

GESTION DES LISIERS DE PALMPIEDES CONTAMINES PAR LES VIRUS INFLUENZA AVIAIRES H5 HP : RECENSEMENT DES PRATIQUES ET EVALUATION EXPERIMENTALE DE LA SURVIE DU VIRUS

A. Schmitz¹, N. Rousset², S. Le Bouquin³, K. Ogor¹, M.-O. Le Bras¹, C. Martenot¹, M. Pertusa⁴, P. Daniel⁵, C. Guillou-Cloarec¹, A. Le Prioux¹, C. Allée¹, C. Guillemoto¹, E. Niqueux¹, F.-X. Briand¹, H. Morin⁶, A. Richard⁷ et N. Eterradosi¹

¹ANSES, Unité VIPAC – rue des Fusillés – 22440 PLOUFRAGAN,

²ITAVI- Antenne Ouest, 41 rue de Beaucemaine, 22440 PLOUFRAGAN

³ANSES, Unité EBEAC – BP 53 – 22440 PLOUFRAGAN

⁴ITAVI – antenne de Mont-de-Marsan – 55 av de Cronstadt – 40000 MONT DE MARSAN

⁵LPL 40 – 1 rue Marcel David – 40000 MONT DE MARSAN

⁶GRIMAUD FRERES SELECTION – La Corbière – 49450 ROUSSAY

⁷ITAVI – Direction, 7 rue Faubourg Poissonnière – 75009 PARIS

audrey.schmitz@anses.fr

RÉSUMÉ

L'Influenza Aviaire (IA) est une maladie à déclaration obligatoire affectant les oiseaux domestiques et sauvages. Au cours de l'hiver 2015-2016, un épisode d'IA hautement pathogène (HP) impliquant des virus de sous-types H5N1, H5N2 et H5N9 a sévi dans le Sud-Ouest de la France. La diversité des virus détectés suggère une large circulation de virus IA H5 au sein des productions de palmipèdes qui ont été particulièrement touchées. Dans un contexte de mise en place de mesures sanitaires et de biosécurité, la gestion des effluents (fumiers et lisiers) constitue un facteur important à prendre en compte.

L'étude présentée a visé à estimer la persistance d'un virus IA H5N9 HP dans les lisiers de canards reproducteurs et de canards gavés i) en conditions naturelles par le suivi d'élevages contaminés sur le terrain et ii) en conditions expérimentales au laboratoire. Aucun virus infectieux n'a été ré-isolé à partir des lisiers naturellement contaminés, et les résultats expérimentaux obtenus suggèrent une survie du virus H5N9 HP infectieux inférieure à 5 semaines dans deux lisiers de canards reproducteurs barbarie ou pékin. Des études complémentaires sont en cours pour compléter ces résultats en étudiant d'autres lisiers issus de chacune de ces productions.

En complément, un état des lieux des pratiques concernant la gestion du lisier en élevage de canard gras a été réalisé. Des investigations complémentaires conduites dans quelques foyers ont permis de préciser si des mesures spécifiques avaient été mises en œuvre.

ABSTRACT

Management of palmiped slurry contaminated with avian influenza viruses H5HP: survey of practices and experimental evaluation of virus survival

Avian influenza (AI) is an acute and notifiable disease of poultry and wild birds. During the 2015-2016 winter season, several cases of infection by highly pathogenic avian influenza viruses belonging to the H5N1, H5N2 and H5N9 subtypes were detected in South-Western France. The diversity of the detected viruses suggested their wide circulation among duck and geese farms that proved especially affected. In order to improve the sanitary and biosecurity status in the farms, it is important to take into account how (liquid and solid) manure will be disposed of. The present study was designed to evaluate the survival time of H5 highly pathogenic viruses in liquid manure from duck breeders and ducks raised for "foie-gras" production flocks. This was achieved i) by regularly sampling manure tanks in naturally contaminated farms, and ii) in laboratory settings by artificially contaminating some liquid manure samples with known amounts of a highly pathogenic H5N9 virus and following the evolution of virus infectivity during storage. No virus has been isolated from slurry naturally contaminated. The experimental results suggest a survival of the H5N9 HPAi virus shorter than 5 weeks in liquid manure from Muscovy or Pekin breeder ducks. These results are currently being confirmed on additional liquid manure sample.

In addition, an inventory of practices concerning slurry management in ducks raised for "foie-gras" was performed and was also an opportunity to list if specific measures had been implemented.

INTRODUCTION

L'Influenza Aviaire (IA) est une maladie à déclaration obligatoire (Anonymous, 2005 ; OIE, 2005) affectant les oiseaux domestiques et sauvages. De novembre 2015 à août 2016, un épisode d'IA hautement pathogène (HP) impliquant différents virus de sous-types H5 a été détecté dans le Sud-Ouest de la France (Briand et al., 2016). La diversité de ces virus suggère une large circulation de virus IA H5 au sein des productions de palmipèdes qui ont été particulièrement touchées. En plus des études épidémiologiques réalisées, des mesures sanitaires et de biosécurité couplées à une surveillance accrue des cheptels ont été mises en place pour stopper la circulation virale. Dans ce contexte, la gestion des effluents (fumiers et lisiers) constituait un facteur important à prendre en compte pour préciser les possibilités de dissémination de virus infectieux.

L'étude présentée vise à estimer la persistance sous forme infectieuse d'un virus IA H5 HP dans les lisiers de canards reproducteurs et de canards gavés i) en conditions naturelles par le suivi d'élevages contaminés sur le terrain et ii) en conditions expérimentales au laboratoire.

En complément, un état des lieux des pratiques concernant la gestion du lisier en élevage de canard gras a été réalisé. Des investigations complémentaires conduites dans quelques foyers ont permis de préciser si des mesures spécifiques avaient été mises en œuvre.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Lisiers naturellement contaminés

Six lisiers provenant d'élevages de canards reproducteurs pékin (n=2) ou de canards en gavage (n=4), dans lesquels un virus H5HP avait été préalablement détecté, ont été prélevés. Ces lisiers n'ont pas été traités en vue d'un assainissement avant leur échantillonnage/prélèvement.

Parmi ces six élevages, deux ont fait l'objet de prélèvements dans un court délai après la détection du virus dans l'élevage (< 10 jours), et quatre ont fait l'objet de prélèvements plus tardifs après la détection (jusqu'à 3 mois). Cependant, aucune donnée ne permet de déterminer le délai entre la date d'infection du troupeau et la date de détection du virus sur les animaux.

Deux litres de chaque lisier ont été prélevés (idéalement 1 litre en surface de la fosse et 1 litre en profondeur) avant d'être transmis au laboratoire de criblage (LPL 40) qui a homogénéisé les prélèvements et échantillonné 4 tubes de 10 ml. Pour chaque lisier, une recherche génomique du virus influenza a alors été réalisée par le laboratoire de criblage. En cas de résultat positif, les prélèvements étaient transférés après surgélation au Laboratoire National de Référence (LNR), qui mettait alors en œuvre une recherche de virus infectieux par ovoculture.

1.2. Lisiers expérimentalement contaminés

L'étude de vieillissement artificiel a été réalisée à partir de lisiers confirmés comme étant i) négatifs vis-à-vis de l'IA (absence de détection de génome IA) et ii) non toxiques pour l'œuf embryonné inoculé par voie intra-allantoïdienne (système de ré-isollement des virus influenza aviaires mis en œuvre).

Du fait des différents modes d'élevages pratiqués en France, l'étude a porté sur trois types d'élevages de canards : canards reproducteurs pékin, canards reproducteurs barbarie et canards en gavage.

Les lisiers ont été artificiellement contaminés avec le virus H5N9HP A/duck/France/150236b/2015, à une concentration finale de 10^5 à $10^{5,88}$ $\text{DIE}_{50}/\text{ml}$, selon le lot viral utilisé. Ce seuil de contamination a été retenu car il permettait d'obtenir des niveaux de contaminations (valeurs de Ct des lisiers contaminés) comparables avec ceux observés dans les élevages naturellement contaminés. Le lisier ainsi contaminé a ensuite été divisé en 3 parties : une partie du lisier a été conservée sans traitement, une 2ème et une 3ème partie ont été traitées par ajout de lait de chaux à 45 % massique jusqu'à l'obtention respectivement d'un pH 10 et d'un pH12. Le traitement au lait de chaux réalisé en laboratoire avait pour objectif de mimer celui effectué en élevage, lors du traitement d'assainissement des lisiers par chaulage.

Parallèlement, des témoins négatifs ont été préparés à partir de lisiers non infectés artificiellement, traités ou non traités au lait de chaux, afin de vérifier l'innocuité de la matrice sur les méthodes analytiques mises en œuvre. En outre, des contrôles en tampon phosphate (avec et sans virus) ont été réalisés pour suivre la survie du virus dans une matrice simple (tableau 1).

L'étude de vieillissement a été menée à +4°C; température positive la plus favorable à la survie du virus. Chaque semaine, un prélèvement de lisier pour chacune des conditions a été réalisé, afin de déterminer la présence ou non de virus infectieux (figure 1). Les prélèvements n'ont pas été soumis à une étape de neutralisation de pH avant analyse, car des essais préliminaires ont montré que ces pH élevés n'avaient aucune incidence sur la réalisation des analyses.

Le vieillissement des lisiers contaminés a été arrêté dès lors que l'absence de virus infectieux a pu être démontrée dans deux prélèvements hebdomadaires consécutifs.

1.3. Méthodes analytiques

- Analyses physico-chimiques :

Les caractéristiques et compositions des lisiers utilisés pour les tests de contamination expérimentale ont été évaluées par un laboratoire agréé utilisant les méthodes usuelles : pH, conductivité, densité, matière sèche, matière organique, carbone organique, azote total, nitrate, nitrite, calcium, potassium, sodium, phosphore et soufre.

- Isolement par ovoculture

Chaque prélèvement de lisier a fait l'objet d'une recherche de virus infectieux par ovoculture selon la

méthode officielle en vigueur (Afnor, 2016 ; Anonymous, 2006) ; cette recherche était immédiate après prélèvement concernant les lisiers expérimentalement contaminés et différée, après surgélation et transport, concernant les lisiers naturellement contaminés. Après centrifugation des prélèvements de lisier, les surnageants récoltés ont été préincubés avec un mélange d'antibiotiques puis ont été inoculés à des œufs embryonnés de 9 jours provenant de poules EOPS (Exemptes d'Organismes Pathogènes Spécifiés). Après 5 à 6 jours d'incubation ou lors de la mortalité des œufs, les liquides allantoïdiens ont été récoltés et leur activité hémagglutinante a été testée. Un second passage sur œufs a été réalisé en cas de résultats négatifs. Toutes les manipulations de virus vivants ont été réalisées dans un laboratoire de niveau BSL3.

- Recherche de génome IA par rRT PCR :

La recherche de génome IA a été réalisée sur les ARN extraits des prélèvements hebdomadaires de lisier ainsi que sur les liquides allantoïdiens récoltés à l'issue de l'ovoculture. Les ARN viraux ont été extraits selon le protocole décrit dans le kit RNEasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf Cedex, France), puis ont été testés en RT-PCR temps réel gène M-AIV selon la méthode officielle en vigueur (Spackman et al., 2002). La détection de génome viral par rRT PCR ne permet pas d'apporter d'information sur le caractère infectieux du virus détecté. Toutefois, cette analyse est complémentaire à l'ovoculture de fait de sa plus grande sensibilité de détection. En effet, la mise en évidence d'une augmentation des quantités de génome détectées entre le prélèvement initial de lisier et la récolte finale de liquide allantoïdien pourra indiquer une répllication virale et être corrélée aux résultats obtenus en ovoculture (mise en évidence d'une activité hémagglutinante). Dans le cas de résultats contradictoires entre le résultat de l'ovoculture et détection de génome viral par rRT PCR, des analyses complémentaires sont réalisées, tel qu'un essai supplémentaire d'isolement viral.

1.5. Etat des lieux des pratiques

Un questionnaire a été publié en juillet 2016. Une part a été diffusée sous format papier lors des formations biosécurité organisées par les chambres d'agriculture, à destination des producteurs en circuit court. Une autre part a été transmise en ligne via le logiciel LimeSurvey, diffusée par le Cifog, aux différentes organisations de producteurs de la zone Sud-Ouest. Certains foyers ont, quant à eux, été interrogés par téléphone. Le questionnaire était constitué de deux parties, l'une portant sur la description des pratiques habituelles de gestion du lisier et l'autre sur les mesures spécifiques mises en place suite à la déclaration d'un foyer.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Lisiers naturellement contaminés

Aucun virus influenza n'a été ré-isolé par la méthode d'ovoculture sur œufs embryonnés à partir des lisiers testés. Cependant, une interférence entre la conservation par surgélation à -65°C des matrices contaminées et les possibilités de ré-isolement viral est actuellement suspectée, sans que cette hypothèse soit pour le moment confirmée (mise en évidence de génome viral dans le prélèvement de lisier ; absence d'isolement de virus par ovoculture et absence de mise en évidence de génome viral sur liquide allantoïdien récolté à l'issue de l'ovoculture).

2.3. Lisier expérimentalement contaminé

Bien que les caractéristiques physico-chimiques des lisiers diffèrent selon le type d'élevage, l'espèce et la période de production, la composition des différents lisiers utilisés dans cette étude sont cohérentes avec celles décrites dans la littérature (Itavi, 2013 ; Pingel et al. 2012) (tableau 2).

A ce jour, deux vieillissements artificiels ont été réalisés, sur des lisiers provenant d'exploitations de canards reproducteurs barbarie et pékin, et un vieillissement sur un lisier provenant de canards en gavage est en cours. Les résultats des lisiers contaminés sont présentés dans le tableau 3. Les résultats obtenus pour les lisiers "contrôles" non contaminés, traités par chaulage ou non traité, ont tous été négatifs tout au long de l'étude et ne sont donc pas mentionnés dans le tableau 3. Les résultats obtenus par rRT-PCR gène M-AIV étant cohérents avec ceux obtenus par ovoculture, ceux-ci ne sont également pas présentés dans le tableau 2

- Lisier de canards reproducteurs barbarie :

- Les prélèvements effectués le jour du dopage permettent de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité ainsi que dans le lisier traité à pH10. Le virus n'a pas été ré-isolé après traitement à pH12.

- Les prélèvements effectués après 1 semaine, ainsi qu'après 2 et 3 semaines de vieillissement (+4°C) permettent de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité, contrairement aux lisiers dopés traités à pH10 et à pH12.

- Les prélèvements effectués à partir de 4 semaines de vieillissement (+4°C), soit 28 jours post-dopage, ne permettent pas de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité.

- Lisier de canards reproducteurs pékin :

- Les prélèvements effectués le jour du dopage permettent de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité ainsi que dans les lisiers traités à pH10 ou à pH12.

- Les prélèvements effectués après 1 semaine de vieillissement n'ont pas été analysés ; en effet, ces prélèvements ont été conservés par surgélation avant que ne soit suspectée une possible interférence entre la surgélation et la détection de virus par ovoculture.

- Les prélèvements effectués après 2 semaines, ainsi qu'après 3 et 4 semaines de vieillissement (+4°C) permettent de ré-isoler le virus dans le lisier

dopé non traité, alors que le virus n'a pas été ré-isolé dans le lisier dopé et traité à pH10 ou à pH12.

○ Les prélèvements effectués après 5 semaines de vieillissement (+4°C), soit 35 jours post-dopage, ne permettent pas de ré-isoler le virus dans le lisier dopé non traité.

2.4. Etat des lieux des pratiques

86 éleveurs ont répondu, parmi lesquels une majorité d'éleveurs gavageurs stricts (73%). Les deux tiers étaient situés dans les Landes. Parmi ces élevages, 16 d'entre eux étaient des anciens foyers identifiés au cours de l'épisode d'influenza aviaire de l'hiver 2015-2016.

Les fosses en béton constituent l'équipement majoritaire (65%) par rapport aux fosses géomembrane. Les fosses ne sont couvertes que dans 45% des élevages enquêtés. Dans 80% des élevages, un raclage en continu sous caillebotis est réalisé. Le lisier est principalement stocké sans traitement particulier à moins de 50 mètres des bâtiments d'élevage. Le recours à un traitement complémentaire est pratiqué par 18% des éleveurs, par méthanisation ou encore chaulage du lisier. La fosse est vidée une à deux fois par an (87% des élevages). La vidange de la fosse se limite dans la majorité des cas à la partie liquide, et dans un tiers des cas, les éleveurs pratiquent un nettoyage de ses abords par chaulage et/ou désinfection à l'aide d'un produit virucide. Quatre-vingt-quinze pour cent des éleveurs épandent eux même leur lisier. Dans la majorité des cas il est épandu sur des terres situées à plus de 500 mètres de l'élevage et enfoui directement à l'aide d'injecteurs à disque ou à dents.

La durée moyenne de stockage du lisier pour les élevages foyers a été de 128 jours pour les éleveurs qui n'ont pas traité leurs lisiers (13 éleveurs) et de 107 jours pour les 3 éleveurs ayant réalisé un chaulage (respectivement 40, 100 et 180 jours). Tous les foyers ont respecté la durée minimale d'assainissement de 60 jours à l'exception d'un éleveur qui a chaulé son lisier (40 jours de stockage). Seuls 3 éleveurs ont pratiqué le chaulage et 5 ont nettoyé et désinfecté les abords de leur fosse. Tous les éleveurs ayant été foyers ont enfoui leurs lisiers et ont nettoyé et désinfecté leur maté-

riel d'épandage. Parmi les changements de pratiques observés, 3 éleveurs ont couvert leur fosse, 2 ont chaulé leur lisier, 2 l'ont enfoui, 3 ont raclé les parois de leur fosse et nettoyé ses abords lors de sa vidange, alors qu'ils ne le faisaient pas auparavant. Les difficultés de mise en œuvre des opérations de décontamination des fosses, jugées parfois contraignantes et peu sécurisées, ont été évoquées par les éleveurs. Le recours à la chaux vive, souvent déconseillé pour les fosses géomembrane, a été limité.

CONCLUSION

La possible interférence entre la conservation par surgélation des matrices contaminées et les possibilités de ré-isollement viral doit être confirmée. Dans l'attente, toute analyse réalisée sur une matrice lisier est dorénavant traitée de manière immédiate, en limitant la seule conservation à +4°C sur une durée la plus courte possible.

Les analyses réalisées sur les échantillons ayant été surgelés, provenant d'élevages dans lesquels un virus H5HP avait été préalablement détecté, ne peuvent donc être considérées comme concluantes quant à la persistance du virus H5HP dans les lisiers.

Les résultats obtenus au cours de cette étude de vieillissement artificiel de lisier expérimentalement contaminé sont similaires pour les deux types de production canards reproducteurs barbarie et pékin, suggérant une durée de survie du virus infectieux inférieure à 5 semaines, en l'absence de tout traitement, cohérents avec la durée de stockage de 60 jours préconisée par la réglementation, en cas d'assainissement naturel. Toutefois, ces résultats sont en cours de confirmation, par la réalisation d'essais complémentaires sur des lisier de canards reproducteurs barbarie et pékin ainsi que deux essais sur des lisiers de canards en gavage.

L'enquête réalisée permet de confirmer le suivi des réglementations en termes de gestion et d'assainissement du lisier. Toutefois, la diversité de pratiques mise en évidence montre la nécessité d'élaboration de préconisations pratiques et claires, notamment en cas de foyer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afnor, 2016. In : NF U47-210 Méthodes d'analyse en santé animale - Isolement des myxovirus aviaires hémagglutinants par ovoculture et recherche de leur activité hémagglutinante
- Anonymous, 2005. In : Directive 2005/94/CE du Conseil du 20 décembre 2005 concernant des mesures communautaires de lutte contre l'influenza aviaire et abrogeant la directive 92/40/CEE.
- Anonymous, 2006. In : Décision de la Commission 2006/437/CE du 4 août 2006 portant approbation d'un manuel de diagnostic pour l'influenza aviaire conformément à la directive 2005/94/CR du Conseil. J. OFF. Union Eur. L237, 1-27
- Briand FX., Schmitz A., Ogor K., Le Prioux A., Guillou-Cloarec C., Guillemoto C., Allée C., Le Bras M.O., Hirchaud E., Touzain F., Quenault H., Huneau A., Lebouquin-Leneveu S., Cherbonnel-Pansart M., Lemaître E., Courtillon C., Gares H., Daniel P., Fediaevsky A., Blanchard Y., Etteradossi N., van der Werf S., Jestin V., Niqueux E., 2016. Euro surveill. (In press).
- Itavi, 2013. In : Mise à jour des références CORPEN-Volailles de 2006
- OIE, 2016. In : Code sanitaire pour les animaux terrestres, Chapitre 10.4. Influenza Aviaire.
- Pingel H., Guy G., Baéza E., 2012. In : Production de canards, pp121-122.
- 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. J. Clin. Microbiol. (40), 3256-3260.

Tableau 1 : Différentes conditions de lisiers et tampons mis en place pour l'étude de vieillissement artificiel.

Matrice	Sans traitement	Traitement lait de chaux	
Lisier contaminé	Non traité	pH 10	pH 12
Lisier	Non traité	pH 10	pH 12
Tampon phosphate	Non traité	/	/
Tampon phosphate contaminé	Non traité	/	/

} Contrôles négatifs
Contrôle positif

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques des lisiers utilisés pour les études de vieillissement artificiel.

production	unité	canard	canard	canard gavage
		reproducteur	reproducteur	
pH	pH	7,28	6,97	5,57
Conductivité [20°C]	μS/cm	7 090	9 920	15 800
Conductivité [25°C]	μS/cm	7 790	10 900	17 800
Densité		/	0,994	1,049
Matière sèche (MS)	%	3,10	1,20	9,20
Matières organiques sur MS	%	56,70	58,40	81,40
Matière minérale sur MS	%	43,30	41,60	18,60
C org sur MS	%	38,90	32,90	43,40
Azote total Kjeldahl (NTK)	%N	0,18	0,20	0,49
Nitrate	%N/brut	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Nitrite	%N/brut	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Azote ammoniacal (NH4-N)	%N/brut	0,10	0,16	0,26
Azote organique (calcul)	%N/brut	0,08	0,04	0,23
Calcium sur MS	% CaO	16,27	5,68	1,87
Potassium sur MS	% K ₂ O	3,13	13,58	1,83
Sodium sur MS	% Na ₂ O	0,78	4,04	0,75
Phosphore sur MS	% P ₂ O ₅	6,60	4,01	2,92
Soufre sur MS	% SO ₃	1,93	2,50	0,90

Tableau 3 : Résultats d'isolement viral obtenus lors du vieillissement artificiel de lisiers de canards reproducteurs pékin et barbarie, expérimentalement contaminés et traités ou non par chaulage. S : Semaine

		S0 Après 1H de contact	S1 Après 7 jours à +4°C	S2 Après 14 jours à +4°C	S3 Après 21 jours à +4°C	S4 Après 28 jours à +4°C	S5 Après 35 jours à +4°C	S6 Après 42 jours à +4°C	S7 Après 49 jours à +4°C
lisier canards reproducteurs barbarie	Non traité	Positif	Positif	Positif	Positif	Négatif	Négatif	/	/
	traitement pH 10	Positif	Négatif	Négatif	Négatif	/	/	/	/
	traitement pH 12	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	/	/	/	/
lisier canards reproducteurs pékin	Non traité	Positif	non effectué	Positif	Positif	Positif	Négatif	Négatif	Négatif
	traitement pH 10	Positif	non effectué	Négatif	Négatif	/	/	/	/
	traitement pH 12	Positif	non effectué	Négatif	Négatif	/	/	/	/

/ condition de lisier non conservé, son statut ayant été confirmé négatif lors de précédents prélèvements

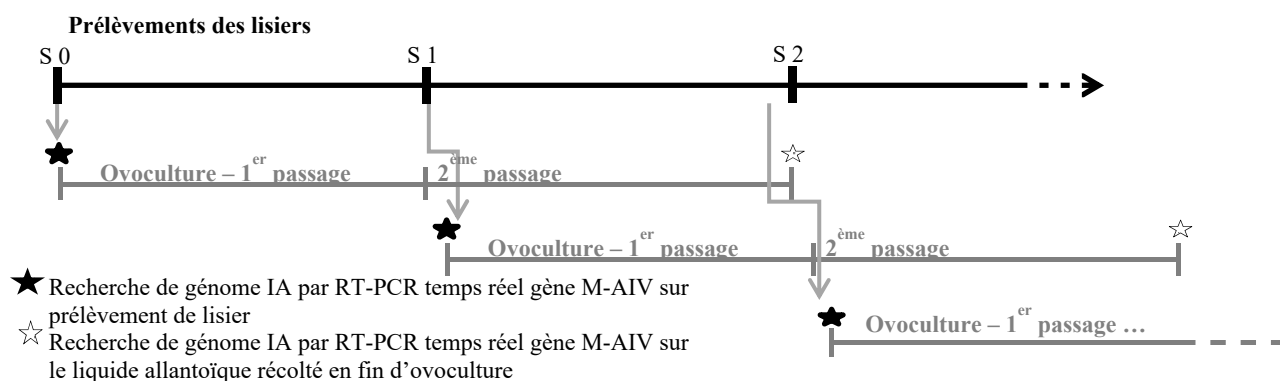


Figure 1 : Chronologie d'un vieillissement artificiel de lisier. (S : semaine)