'arsenite de sodium ($NaAsO_2$) à 100 mL d'une solution de HCl 0,5 N.
2. Bien mélanger.

0,1M d'acide thiobarbiturique (ATB)

1 litre

1. Ajouter 7,2 g d'ATB à 400 mL d'eau distillée.
2. Ajuster à pH 9,0 en utilisant du NaOH.
3. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1 000 mL.

5 % (v/v) 10N de butanol HCl

1. Ajouter 5 mL d'acide hydrochlorique concentré à 100 mL de butane-1-ol.
2. Bienm élarger.

Solution d'ALSEVER

- 20,5 g glucose
- 8 g $C_6H_5Na_3O_7$ (citrate de sodium)
- 0,55 g $C_6H_8O_7$ (acide citrique)
- 4,2 g NaCl

1. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1 000 mL.
2. Stériliser à l'aide de filtres de 0,45 µm.
3. La solution peut être conservée à +4° pendant un maximum de 6 mois.

Gels d'agarose

Tampon pour gel TAE 10× (utiliser 1 ×)

1 litre

- 484 g base Trizma
- 11,4 mL d'acide acétique glacé
- 20 mL EDTA 0,5M (pH8)

1. Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 1 000 mL.
2. Autoclaver à 121 °C pendant 20 min.
3. La solution peut être conservée à 4 °C pendant un maximum d'1 an.

Tampon de charge TAE 10× (utiliser 1 ×)

10 mL de solution

- 1 mL TAE 10×
- 6 mL glycérol (100 %)
- 1 mL bleu de bromophénol et xylène cyanol (0,5 % p/v)

1. Mélanger les constituants et ajouter de l'eau distillée jusqu'à 10 mL.
2. Le tampon peut être conservé à + 4 °C pendant un maximum d'1 an.

Annexe

Directives pour l'expédition des échantillons de virus d'influenza aviaire et de la maladie de Newcastle aux laboratoires de référence de l'OIE

5

William G. Dundon

Une liste des dix laboratoires de référence de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle, ainsi que leurs coordonnées, sont fournies ci-dessous. Les échantillons diagnostiques (virus isolés, échantillons cliniques et écouvillons) peuvent être expédiés à n'importe lequel de ces laboratoires, dans le respect des directives énumérées ci-dessous.

NB : Les laboratoires de référence **doivent** être contactés avant l'expédition des échantillons, afin de fournir les documents nécessaires à l'importation et d'accélérer le processus de dédouanement.

Dr Ian Brown

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3NB
Royaume-Uni
Tel : (44.1932) 34.11.11 Fax : (44.1932) 34.70.46
Email : i.h.brown@vla.defra.gsi.gov.uk

Dr Ilaria Capua

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,
Laboratorio di Virologia
Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro, Padova
Italie
Tel : (39.049) 808.43.69 Fax : (39.049) 808.43.60
Email : icapua@izsvenezie.it

Dr Timm C. Harder

Federal Research Centre for Virus Diseases of Animals (BFAV), Institute of Diagnostic Virology Boddenblick 5a, 17493 Greifswald - Insel Riems, Allemagne
Tel : (49.383) 51.71.96 Fax : (49.383) 51.72.75
Email : timh.harder@fli.bund.de

Dr Hiroshi Kida

Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Department of Disease Control Kita-18, Nishi-9, Kita-ku, Sapporo 060-0818, Japon

Tel : (81.11) 706.52.07 Fax : (81.11) 706.52.73
Email : kida@vetmed.hokudai.ac.jp

Dr Janice Pedersen

National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
États-Unis d'Amérique
Tel : (1.515) 663.75.51 Fax : (1.515) 663.73.48
Email : brundaban.panigrahy@aphis.usda.gov

Dr John Pasick

Canadian Food Inspection Agency, National Centre for Foreign Animal Disease
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3M4
Canada
Tel : (1.204) 789.20.13 Fax : (1.204) 789.20.38
Email : jpasick@inspection.gc.ca

Dr Paul W. Selleck (to be replaced)

CSIRO, Australian Animal Health Laboratory (AAHL)
5 Portarlington Road, Private Bag 24, Geelong 3220, Victoria
Australie
Tel : (61.3) 52.27.50.00 Fax : (61.3) 52.27.55.55
Email : paul.selleck@csiro.au

Types d'échantillons

Les échantillons soumis aux laboratoires de référence de l'OIE peuvent être des isolats de virus ou des échantillons cliniques tels que les tissus, les écouvillons, le sérum ou le sang, recueillis à partir d'oiseaux contaminés ou suspectés d'être contaminés par le virus de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle.

L'emballage des échantillons et leur expédition par avion vers des laboratoires externes sont complexes

et sont soumis à des réglementations nationales et internationales.

Le transport aérien des échantillons contenant ou suspectés de contenir l'agent de l'influenza aviaire ou de la maladie de Newcastle, **doivent** se conformer aux directives de l'édition actuelle de la réglementation de l'IATA concernant les articles dangereux (*Directives pour l'expédition de substances infectieuses*, 2007).

Catégories d'expédition d'échantillons par avion

- La **catégorie A** fait référence aux substances infectieuses capables de causer des invalidités permanentes ou des maladies mortelles ou mettant en danger la vie de personnes ou d'animaux en bonne santé. Le virus de l'influenza hautement pathogène (IAHP) appartient à cette catégorie, s'il est expédié en tant que « cultures seules ». Les cultures d'IAHP (c'est-à-dire les isolats de virus) doivent donc être transportées sous la **catégorie A** et doivent comporter le numéro **UN 2814** (substance infectieuse affectant les humains et les animaux). Les « cultures seules » de paramyxovirus aviaire de type 1 (c'est-à-dire les virus vélogènes de la maladie de Newcastle) font également partie de la **catégorie A** et doivent comporter le numéro **UN 2900** (substance infectieuse affectant les humains et les animaux).
- La **catégorie B** fait référence à toute autre substance infectieuse ne faisant pas partie de la catégorie A. En ce qui concerne l'expédition des échantillons animaux dans lesquels la présence du virus IAHP est suspectée ou confirmée, le sang et les autres échantillons animaux (tissus, écouvillons, fèces) dans lesquels la présence du virus IAHP est connue ou suspectée peuvent être transportés en tant qu'« échantillons diagnostiques » (**UN 3373**) et sont inclus dans la catégorie B. De la même façon, les échantillons animaux dans lesquels la présence du virus de la maladie de Newcastle est suspectée ou confirmée, peuvent être transportés en tant qu'« échantillons diagnostiques » (**UN 3373**).

NB : Chaque compagnie aérienne peut avoir ses propres politiques, parfois plus strictes que celles publiées par l'IATA.

- **Exigences concernant l'emballage : Système d'emballage triple destiné à la catégorie A :** les substances infectieuses de catégorie A peuvent être transportées uniquement dans des emballages conformes aux spécifications 6.2 des Nations unies

et aux instructions P620 (PI602) ayant trait à l'emballage, tel qu'il est décrit ci-dessous. L'emballage doit être composé de :

1. Réceptacle primaire : *réceptacle étiqueté, primaire, étanche et anti-fuites, contenant l'échantillon. Ce réceptacle doit être enveloppé dans suffisamment de matériel absorbant permettant l'absorption de la totalité des liquides en cas de casse.*
2. Réceptacle secondaire : *second réceptacle, durable, étanche et anti-fuites, pouvant contenir et protéger le réceptacle primaire. Plusieurs réceptacles primaires emballés peuvent être placés dans un même réceptacle secondaire. Les réceptacles primaires multiples doivent être rembourrés à l'aide d'une quantité suffisante de matériel absorbant additionnel.*
3. Emballage externe rigide : *Le réceptacle secondaire est placé dans un emballage externe destiné à l'expédition. Au cours du transfert, cet emballage protège le réceptacle secondaire ainsi que son contenu, contre les intempéries telles que les dommages physiques ou causés par l'eau. Cet emballage doit porter l'étiquette de spécification des Nations unies **UN 2814** (pour l'influenza aviaire) ou **UN 2900** (pour le virus de la maladie de Newcastle).*

L'**étiquette** de l'emballage externe destiné à l'expédition de substances infectieuses **doit** inclure les éléments suivants :

- a. L'étiquette internationale de la substance infectieuse.
- b. L'étiquette de l'adresse comportant :
 - le nom, l'adresse et le numéro de téléphone du destinataire ;
 - le nom, l'adresse et le numéro de téléphone de l'expéditeur ;
 - l'appellation des Nations unies pour l'expédition (par exemple Substance infectieuse affectant les humains et/ou les animaux) suivie du nom scientifique (par exemple, virus de l'influenza aviaire, virus de la maladie de Newcastle) ;
 - le numéro des Nations unies (par exemple, UN2814 ou UN2900).

NB : Si l'emballage externe est placé dans un suremballage (c'est-à-dire un conteneur en polystyrène avec de la glace carbonique), les deux emballages doivent porter les informations citées et le suremballage doit porter une étiquette où figure la mention « *Les emballages internes sont conformes aux spécifications prescrites* ».

- **Documents nécessaires à l'expédition : Catégorie A**
- *Déclaration de l'expéditeur concernant les produits dangereux.*

- Une liste détaillée comportant l'adresse du destinataire, le nombre de paquets, les contenus détaillés, le poids et la valeur.
- Une facture de la compagnie d'aviation (si l'expédition se fait par avion).
- Un permis et/ou une déclaration d'importation et/ou d'exportation, si nécessaire.

NB : En ce qui concerne les permis d'importation, veuillez contacter le laboratoire de référence de l'OIE. Pour les permis d'exportation, veuillez suivre les directives de votre pays.

NB : Si l'emballage externe contient des réceptacles de plus de 50 mL, deux étiquettes d'orientation portant une flèche indiquant le « haut », doivent être placées sur des faces opposées de l'emballage.

NB : Les formulaires de données concernant les échantillons, les lettres et les autres types d'information permettant d'identifier ou de décrire l'échantillon et également d'identifier l'expéditeur et le destinataire, doivent être collés sur l'extérieur du second réceptacle.

NB : La quantité maximum nette de substances infectieuses que peut contenir un emballage est de 50 mL ou 50 g, si le transport se fait par avion de ligne, et de 4 L ou 4 kg s'il s'agit d'un avion cargo.

NB : Les transporteurs internationaux interdisent strictement le transport de substances infectieuses à bord et dans les bagages à main.

• Exigences concernant l'emballage : Catégorie B

– **Système d'emballage triple :** Les substances infectieuses de catégorie B peuvent être transportées uniquement dans des emballages conformes aux spécifications des Nations unies et aux instructions P650, tel qu'il est décrit ci-dessous. L'emballage doit être de bonne qualité et suffisamment résistant pour soutenir les chocs et les chargements faisant normalement partie du transport. L'emballage doit être construit et fermé de façon à prévenir toute perte de contenu pouvant être occasionnée par des vibrations ou des variations de température, d'humidité ou de pression, dans des conditions normales de transport.

1. Réceptacle primaire : Réceptacle étiqueté, primaire, étanche et anti-fuites, contenant l'échantillon. Ce réceptacle doit être enveloppé dans suffisamment de matériel absorbant pour l'absorption de la totalité des liquides en cas de casse.
2. Réceptacle secondaire : Second réceptacle durable, étanche et anti-fuites, pouvant contenir et protéger le(s) réceptacle(s) primaire(s). Plusieurs réceptacles primaires emballés peuvent

être placés dans un même réceptacle secondaire. Les réceptacles primaires multiples doivent être remboursés à l'aide d'une quantité suffisante de matériel absorbant additionnel.

3. Emballage externe rigide : Le réceptacle secondaire est placé dans un emballage externe destiné à l'expédition. Cet emballage le protège ainsi que son contenu, contre les intempéries telles que les dommages physiques ou causés par l'eau, au cours du transport. Cet emballage doit porter les spécifications d'emballage des Nations unies UN3373.

NB : Lors du transport aérien, aucun réceptacle ne doit dépasser 1 L. Le volume expédié ne doit également pas dépasser 4 L ou 4 kg.

• Documents nécessaires à l'expédition : Catégorie B

La déclaration de l'expéditeur concernant les produits dangereux n'est **pas** nécessaire pour les substances infectieuses de la catégorie B. Les documents suivants sont exigés :

- Une liste détaillée comportant l'adresse du destinataire, le nombre de paquets, les contenus détaillés, le poids et la valeur.
- Une facture de la compagnie d'aviation (si l'expédition se fait par avion).
- Un permis et/ou une déclaration d'importation et/ou d'exportation, si nécessaire.

NB : En ce qui concerne les permis d'importation, veuillez contacter le laboratoire de référence de l'OIE. Pour les permis d'exportation, veuillez suivre les directives de votre pays.

Références

Pour plus d'informations concernant l'expédition d'agents infectieux, veuillez consulter les sites suivants :

www.iata.org
www.who.int/csr/emc97_3.pdf
www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2007_2/en/index.html
http://www.unece.org/trans/danger/publi/unrec/rev14/14files_e.html

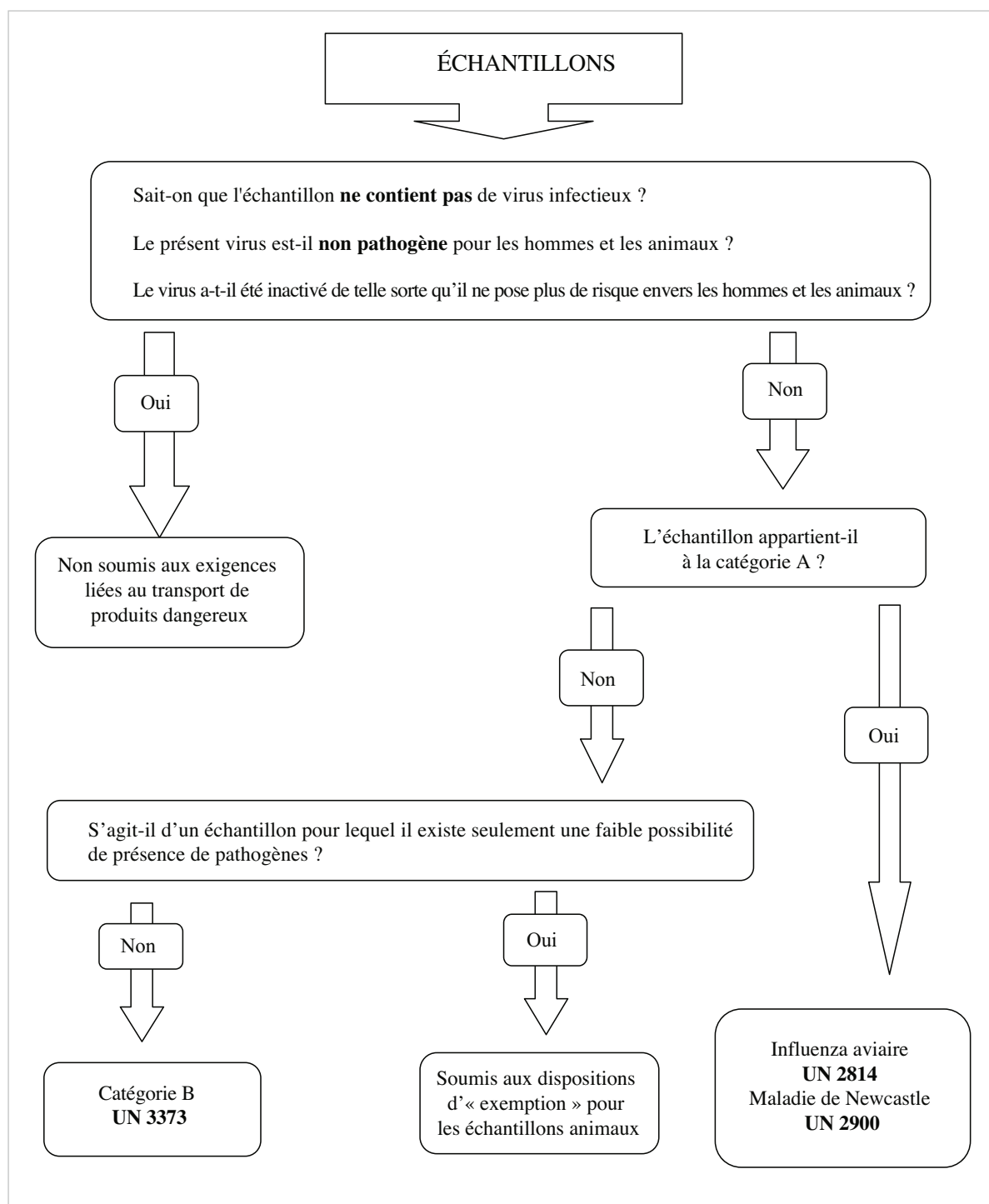
Diagramme de classification des échantillons d'influenza aviaire et de maladie de Newcastle

Tableau récapitulatif des directives

Type d'échantillon	Température d'expédition	Milieu antibiotique ^a	Code des Nations unies pour l'influenza aviaire	Code des Nations unies pour la maladie de Newcastle
Virus isolé	Glace carbonique	Non	Substance infectieuse UN 2814	Substance infectieuse UN 2900
Organe (grand) ^b	Glace carbonique	Non	Échantillon diagnostique UN 3373	Échantillon diagnostique UN 3373
Organe (petit) ^c	Glace carbonique	Oui	Échantillon diagnostique UN 3373	Échantillon diagnostique UN 3373
Fèces ^c	Glace carbonique	Oui	Échantillon diagnostique UN 3373	Échantillon diagnostique UN 3373
Écouvillonnage ^d	Glace carbonique	Oui	Échantillon diagnostique UN 3373	Échantillon diagnostique UN 3373
Sang/sérum	4° C	Non	Échantillon diagnostique UN 3373	Échantillon diagnostique UN 3373

^aMilieu antibiotique : 10 000 unités de pénicilline/mL, 10 mg de streptomycine/mL, 0,25 mg de gentamycine/mL, 5 000 unités de mycostatine/mL. Lorsque l'on prépare le milieu, il est impératif de vérifier le pH après l'ajout des antibiotiques et de le réajuster à pH 7,0-7,4 avant l'usage.

^bTrachée, poumons, duodénum, amygdales caecales, tissu cérébral, foie, rate et autres organes manifestement atteints provenant d'oiseaux morts récemment.

^cLes échantillons fécaux et les petits morceaux d'organes doivent être homogénéisés dans du milieu antibiotique afin d'obtenir une suspension de 10–20 % (p/v).

Les suspensions doivent être laissées à température ambiante pendant environ 2 h (ou à 4 °C pendant des périodes plus longues) puis clarifiées par centrifugation (par exemple 1 000 g pendant 10 min).

^dLes écouvillons doivent être placés dans suffisamment de solution antibiotique pour permettre leur immersion totale.

Index

A

Acide sialique 5
Amplicons 103, 110
Analyse enzymatique 133, 134
Analyse par restriction enzymatique 133, 134
Anticorps 2, 6, 14, 22, 33, 47, 87, 89, 91, 119, 130
APMV-1 21, 22, 24, 119, 122, 123, 130, 133-137
ARN
– concentration 95
– extraction 94, 100, 101, 133
– purification 95
Autruche 5, 10, 22, 27, 51, 57, 66, 92, 122, 128, 154

B

Barrière d'espèce 5
Biosécurité 41, 177 - 180, 187
Bursite infectieuse (maladie de Gumboro) 127
– laryngotrachéite 76

C

Caille japonaise 58, 69
Canard 2, 5, 9-12, 15 - 19, 22, 58, 69, 77, 122, 128, 154
Carcasse/ Cadavre d'oiseau 26, 40, 45, 50, 125, 140, 145-156
Cellule de numération 90
Cheval 7, 16
Chien 8
Choléra aviaire aigu 77
Classification de virus
– dissémination du virus (PVS) 39
– introduction de virus (PVI) 39
Clivage 2, 4, 17-19, 24, 28, 33, 110, 112
Code terrestre 34,
Compartiment 32, 34
Compostage 149 - 151, 154-157
Compostage par andain 149
Cormoran 23, 27, 29
Creuset 6

Culture cellulaire 129

Cygne 6, 11, 122

D

Décontamination/ Désinfection 139-145, 147, 149, 151-153, 155, 178-181
– formaldéhyde 153
Délai moyen de l'effet létale 130
Désinfection/ désinfectant 40, 41, 139-144, 161, 181
Destruction des animaux 153, 156
Détection et analyse d'amplicon 103, 110
Diagnostic différentiel 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73-76, 77, 119
Dinde 2, 5-10, 15-19, 23, 27, 29, 51-55, 57, 58, 69, 75, 77, 119, 120
Directive pour la visite de l'exploitation/ Directive pour la visite de l'élevage 74, 126
Distribution/ Distribuer/ Répartition/ Expédier 8, 26, 140, 143, 152, 178

E

Écouvillonnage trachéal et oropharyngé 48
Éducation 14
Électrophorèse en gel 93, 99, 100, 103, 107, 110, 112, 134
ELISA 87, 89
Enfouissement/ Ensevelissement 40, 146-148, 154, 156
Enquête épidémiologique 39
Entérite virale du canard (peste du canard) 77
Enzyme de type trypsine/ Enzyme semblable à la trypsin 4, 24
Épidémiologie 1, 6, 8, 14, 21, 22, 32, 38, 145
Équarrissage 40, 152, 157,
Équipement de protection individuelle 74
Éthanol 95, 106
Étiologie 1, 21
Évacuation de carcasse/ Élimination de carcasse 40, 145, 148

Examen clinique 38, 75

- signes cliniques 2, 5-7, 10, 14, 22, 32-34, 38, 39, 45, 51, 55, 57-62, 66, 67, 69, 75-76, 86, 119-123, 126, 127, 130, 131, 168-172

Examen post-mortem 41, 42-45, 46, 48, 74, 181

- symptômes 26

F

Félin 7

Formation de plaque 129, 130

Frottis cloacaux/ Écouvillonnage/ Écouvillon cloacaux 25, 45, 49, 79, 101

Frottis/ écouvillonnage/ écouvillon 25, 45, 48, 49, 75, 79, 94, 101, 109, 118, 143, 161, 185, 186, 189

Furine 4, 18

G

(GR) Globule rouge 82, 89, 90, 91

Gel d'agarose 103-113, 134-136

Gel de polyacrylamide - SDS (SDS- PAGE) 105, 108-113, 133, 135, 136

Gibier à plume/ Oiseau de gibier 92, 122

Globicéphale 7, 16

H

Hémagglutinine 4

Hôte 4, 5, 6, 12, 14, 15, 18, 22, 24, 32, 34, 75, 119, 124, 127, 139

I

Immuno-diffusion en gélose (IDG) 87

Inactivation de la RNase 95

Incinération 40, 148, 156, 181

Indice de pathogénicité intracérébrale 24, 131

Indice de pathogénicité par voie intraveineuse 33, 86

Influenza aviaire (IA)

- caractérisation 7, 15, 34, 82, 93
- de faible pathogénicité 8, 32, 47, 51, 52
- diagnostic conventionnel 79
- diagnostic moléculaire 22,
- directive pour l'expédition 185
- épidémiologie 1, 6, 8
- épizootie ou foyer 1-5, 7-11, 14, 37, 139, 145
- influenza aviaire faiblement pathogène 2-10, 33, 51-58, 75, 110, 112, 115, 117
- influenza aviaire H5 1-16, 33, 51, 93, 110, 115, 116
- influenza aviaire H7 1, 4, 6, 8, 33, 51, 85, 93, 112, 117
- influenza aviaire hautement pathogène 1-12, 33, 50, 51, 58-76, 81, 86, 93, 110, 112, 115-116, 178, 186
- diagnostic différentiel 51, 75, 76

- isolement 79

- isolement viral 79

protocole 79

test HA 82

- notification 10, 14, 31-33, 38

- pathologie 8, 51

- protocole

H5 110

H7 112

protocole IZSv 95

temps réel 116

- signe clinique 2, 5-8, 10, 14

- test sérologique 87

- virus 1, 5, 11, 13, 51, 79, 82, 84, 85, 89, 110, 112
- caractérisation 34, 82, 93, 129, 130
- type A 1, 84, 87, 93, 107, 114

- visite de l'exploitation 38, 51, 74

Influenza aviaire à déclaration obligatoire 32, 33

Introduction primaire/ Introduction initiale 8, 25

Isolement de virus/ Isolement viral 41, 45, 50, 79-81, 101, 129, 133, 143

Isolement du virus sur œuf de poule embryonné 129

L

Lésion macroscopique 53, 56-59, 65, 66, 69, 73, 75, 77

M

Maladie de Gumboro 77, 121, 127

Maladie de Newcastle

- anathomopathologique 119

- caractériser, caractérisation 24, 34, 129, 130

- caractéristique clinique 119

- diagnostic différentiel 119, 127

- diagnostic moléculaire 22, 133

- directive pour l'expédition 185

- écologie 21

- épidémiologie 21, 22, 32, 38, 145

- épizootie/ foyer 21-23, 26, 37, 139, 144

- évaluation virale de la pathogénicité 130

- formulaire d'enquête épidémiologique 39, 163

- méthode conventionnelle 129

- méthode conventionnelle 130

- méthode sérologique 129

- notification 31 - 33, 38,

- signes cliniques 22, 26, 32, 33, 38, 39, 119-127

- test sérologique 21, 130

- virus 26-28, 34, 127-131, 133, 135, 137, 138, 185-186, 189

- visite de l'exploitation/ la visite de l'élevage 38, 119, 126

Mammifère marin 7

Marché d'oiseau 9

Méthode spectrophotométrique/ spectrophomètre 84, 87, 90

Microhématocrite 90

Mustélidé 7

O

Œuf de poule embryonné/ Œuf embryonné 79, 81, 129, 179, 181

Oie 2, 5, 10, 11, 58, 69, 122, 154

Oiseau aquatique sauvage 51, 73

Oiseau de compagnie 23, 28, 33, 123, 128

Oiseau de volière 5, 11, 23, 154

Oiseau sauvage 4-8, 10, 16-18, 21-23, 25, 33, 34, 75, 87, 115, 117, 128, 166

Organisation mondiale de la santé animale (OIE) 10, 11, 24, 26, 31-34, 39, 79, 93, 115, 129, 159, 160, 185-187

Orthomyxoviridé 1

P

Pathogénicité/ Pathogène 2, 8, 24, 32, 33, 47, 51, 52, 76, 86, 123, 128, 130, 131

Pathotype 25, 76, 110, 112, 120, 121, 124, 126, 127

PCR après transcription inverse (RT - PCR)

– PCR après transcription inverse (RT - PCR) 22, 93, 98, 99, 107, 110-112, 114-117, 133-137

– protocole en point finale 107, 110, 112, 133, 135

– protocole one-step 110, 111, 135

Peste aviaire 1, 16, 18, 19

Phoque 7, 16, 17, 19

Pigeon 3, 22, 23, 27, 123, 127, 154

Pintade 3, 57, 67, 92, 124

Porc 6, 12, 16, 17, 19, 166

Potentiel de zoonose 31

Poulet 2, 4, 5, 7, 9, 14-29, 33, 34, 51, 55, 61, 62, 69, 75, 77, 86, 89, 92, 119, 120, 122, 123, 125-127, 130, 131

Précipitation à l'éthanol 95

Précipitation au chlorure de lithium 95

Prélèvement 45

Préparation de suspension de GR 89

Propagation/ répandre/ disséminer 1, 3, 6-11, 15, 22-32, 34-39, 62, 74, 99, 123, 139, 144-146, 151, 153, 168, 169, 177

Protéase 4, 24

Protocole d'ambion 95

Protocole IZSVe 95, 107, 115, 117, 133, 135

R

Réaction d'amplification en chaîne par polymérase

– composante 96

– limite 99

– organisation d'un laboratoire 117

– préparation du mélange 101

– réaction en chaîne 98

– temps réel 99

Réaction d'amplification en chaîne par polymérase 93, 97, 178

Réassortiment 6, 7, 12, 14, 18, 19, 178

Réservoir de gène 5, 17

Restriction 14

RT - PCR en point final 103, 107, 110, 112, 133, 135

RT - PCR en une étape 93, 107, 133-136

RT - PCR en deux étapes 93, 112

RT - PCR en temps réel 93, 99-103, 115, 116

S

Saccharide 5, 6, 12

Sang 45, 47, 72, 74, 76, 82, 84, 89, 94, 101, 177, 185, 186, 189

Sécurité/ Sans risque 75, 84, 140, 143, 145, 149, 153, 160, 178-180

Séquence du site de clivage 2

Sérologie 87

Spectre d'hôte/ Gamme d'hôte/ diversité des hôtes 5, 22, 32

Suspicion/ suspecté 22, 37-39, 77, 163, 172

T

Test d'hémagglutination sur microplaque (test de micro-neutralisation) 82

Test d'hémagglutination rapide 81, 129

– sérum de poulet 89-92

– test d'inhibition 22, 83

– test sur boîte de Pétri 82, 129

Test d'inhibition de la neuraminidase (IN) 1, 84, 85, 88, 183

Transmission 5-8, 17-19, 25, 32, 61, 144, 152

Type d'échantillon 185

U

Un site d'infection/ local contaminé 26, 38, 143, 167

Unité de désinfection 38

V

Vaccin 3, 10, 14, 33, 34, 51, 119, 128, 130, 131

Véhicule 10, 38, 39, 123, 139, 140, 144, 151, 153, 170, 171

Vétérinaire de laboratoire 161

Vétérinaire officiel (VO) 38, 161, 172

Virulence 2, 4, 17, 18, 21-25, 28, 29, 34, 77, 86, 93, 121, 126, 127, 130, 133

Virulence viral 24

Visite de l'exploitation/ visite de l'élevage 38, 51, 74, 119, 126

Vison 7, 15, 17

Volaille domestique/ oiseau de basse-cour 5, 9, 22, 74

Volaille/ avicole 1, 2, 4-12, 14, 15, 17, 18, 21-23, 25-28, 32, 33, 37, 39, 41, 47, 51, 58, 61, 74-77,

110, 115, 117, 119, 127-128, 131, 139, 143, 144, 146, 149, 151-157, 171, 178

– exploitation/ élevage 74, 127, 144, 155, 171

Z

Zoonose 26