

# Évolution de la détection de virus influenza aviaire dans des élevages de volailles infectées par un virus influenza aviaire hautement pathogène de sous-type H5N8

Axelle Scoizec (1), Rozenn Souillard (1), Patrick Daniel (2), Rodolphe Thomas (1), Sophie Le Bouquin (1)

Auteur correspondant: axelle.scoizec@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Épidémiologie et bien-être en aviculture et cuniculture, Ploufragan, France

(2) Laboratoire des Pyrénées et des Landes, Mont de Marsan, France

## Résumé

Les questions de la dissémination des virus et de leur persistance dans l'environnement ont été au cœur des préoccupations sanitaires au cours des dernières épizooties d'influenza aviaire en France. Au cours de l'épizootie de l'hiver 2016-2017, nous avons exploré la contamination de l'environnement des lots infectés (bâtiments et parcours) au travers du suivi de huit lots de canards infectés par un virus IAHP H5N8. Cette étude a montré un niveau important de contamination de l'environnement dans des foyers d'IAHP H5N8 au moment de l'excrétion virale par des canards infectés, à la fois dans les bâtiments et sur les parcours. Elle a également montré que malgré la baisse très nette de la fréquence de détection du génome viral suite à la mise en œuvre de mesures de nettoyage et de désinfection, et suite à des conditions climatiques défavorables au virus, la présence de génome viral pouvait perdurer jusqu'à trois à quatre semaines dans le bâtiment en cas de non nettoyage ou en cas de conditions climatiques favorables aux virus, et jusqu'à dix semaines sur les parcours sur des zones humides.

## Mots-clés

Influenza aviaire, IAHP, volailles, canard, environnement, H5N8

## Abstract

**Evolution of the detection of avian influenza virus in poultry farms infected with a highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8**

*Environmental virus dissemination and persistence were key issues for management and health considerations during the last two avian influenza epizooties in France. During winter 2016-2017 epizootic, we explored the contamination of infected flocks' environment (houses and open-air runs) by eight HPAI H5N8 infected duck flocks follow-up. This study highlighted in HPAI H5N8 infected farms, the important contamination of the flocks' environment at the moment of viral excretion by the infected ducks, in the houses as well as on the open-air runs. It showed also that despite the clear decrease of viral genome detection frequency after implementation of cleaning and disinfection measures, and after adverse climatic conditions for virus viability, the viral genome could still be present after depopulation up to three to four weeks in flock's premises in case of non-implementation of cleaning measures or in case of favorable climatic conditions for virus viability, and up to ten weeks on open-air ranges, in humid zones.*

## Keywords

*Avian influenza, HPAI, Poultry, Duck, Environment, H5N8*

L'assainissement des foyers d'influenza aviaire (IA), en particulier hautement pathogène (HP) est un point crucial dans la maîtrise d'une épizootie. Les caractéristiques de chaque virus influenza peuvent influencer le niveau de contamination initial de l'environnement des élevages (quantité excrétée, capacité de survie du virus, etc.). Dans le contexte de l'épizootie d'IAHP H5N8 apparenté à la lignée A/Gs/Gd/1/96 clade 2.3.4.4, cette étude avait pour objectif de décrire la contamination initiale de l'environnement dans les foyers (bâtiment et parcours) et suivre l'évolution des indicateurs d'une contamination initiale dans le temps. Cette étude a été conçue et réalisée dans le cadre d'investigations épidémiologiques menées en urgence lors de l'épizootie de l'hiver 2016-2017.

## Matériels et Méthodes

### Sélection des lots de volailles

L'étude a été réalisée de janvier à mars 2017. Le recrutement des foyers a été mené en collaboration avec les services des DDecPP des départements concernés et les prélèvements réalisés avec l'accord des éleveurs. Huit lots de canards, au sein de six élevages foyers (qui comportaient au total quinze lots, à raison de un à cinq lots par foyer),

situés dans les départements des Landes et du Gers ont été inclus dans l'étude. Au moment de la visite initiale, les animaux étaient présents et confinés dans le bâtiment d'élevage. Les lots présentaient tous des signes cliniques et de la mortalité. Les élevages avaient été officiellement confirmés infectés par un virus IAHP H5N8 et aucune mesure de nettoyage/désinfection n'avait encore été mise en œuvre depuis la détection de l'infection au moment de la première visite. Les caractéristiques des lots sont résumées dans le [tableau 1](#). Suite à la visite initiale, deux autres visites ont été réalisées, respectivement entre trois et quatre semaines, puis à dix semaines après dépopulation des lots. Lors de la visite initiale, les commémoratifs sur l'expression clinique et la mortalité par lot étaient collectés. Lors des visites suivantes, les commémoratifs depuis la visite précédente concernant les mesures de nettoyage/désinfection mises en œuvre ainsi que les conditions climatiques étaient relevés.

### Protocole et méthodes d'échantillonnage sur les animaux

Lorsque cela était possible, 30 animaux par lot étaient prélevés par prise de sang sur tube sec et par écouvillonnage trachéal et cloacal (écouvillons secs Copan, Italie). Lors de la visite initiale, la dépopulation du site était généralement en cours; pour ne pas perturber (retarder) ces opérations, il a été impossible faute de temps d'effectuer les

**Tableau 1. Caractéristiques des lots de volailles étudiés au moment de la visite initiale (réalisée entre le 3 et le 5 janvier 2017)**

Élevage	Départ.	Lot	Espèce/prod.	Bâtiment	Effectif initial du lot	Age des volailles <sup>A</sup> (j)	Délai (j) début de mortalité – visite initiale	Taux cumulé de mortalité <sup>A</sup> en %	Lot ayant été sorti sur parcours	Durée (j) du vide sur parcours <sup>A,E</sup>
A	40	A1	Canard/PAG <sup>B</sup>	Classique	1 350	27	1	0,4	Non	SO <sup>C</sup>
B	40	B1	Canard/PAG	Classique	4 080	48	8	20	Oui	7
C	32	C1	Canard/repro <sup>F</sup> . femelles	Classique	3 860	595	11	9	Non	SO
		C2	Canard/repro. femelles	Classique	2 650	545	11	13	Non	SO
D	40	D1	Canard/PAG	Tunnel <sup>G</sup>	4 000	52	1	7	Oui	7
E	40	E1	Canard/PAG	Tunnel	6 000	28	2	NR	Oui	1
		E2	Canard/PAG	Tunnel	6 000	84	10	NR	Oui	6
F	32	F1	Canard/PAG	Classique	6 300	92	6	30	Oui	7

<sup>A</sup> Au moment de la visite initiale<sup>B</sup> PAG: prêts à gaver<sup>C</sup> SO: sans objet<sup>D</sup> NR: non renseigné<sup>E</sup> Durée depuis que les animaux sont confinés et ne sont donc plus présents sur le parcours<sup>F</sup> Repro: reproducteurs<sup>G</sup> Tunnel ouvert sur les deux faces**Tableau 2. Points d'échantillonnage sur l'environnement des lots infectés**

Lieu	Point de prélèvement	Type de prélèvement	Description du prélèvement
Intérieur du bâtiment	Sol du sas	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble du sol du SAS
	Semelles des bottes dédiées au bâtiment	Une chiffonnette	Passage sur les semelles de toutes les bottes dédiées au bâtiment
	Surfaces touchées fréquemment par les personnes dans le sas: poignées de porte, interrupteurs, etc.	Une chiffonnette	Passage sur tous les points touchés fréquemment par les personnes
	Sol du bâtiment (à l'exception de la litière)	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble du sol du bâtiment (déambulation)
	Murs du bâtiment	Une chiffonnette	Passage sur les murs du bâtiment (entre 50 et 150 cm de hauteur par rapport au sol)
	Mécanisme de circulation d'air et points de sortie d'air	Une chiffonnette	Passage sur ventilateurs pour la circulation et pour l'extraction de l'air et sur les sorties d'air.
	Mangeoires (collecte des poussières)	Une chiffonnette	Passage sur 3 mangeoires réparties dans le bâtiment
	Abreuvoirs (collecte des poussières)	Une chiffonnette	Passage sur 3 abreuvoirs répartis sur l'ensemble du bâtiment
Parcours	Litière dans le bâtiment	5 écouvillons	Écouvillonnage en surface (zone de 3 cm de profondeur) sur les zones les plus humides
	Zones de sorties des animaux du bâtiment (à 1 m de distance maximale du bâtiment)	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble des zones ou sur 50 % des points de sortie (déambulation)
	Abreuvoirs situés sur le parcours	Une chiffonnette	Passage sur 3 abreuvoirs répartis sur le ou les parcours
	Mangeoires situées sur le parcours	Une chiffonnette	Passage sur 3 mangeoires réparties sur le ou les parcours
	Zones humides sur le parcours	Une paire de pédichiffonnettes	Passage sur l'ensemble de la zone
Autre	Zones avec présence de nombreuses déjections de volailles	5 écouvillons	Écouvillonnage des fientes les moins sèches possibles
	Fumière	100 cm <sup>3</sup> de fumier	Prélèvement en surface

prélèvements sur les animaux dans deux lots (B1 et E1) et ces prélèvements n'ont été possibles que sur vingt animaux dans deux autres lots (D1 et E2).

Les échantillons étaient transportés dans les 12 heures après prélèvement au laboratoire agréé le plus proche où, dans l'attente de leur analyse, ils étaient stockés entre 0 et +4°C pour les échantillons de sang et élués puis stockés à ≤ -65°C pour les écouvillons.

### Protocole et méthodes d'échantillonnage sur l'environnement

Des prélèvements environnementaux dans le bâtiment d'élevage et le cas échéant sur le parcours ayant été fréquenté, étaient réalisés par écouvillonnage (écouvillons secs Copan, Italie) ou à l'aide de chiffonnettes ou pédichiffonnettes stériles et sèches (Sodibox, France). Le détail du protocole standardisé d'échantillonnage est présenté dans le [tableau 2](#). Ces prélèvements ont été réalisés à chacune des trois visites.

Les échantillons étaient transportés dans les 12 heures après leur réalisation au laboratoire agréé le plus proche où, dans l'attente de leur analyse, ils étaient élués puis stockés à ≤ -65°C.

### Détection de la séroconversion des lots de volailles

La détection des anticorps dans les sérums de canards a été réalisée par la méthode officielle d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) en utilisant les antigènes de sous-type H5N3 et H5N8, ce dernier étant considéré comme représentatif des souches IA H5HP clade 2.3.4.4 qui ont circulé au cours de l'hiver 2016-2017 en Europe.

### Détection de l'ARN génomique de virus IA

Les échantillons ont été testés individuellement par RT-PCR temps réel (rRT-PCR) gène M-AIV selon la méthode officielle (Spackman et al., 2002). Les échantillons pour lesquels le gène M AIV a été détecté ont été testés par la suite en rRT-PCR gène H5. Nous nous référons dans la suite du texte aux échantillons avec détection de génome viral par rRT-PCR en tant qu'échantillons positifs en gène M ou en gène H5.

## Résultats

### Statut virologique et sérologique des lots de volailles étudiés

Les résultats des analyses réalisées sur les animaux montrent une séroconversion massive sur cinq des six lots dont le statut sérologique a été étudié. Pour ces cinq lots, la proportion d'animaux séropositifs vis-à-vis d'un antigène H5N8 (représentatif des souches IA H5HP clade 2.3.4.4 circulant en Europe en 2016-2017) variait de 90 à 100 % (Tableau 3). La séroconversion du lot peut être précoce par rapport à l'apparition de la mortalité dans celui-ci: un lot avec 100 % des animaux prélevés ayant séroconverti présentait de la mortalité depuis seulement une journée (lot D1).

Au sein des six lots dont le statut virologique a été étudié, la proportion par lot d'animaux positifs en rRT-PCR gène M variait de 35 à 100 % et celle en gène H5 de 30 à 100 % (Tableau 3). La proportion de prélèvements positifs par rRT-PCR gène M était de 38 % (61/160) et de 43 % (69/160) respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux. En rRT-PCR gène H5, elle était de 32 % (52/160) et de 40 % (64/160) respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux. Chacun des six lots présentait à la fois des résultats positifs en rRT-PCR gène M et gène H5 sur des écouvillons trachéaux et cloacaux. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les proportions d'écouvillons trachéaux et cloacaux positifs dans les six lots par rRT-PCR gène H5 et dans cinq lots sur six en rRT-PCR gène M. Les valeurs de Ct (cycle threshold) en gène M variaient entre 24,9 et 39,2, et entre 25,7 et 39,4 respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux. Quant aux valeurs de Ct en gène H5, elles variaient entre 21 et 39,3 et entre 22,7 et 38,2 respectivement pour les écouvillons trachéaux et cloacaux (Figure 1). La distribution des valeurs de Ct ne présentait pas de différence significative entre les écouvillons trachéaux et cloacaux, par rRT-PCR gène M. En RRT-PCR gène H5, la distribution des Ct est très large aussi bien pour les écouvillons trachéaux que cloacaux (Figure 1) mais la médiane des Ct est significativement plus faible dans les écouvillons trachéaux (test W de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ). Si la valeur du Ct par rRT-PCR ne permet pas d'évaluer la quantité d'ARN viral présente dans un échantillon, elle est tout de même corrélée à cette quantité: les échantillons avec les valeurs de Ct les plus faibles contenant très probablement des quantités d'ARN viral supérieures à celles des échantillons avec les valeurs de Ct les plus élevées. Les distributions de valeurs de Ct plutôt similaires entre les deux types d'écouvillons, ainsi que les proportions d'animaux excréteurs de même grandeur par voie trachéale et par voie cloacale suggèrent fortement que les quantités excrétées sont très probablement équivalentes par ces deux voies.

Ces six lots présentaient une mortalité depuis un à onze jours (Tableau 1). Dans les deux lots qui présentaient de la mortalité depuis une journée (lots A1 et D1), la proportion de canards avec une détection d'excrétion de virus influenza H5 était respectivement de

30 % (IC95 % [11-54]) et de 100 % (IC95 % [88-100]). Entre dix et onze jours après le début de l'épisode de mortalité lié à l'infection d'IAHP, la proportion d'animaux excréteurs dans les lots C1, C2 et E2 était respectivement de 57, 37 et 50 %. Pour les deux lots (B1 et E1) pour lesquels il n'y a pas eu de prélèvements sur les animaux au cours de cette étude, des signes cliniques ainsi que de la mortalité étaient toujours observés au jour de la visite initiale.

### Détection d'ARN génomique viral d'influenza aviaire dans l'environnement

#### Visite initiale

Lors de la visite initiale, le génome viral d'IA a été détecté par rRT-PCR gène M et gène H5 dans les bâtiments des huit lots étudiés (Tableau 4). Il a également été détecté sur respectivement cinq et quatre parcours par rRT-PCR gène M et gène H5 dans les six lots étudiés pour lesquels des prélèvements sur parcours ont été effectués. Dans les bâtiments, la proportion de prélèvements positifs par lot variait respectivement de 46 à 100 % et de 28 à 100 % par rRT-PCR gène M et gène H5. Dans quatre bâtiments classiques sur les cinq étudiés, la proportion de prélèvements positifs (en gène M) était supérieure à 75 % (46 % pour

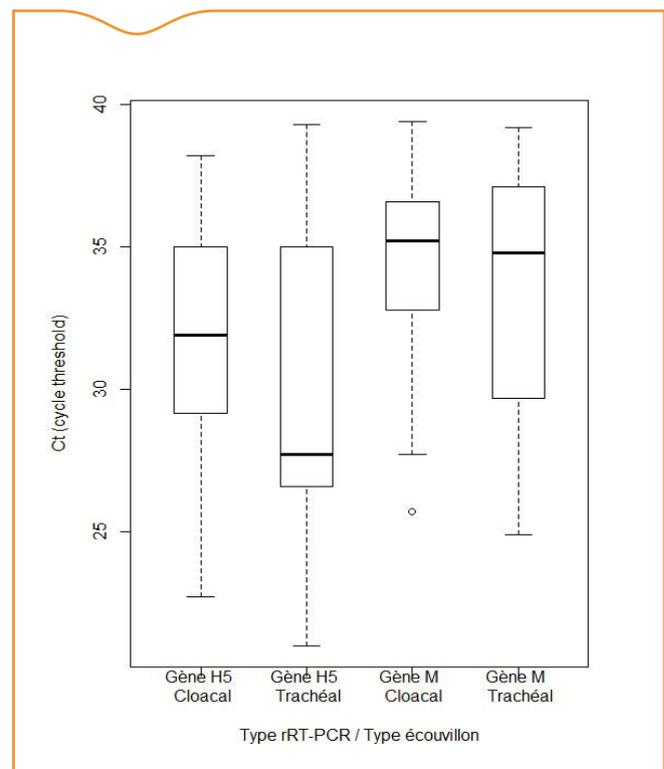


Figure 1. Distribution des Ct (cycle threshold) par type de rRT-PCR et type d'écouvillon des prélèvements positifs d'animaux de six lots infectés par un virus IAHP H5N8

Tableau 3. Résultats des analyses sérologiques et virologiques des volailles des lots étudiés

Élevage	Lot	Nb collectés	Sérologie IHA <sup>A</sup>		Virologie rRT-PCR	
			positifs <sup>A</sup> /analysables		Gène M positifs <sup>B</sup> /analysés	Gène H5 positifs/analysés
A	A1	30		0/30	30/30	30/30
B	B1		Prélèvements non réalisés			
C	C1	30		25/25	20/30	17/30
	C2	30		28/28	12/30	11/30
D	D1	20		16/16	7/20	6/20
E	E1		Prélèvements non réalisés			
	E2	20		16/16	13/20	10/20
F	F1	30		26/29	13/30	11/30

<sup>A</sup> Vis-à-vis de l'antigène H5N8 (tous les échantillons présentaient un résultat négatif vis-à-vis de l'antigène H5N3)

<sup>B</sup> Sont considérés comme positifs par rRT-PCR les oiseaux pour lesquels de l'ARN viral a été détecté sur écouvillon trachéal et/ou cloacal

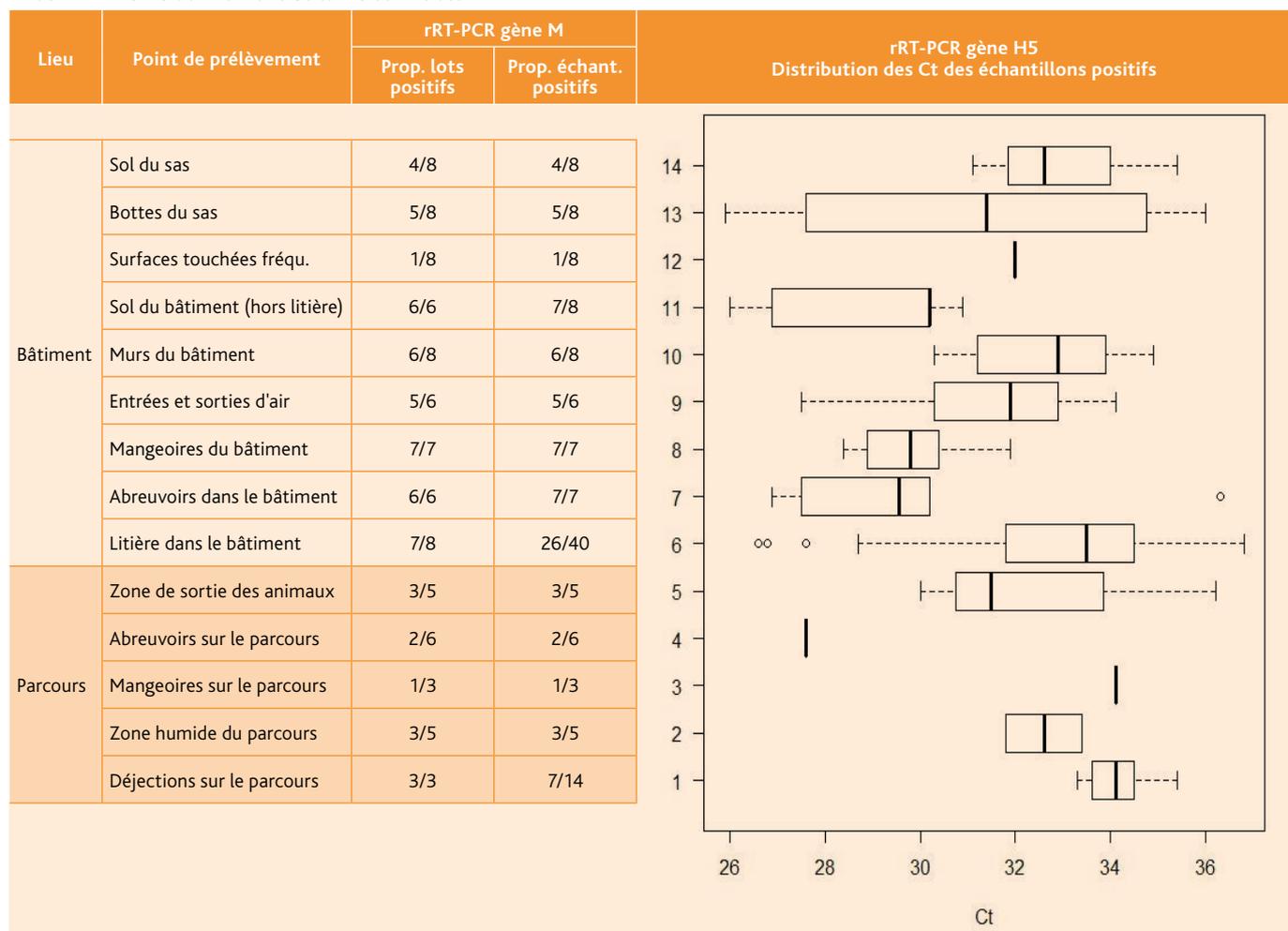
**Tableau 4.** Détection de génome viral d'influenza dans le bâtiment et sur le parcours de lots de canards infectés par un virus IAHP H5N8, avant destruction du lot infecté (visite 1), trois à quatre semaines (visite 2) et dix semaines (visite 3) après destruction du lot

Élevage	Lot	Nb de prélèvements positifs <sup>A</sup> par rRT-PCR gène M (par gène H5)/ Nb réalisés					
		Visite 1		Visite 2		Visite 3	
		Bâtiment	Parcours	Bâtiment	Parcours	Bâtiment	Parcours
A	A1	10(9)/13	1(0)/2	0(0)/8	NR <sup>C</sup>	0(0)/7	NR
B	B1	11(11)/11	4(3)/8	3(1)/5	0(0)/5	0(0)/5	1(0)/5
C	C1	11(11)/13	SO <sup>B</sup>	0(0)/11	0(0)/1	0(0)/9	SO
	C2	10(10)/13	SO	NR	SO	0(0)/7	SO
D	D1	6(6)/11	2(2)/4	0(0)/5	0(0)/4	0(0)/5	0(0)/4
E	E1	7(6)/12	5(4)/9	0(0)/6	0(0)/3	0(0)/6	0(0)/2
	E2	7(4)/14	4(4)/8	0(0)/6	0(0)/5	0(0)/5	0(0)/4
F	F1	6(6)/13	0(0)/2	1(0)/6	1(0)/3	0(0)/7	0(0)/3
<b>Total</b>		<b>68(63)/100</b>	<b>16(13)/33</b>	<b>4(1)/47</b>	<b>1(0)/21</b>	<b>0(0)/51</b>	<b>1(0)/18</b>

<sup>A</sup> Le prélèvement est considéré comme positif si un signal génomique est détecté par rRT-PCR

<sup>B</sup> SO: sans objet

<sup>C</sup> NR: non réalisé

**Tableau 5.** Détection de génome viral influenza aviaire par point de prélèvement dans les huit lots étudiés de canards infectés par un virus IAHP H5N8 au moment de la visite initiale


le cinquième). Dans les trois bâtiments « tunnel », cette proportion était comprise entre 50 et 58 %. La proportion de prélèvements positifs était élevée (supérieure à 75 %) à la fois sur un lot en début d'épisode de mortalité (A1) et sur des lots dont la durée de l'épisode de mortalité datait d'au moins huit jours (B1, C1, C2). Les niveaux de Ct en rRT-PCR gène H5 variaient entre 25,9 et 36,8 pour les échantillons prélevés dans les bâtiments et entre 27,6 et 36,2 pour ceux collectés sur le parcours (Tableau 5).

Dans les bâtiments, tous les types de support prélevés ont présenté au moins un résultat positif par rRT-PCR pour un des lots. Les types de support, qui présentaient à la fois une proportion de détection

élevée (supérieure à ou égale à 75 % des lots) ainsi que des valeurs de Ct comparativement plus faibles en rRT-PCR, étaient par ordre décroissant: les mangeoires et abreuvoirs, le sol et la litière, les murs ainsi que les entrées et sorties d'air (Tableau 5). Du génome viral a été détecté dans le sas du bâtiment pour plus de la moitié des lots étudiés.

Parmi les cinq lots dont les animaux sont sortis sur parcours avant leur claustration, quatre présentaient au moins deux résultats positifs à la recherche de génome viral H5 sur le parcours (Tableau 4). Les points de prélèvements sur parcours qui présentaient une fréquence de détection plus élevée en proportion de lots ou de prélèvements positifs étaient les déjections sur parcours, la zone de sortie des

**Tableau 6.** Mesures de nettoyage/désinfection mises en œuvre entre les visites, conditions climatiques dans les 7 jours précédents (J-7/J0) et au moment de la réalisation des prélèvements (J0)

Élevage	Lot	Visite1		Mesures <sup>A</sup>		Visite2		Mesures		Visite3	
		Conditions climatiques		(période visite1-visite2)		Conditions climatiques		(période visite2-visite3)		Conditions climatiques	
		J-7/J0	J0	Bâtiment	Parcours	J-7/J0	J0	Bâtiment	Parcours	J-7/J0	J0
A	A1	Humide-froid	Brouillard-froid	N/D1	N/D1	Ensoleillé-froid	Sec-chaud	D2	-	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
B	B1	Humide-froid	Brouillard-froid	N	-	Humide-froid	Ensoleillé-froid	D1/D2	N/D1	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
C	C1	Humide-froid	Sec-froid	N	SO <sup>B</sup>	Ensoleillé-froid	Orage	D1/D2	SO	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
	C2	Humide-froid		N	SO			D1/D2	SO		
D	D1	Humide-froid	Sec-froid	N/Dsol1	N/D1	Ensoleillé-froid	Sec-chaud	D1/D2	-	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
E	E1	Humide-froid	Brouillard-froid	-	D1	Ensoleillé-froid	Sec-chaud	-	-	Sec-chaud	Ensoleillé-froid
	E2			n/D1	D1/R			-	-		
F	F1	Humide-froid	Couvert-froid	N/D1/D2	N/D1/R	Humide-froid	Ensoleillé-froid	-	S	Sec-chaud	Ensoleillé-froid

<sup>A</sup> N=nettoyage avec détergent, n=nettoyage sans détergent, D1=première désinfection, D2=seconde désinfection, Dsol1=première désinfection réalisée seulement sur le sol du bâtiment, R=retournement du sol sur le parcours, S=semis après retournement.

<sup>B</sup> SO: sans objet

bâtiments des animaux ainsi que les zones humides du parcours (Tableau 5). La proportion de prélèvements positifs (gène M et gène H5) était équivalente (Tableau 4) entre le lot E1 dont le début de la mortalité datait de deux jours et la claustration (vide du parcours) d'un jour, le lot D1 dont le début de la mortalité datait d'un jour et la claustration de sept jours, et les lots B1 et E2 dont la mortalité datait de huit à dix jours et la claustration de sept jours. Concernant, le lot F1 pour lequel le génome viral n'a pas été détecté sur parcours, la mortalité datait de six jours et la claustration de sept jours. Pour le lot D1, dont les animaux confinés depuis une semaine en tunnel ouvert en façade présentaient de la mortalité depuis un jour au moment de la réalisation des prélèvements, le génome viral a été détecté (gène M et gène H5) en zone de sortie du bâtiment et sur les zones humides du parcours. Concernant le lot A1, des prélèvements ont été réalisés sur le parcours qui n'avait jamais été utilisé par les animaux (confinés depuis leur arrivée car au stade de démarrage): sur abreuvoirs et sur la zone bétonnée de sortie de bâtiment. Du génome viral d'IA a été détecté par rRT-PCR gène M sur les abreuvoirs situés à 30 m du bâtiment.

### Deuxième visite

Lors de la seconde visite (trois à quatre semaines après la destruction du lot infecté), aucun génome viral n'a été détecté dans cinq des sept lots suivis à ce stade (Tableau 4). Les mesures appliquées avant cette seconde visite étaient variables d'un lot à l'autre. Pour les lots sans détection de génome viral, pour le bâtiment, la gamme des mesures appliquées allait d'aucune mesure jusqu'au nettoyage humide avec ou sans détergent et avec ou sans première désinfection et, sur les parcours, d'une désinfection par épandage de chaux avec ou sans nettoyage des abords du bâtiment et avec ou sans retournement du sol (Tableau 6). Pour le lot B1, un nettoyage humide avec détergent était en cours dans le bâtiment au moment de la seconde visite: l'ARN de virus IA a été détecté (gène M) dans les prélèvements réalisés sur les surfaces non nettoyées au moment du prélèvement (sol du sas également positif par rRT-PCR gène H5, surfaces touchées fréquemment dans le sas et murs du bâtiment). Pour le lot F1, un nettoyage humide avec détergent suivi de deux désinfections avaient été réalisés dans le bâtiment par l'éleveur, les abords du bâtiment avaient été nettoyés et désinfectés et le parcours retourné sur 10 cm de profondeur. De l'ARN de virus IA a été détecté par rRT-PCR sur les murs à l'intérieur et sur les abords extérieurs du bâtiment. Ces deux lots dans lesquels une détection d'ARN viral a été possible lors de la seconde visite n'avaient pas depuis la destruction du lot infecté été soumis à des températures extérieures supérieures à 13°C et le nombre de jours avec des températures maximales pouvant dépasser les 10°C

avaient été de six sur vingt, le temps avait été globalement humide (13 jours sur 20 avec pluie ou brouillard givrant, contre pour les cinq autres lots des températures maximales de 18°C, un nombre de jours avec des températures maximales dépassant les 10°C de 12 à 13 sur une durée de 26 à 29 jours, et une exposition à un temps sec de deux à trois jours consécutifs de temps avant la deuxième visite.

### Troisième visite

Lors de la troisième visite (dix semaines après la destruction du lot infecté), aucune détection d'ARN viral n'a été mise en évidence dans les prélèvements réalisés dans sept des huit lots étudiés (Tableau 4). Le seul prélèvement avec une détection d'ARN de virus IA par rRT-PCR gène M concernait le lot B1 et concernait des zones humides du parcours. Les mesures qui avaient été appliquées sur le parcours au moment de cette troisième visite étaient le nettoyage des abords du bâtiment, et l'épandage de chaux sur les abords et l'ensemble du parcours à raison de 100 g/m<sup>2</sup>. Lors de la première visite, des cadavres de canards en décomposition avaient été signalés sur les zones du parcours à proximité des abreuvoirs, qui étaient des zones très boueuses avec des flaques d'eau et une absence de végétation. Au moment de la troisième visite, des zones humides et non encore enherbées persistaient sur le parcours. Les conditions climatiques au moment de la troisième visite et la semaine précédant celle-ci étaient équivalentes pour les huit lots (Tableau 6).

### Mesures d'assainissement des bâtiments et parcours

Les mesures de nettoyage/désinfection mises en œuvre dans les lots suivis lors de la durée de l'étude étaient variées (Tableau 6), des mesures complémentaires ont pu être réalisées après la fin de l'étude. Dans les bâtiments, un nettoyage humide avec détergent suivi de deux désinfections a été réalisé dans six lots sur huit, un nettoyage sans détergent suivi d'une seule désinfection pour un lot et aucune mesure pour le dernier lot. Le circuit d'eau a été désinfecté spécifiquement pour quatre lots. Le matériel mobile a été nettoyé et désinfecté sans (n=2) ou après démontage (n=4) pour six lots sur huit. Les abords du bâtiment ont été nettoyés par pulvérisation d'eau à haute pression pour quatre lots sur huit. Pour les huit lots, de la chaux vive a été épandue manuellement (n=3) ou mécaniquement (n=5) sur les abords du bâtiment à la dose de 50 à 3000 g/m<sup>2</sup> selon les lots (dose inférieure à 500 g/m<sup>2</sup> pour 5 lots). Pour les six lots avec parcours, de la chaux vive a été épandue mécaniquement sur l'ensemble du parcours sans distinction de zonage à une dose uniforme variant de 50 à 100 g/m<sup>2</sup> selon les lots. Après l'application de chaux vive, sur les abords ou sur le parcours, aucun arrosage n'a été réalisé dans les huit lots. Il avait

plu pour les huit lots entre l'application de la chaux et la réalisation de la troisième visite. Dans deux lots sur les six avec parcours, un retournement du sol a été réalisé sur le parcours, sur respectivement 10 et 40 cm de profondeur.

## Discussion

Au vu des résultats obtenus lorsque les prélèvements sur les animaux ont été possibles dans le contexte de l'intervention, l'échantillonnage de 20 ou 30 animaux par lot permettait à la fois la détection de l'excrétion virale au niveau lot, la détection d'une séroconversion et d'estimer la prévalence de l'excrétion ou de la séroconversion intra-lot avec une précision inférieure ou égale à +/-20 %. Le protocole d'échantillonnage sur l'environnement était standardisé et reproductible d'un lot à l'autre.

Cette étude a montré un niveau important de contamination de l'environnement dans des foyers d'IAHP H5N8 au moment de la phase d'excrétion virale par les canards infectés, à la fois dans les bâtiments et sur les parcours. La fréquence de détection de génome viral d'influenza aviaire et les valeurs de Ct des analyses positives par rRT-PCR indiquent en effet que du matériel viral s'était déposé et était présent en quantité détectable dans les bâtiments et sur la plupart des parcours. La présence de génome viral ne signifie pas que le virus est viable. Des essais d'isolement sur les échantillons stockés pourraient permettre par la suite d'éclaircir ce point.

Un des facteurs influençant la contamination du milieu est l'excrétion virale par les oiseaux infectés : celle-ci peut être décrite qualitativement (voie respiratoire et/ou digestive) et quantitativement (durée d'excrétion et quantités excrétées). Cette étude a montré que sur six lots infectés présentant des signes cliniques, l'excrétion se faisait aussi bien par voie respiratoire que par voie digestive, et que la durée d'excrétion pour un lot de canards infectés pouvait atteindre au moins onze jours. Les données obtenues à partir de cette étude permettent de constater que la proportion d'animaux excréteurs était importante (supérieure à 30 %) dans les lots avec expression clinique. Par contre, les données ne permettent pas d'évaluer directement les quantités excrétées individuellement par les animaux. Néanmoins, l'hypothèse d'une excrétion virale individuelle quantitativement importante en moyenne est soutenue par les valeurs de Ct observées et mériterait d'être investiguée par des études complémentaires permettant une approche quantitative.

Les environnements les plus contaminés (en termes de proportion d'échantillons positifs) ont été détectés dans les bâtiments classiques. Cela pourrait être dû à une meilleure survie du virus dans les conditions plus stables qu'offrent un bâtiment classique par rapport à un tunnel ouvert soumis directement aux conditions climatiques extérieures. Cela pourrait également être lié à une plus grande dispersion des matières contaminées (aérosols, poussières issues de fientes, plumes etc.) vers l'extérieur dans le cas des tunnels, diminuant ainsi la charge virale dans le bâtiment en comparaison de la situation en bâtiment classique. Toutefois d'autres facteurs pourraient intervenir tels que les quantités virales excrétées par les lots qui dépendent du nombre d'oiseaux excréteurs et de leur densité.

Les facteurs climatiques tels que la température et l'hygrométrie, ainsi que l'exposition aux rayons ultraviolets, influencent la survie du virus influenza et sa détection dans le milieu extérieur (Stallknecht et al. 2009). Ces facteurs semblent avoir joué un rôle très important dans le maintien ou non de la détection du virus dans l'environnement. En effet, la baisse très nette de détection de l'ARN viral dans l'environnement (bâtiment et parcours) des lots, trois à quatre semaines après leur destruction, peut très probablement être reliée à la fois aux mesures de nettoyage et désinfection mises en œuvre, et aux conditions climatiques, en plus de l'effet du temps écoulé. On constate ainsi qu'avec ou sans mesures de nettoyage et de désinfection, aucune détection d'ARN viral n'a été réalisée à ce stade lorsque l'environnement avait été soumis plusieurs jours consécutifs à des températures supérieures

à 15°C, par temps sec et ensoleillé. Par contre, dans un lot ayant appliqué les mesures complètes de nettoyage et de désinfection, mais n'ayant pas été soumis à des températures supérieures à 13°C, ni à un temps sec, de l'ARN viral IA était encore détecté. Le rôle des conditions climatiques est probablement plus important pour ce qui concerne l'assainissement des parcours en comparaison de celui des bâtiments. Néanmoins, un défaut dans la gestion des parcours en vue de leur assainissement contribue très probablement au maintien du virus malgré des conditions climatiques défavorables à celui-ci, ainsi que semble l'indiquer la détection de génome viral sur des zones encore humides d'un parcours dix semaines après la destruction du lot infecté. Les mesures pour l'assainissement des parcours préconisées prévoient le drainage de toutes les zones humides (avis de l'Anses 2016-SA-0196).

La probabilité de détection du virus lorsqu'il y a une baisse de la charge virale environnementale diminue et si l'absence de détection signale une forte baisse de la charge virale, elle ne peut pas garantir l'absence du virus. Ainsi du génome viral a été détecté lors de la troisième visite sur un parcours alors qu'à la deuxième visite cela n'avait pas été le cas. Une amélioration du protocole d'échantillonnage, comme par exemple une augmentation de la répétition des échantillons, devrait permettre de mieux détecter la présence résiduelle de virus.

Deux cas de détection de génome viral sur parcours soulèvent des questions. Le premier concerne la détection de génome viral d'IA sur des abreuvoirs situés sur le parcours d'un lot n'étant jamais sorti sur parcours et présentant des signes cliniques depuis une journée lors des prélèvements. Le second concerne la détection de génome viral sur un parcours d'un lot de canards claustrés depuis sept jours et présentant des signes cliniques depuis une journée lors des prélèvements. Les contaminations ainsi détectées pourraient être le résultat d'une diffusion aéroportée via l'air expulsé du bâtiment, d'un transport via des véhicules passifs tels que les insectes ou de la microfaune sauvage, ou d'une contamination à partir d'une autre source telle que l'avifaune commensale infectée. Dans le cadre du second cas, l'hypothèse d'une excrétion précoce du virus par rapport à l'apparition de signes cliniques à l'échelle du lot doit également être envisagée.

Dans les lots étudiés, les mesures d'assainissement mises en œuvre sur les parcours étaient très variables et parfois éloignées des recommandations de l'avis de l'Anses 2016-SA-0196 relatif aux « procédés efficaces de désinfection des parcours en exploitations de volailles ». Cet avis, malgré ses limites liées au manque d'études sur le sujet, constitue la seule base de recommandations pertinentes en la matière disponible actuellement en France. Dans cet avis, il est recommandé dans le cas d'un foyer d'IA confirmé, concernant l'utilisation de chaux vive, d'épandre celle-ci uniformément à raison de 500 g/m<sup>2</sup> sur les zones à forte densité d'oiseaux seulement, d'arroser le sol immédiatement après épandage si celui-ci n'est pas humide, de laisser agir trois à quatre heures puis de retourner le sol. Le reste du parcours doit être fauché, débroussaillé et retourné si possible. Un vide sanitaire de six semaines doit ensuite être respecté. Le guide pratique de l'utilisation de la chaux pour la prévention et le contrôle de l'IA et autres maladies réalisé par l'association européenne de la chaux (European Lime association, 2009) recommande également pour le traitement du sol l'application de chaux vive en granulés à raison de 500 g/m<sup>2</sup> suivi d'un arrosage. Pour rappel, l'arrosage de la chaux vive permet de provoquer son extinction, ce qui entraîne une montée en température de la chaux et permet aussi par le mouillage une meilleure action sur le Ph du sol superficiel (augmentation du Ph). Lors de cette étude, il s'est avéré que l'épandage de chaux quand il a été réalisé n'avait pas été cantonné aux zones du parcours de forte fréquentation et que les doses employées étaient très en dessous des préconisations dans la plupart des cas (pour cinq lots sur huit les doses utilisées étaient inférieures ou égales à 100 g/m<sup>2</sup> quelle que soit la zone d'application). Aucun arrosage après épandage n'a été réalisé et peu de retournements effectués. L'information et la formation des acteurs en charge de diffuser ces recommandations ou de les appliquer semble un point crucial afin que les interventions des éleveurs soient réalisées de la façon la plus

efficace possible d'après les connaissances actuelles. À noter toutefois que l'ensemble de ces foyers ont fait l'objet de contrôles renforcés par les DDecPP pour s'assurer de la bonne mise en œuvre des opérations de nettoyage/désinfection de l'ensemble des installations et parcours (des recontrôles étant parfois réalisés en cas de non-conformités), associés à un dépistage des animaux lors de leur première remise en place.

## Conclusion

Notre étude a montré un niveau important de contamination de l'environnement dans des foyers d'IAHP H5N8 au moment de l'excrétion virale par des canards infectés, à la fois dans les bâtiments et sur les parcours. Elle a également montré que malgré la baisse très nette de la fréquence de détection du génome viral suite à la mise en œuvre de mesures de nettoyage et de désinfection, et suite à des conditions climatiques défavorables au virus, la présence de génome viral pouvait perdurer jusqu'à trois à quatre semaines dans le bâtiment en cas de non nettoyage ou en cas de conditions climatiques favorables au virus, et jusqu'à dix semaines sur le parcours sur des zones humides.

## Remerciements

Aux éleveurs ayant accepté de participer à cette étude, aux DDecPP des Landes et du Gers pour leur appui, et aux techniciens du Laboratoire des Pyrénées et des Landes pour la réalisation des analyses et leur disponibilité.

## Références bibliographiques

European Lime association, 2009. Guide pratique d'utilisation de la chaux pour la prévention et le contrôle de la grippe aviaire et autres maladies, 3<sup>e</sup> édition, janvier 2009.

[http://www.eula.eu/sites/default/files/2009%2010%2026%20Influenza\\_fr\\_web\\_01.pdf](http://www.eula.eu/sites/default/files/2009%2010%2026%20Influenza_fr_web_01.pdf)

Stallknecht DE, Brown JD. Tenacity of avian *influenza* viruses. Rev Sci Tech. 2009; 28(1):59–67.

Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L. 2002. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A *Influenza* Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. Clin. Microbiol. 40, 3256–3260.