

# INFLUENCE DE L'AGE ET DE LA SAISON DE PRELEVEMENTS SUR LA SEROPOSITIVITE VIS A VIS DES INFLUENZAVIRUS DE SOUS TYPES H5 CHEZ LES PALMPIEDES REPRODUCTEURS MULTIPLICATEURS POUR LA PERIODE 2005 A 2007.

**Schmitz Audrey, Bougeard Stéphanie, Guillemoto Carole, Pierre Isabelle, Le Bras Marie-Odile, Allée Chantal, Lamandé Josiane, Picault Jean-Paul, Jestin Véronique**

*AFSSA\* Site de Ploufragan, Unité de Virologie Immunologie Parasitologie Aviaires et Cunicoles, Laboratoire National de Référence (LNR) pour l'influenza aviaire et la maladie de Newcastle*

## RESUME

Les infections à influenza virus de type A faiblement pathogène (FP) de sous-types H5 (H5) et H7 (H7) rentrent dans la définition réglementaire internationale de l'Influenza Aviaire (IA) à déclaration obligatoire. Depuis 2002, à l'instigation de la Commission Européenne, des enquêtes sérologiques relatives à la surveillance de l'IA dans les élevages avicoles ont été mises en place dans les Etats Membres afin de détecter la présence d'infections inapparentes à virus IA H5 et/ou H7. Dans ce contexte de surveillance, la réceptivité des palmipèdes domestiques à l'infection par des virus IA (en particulier H5) a été confirmée en Europe.

Ces trois dernières années (2005-2007) en France, des données sérologiques (anticorps inhibant l'héماغglutination H5) concernant ces productions ont donc été cumulées en complétant les données officielles par le recours à un antigène H5 plus spécifique de la situation française. Des analyses statistiques ont été effectuées à partir des résultats obtenus sur 1206 lots de canards reproducteurs (585 lots de canards Barbarie et 621 lots de canards Pékin) et sur 177 lots d'oies reproductrices, pour évaluer l'influence du type de production, de l'âge des animaux et de la période de prélèvements.

Les résultats globaux montrent que:

- les canards Pékin et Barbarie de l'étage "sélection" ne présentent aucune séropositivité H5.
- chez les canards Pékin et Barbarie de l'étage "multiplication", le pourcentage de lots séropositifs au stade adulte (respectivement 14,1% et 13,4%) est très significativement augmenté ( $p < 0,001$  pour les Pékin et les Barbarie) par rapport au stade futur-reproducteur (respectivement 0,9% et 0,7%).
- concernant les élevages d'oies reproductrices, un tiers des lots apparaît séropositif avec une différence significative liée à l'âge, illustrée par une augmentation du pourcentage en fonction de l'âge ( $\geq 50\%$  des plus de 2 ans sont séropositifs).

La discussion attire l'attention, pour de futures enquêtes non exhaustives chez les canards reproducteurs, sur les possibles biais d'échantillonnage susceptibles de générer des résultats ne reflétant pas la situation réelle. Les études en cours et à venir aux plans épidémiologique et virologique (voir notamment Briand et al., JRA 2009) sont également évoquées.

## ABSTRACT

Infections with low pathogenic influenza virus A H5 (H5) and H7 (H7) are now notifiable diseases. The European Commission has instigated since 2002 serological surveys in Member States to detect AI H5 or H7 infections in poultry. These contexts of surveys allow to confirm the receptivity of domestic waterfowl to infection with AI viruses (especially H5) in Europe.

Serological data from these productions have been cumulated for the three last years (2005-2007) in France. Statistical analyses were carried out from 1206 results on flocks of breeding ducks (585 flocks of Muscovy ducks and 621 flocks of Pekin ducks) and from 177 flocks of breeding geese: we have analysed the influence of type of production, age of animals and sampling period.

The results show that:

- Pekin and Muscovy ducks "selection" breeders do not present any H5 AIV infection.
- Adult Pekin and Muscovy ducks "multiplication" breeders present a percentage of infected flocks (respectively 14.1% and 13.4%) which is significantly increased ( $p < 0.001$  for Pekin and Muscovy) in comparison with juvenile breeders (respectively 0.9% and 0.7%).
- one third of breeding geese flocks is H5 seropositive and these results present a significant difference linked to age, with an increase in the percentage with age ( $\geq 50\%$  of the birds older than 2 years being H5 seropositive).

The discussion mentions that attention should be paid, should non exhaustive surveys be implemented in breeding ducks in the future, to possible sampling bias that might be generated and would not reflect the real situation. Ongoing epidemiological and future virological studies plans are also mentioned (see Briand et al., 2009 JRA).

\* Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

## INTRODUCTION

Les infections à influenza virus faiblement pathogènes (FP) de sous-types H5 (H5) et H7 (H7) rentrent dans la définition réglementaire internationale de l'Influenza Aviaire (IA) à déclaration obligatoire (Code sanitaire pour les animaux terrestres OIE, Directive du conseil européen 2005/94/CE). Depuis 2002, à l'instigation de la Commission Européenne, des enquêtes sérologiques, relatives à la surveillance de l'influenza aviaire dans les élevages avicoles, ont été mises en place dans les Etats Membres, afin de détecter la présence d'infection inapparente à influenza virus H5 et/ou H7. Dans ce contexte de surveillance, comme dans le cadre d'études plus spécifiques, la réceptivité des palmipèdes domestiques à l'infection par des virus (en particulier de sous types H5) a été confirmée en Europe, en particulier en France (Jestin et Francart, 2005 ; Cherbonnel et al., 2007 ; Hesterberg et al., 2008). L'infection de canards reproducteurs élevés en claustration et des oies reproductrices est très peu documentée. La connaissance du niveau de prévalence de l'infection dans ces productions constitue une donnée minimale pour évaluer les risques encourus ; de plus, l'analyse des données de surveillance obtenues dans ces productions peut permettre d'identifier de possibles facteurs favorisants, constituant ainsi une aide pour la conception d'une surveillance ciblée et la mise en place de mesures de prévention.

A ces fins, l'influence du type de production, de l'âge des animaux et de la période de prélèvement sur la séropositivité H5 a été évaluée. L'analyse porte sur 1206 lots de canards reproducteurs (585 lots de canards Barbarie et 621 lots de canards Pékin) et 177 lots d'oies reproductrices.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Protocole d'enquête sérologique

La quasi-totalité des élevages français de canards reproducteurs pour la multiplication et pour la sélection et une partie des élevages d'oies reproductrices ont été soumis en 2005, 2006 et 2007 aux enquêtes de surveillance effectuées entre les mois de mai de l'année n et mars de l'année n+1. Les données sur les caractéristiques de l'élevage (sélection/multiplication) étaient issues des commémoratifs accompagnant les prélèvements, recoupés par des données obtenues par l'AFSSA. Dans certains élevages, plusieurs bandes ont été prélevées, ce qui explique le nombre total de 1206 lots analysés. Après un premier criblage par les laboratoires de diagnostic agréés des lots potentiellement positifs H5 ou H7<sup>1</sup>, les

sérums correspondant à ces lots ont été testés au LNR par la méthode d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) H5 et H7, dérivée de la technique IHA Newcastle référencée NF U 47-011. Pour se limiter à la valence H5, les antigènes utilisés, fournis d'une part par le laboratoire communautaire de référence (LCR, VLA Weybridge) et préparés d'autre part au LNR à partir de souches françaises plus spécifiques de la situation française sont mentionnés dans le tableau 2.

Un lot est considéré séropositif vis à vis du sous-type H5 s'il présente au moins 1 sérum avec un titre supérieur ou égal à 16 vis à vis de 2 antigènes H5 présentant des neuraminidases différentes (ex : H5N2 et H5N7).

### 1.2. Analyses statistiques

Des regroupements par âge et par période de prélèvement ont été effectués. Ainsi, 3 périodes de prélèvements ont été définies arbitrairement, correspondant aux saisons d'été (mai-août), automne (septembre-novembre) et hiver (décembre-mars). Les différentes tranches d'âge reflètent, quant à elles, les différentes périodes de vie des canards barbarie et pékin reproducteurs (tableau 1). Concernant les oies, les cycles de ponte naturelle s'étalant de février à juin, les regroupements ont donc été effectués en 4 classes d'âge, d'effectifs les plus proches possibles (< 1 an, 1 à 2 ans, 2 à 3 ans, > 3 ans).

	période	âge en semaines		période	âge en semaines
barbarie	pré-ponte	1-24	pékin	pré-ponte	1-18
	1 <sup>ère</sup> ponte	25-51		ponte	19-68
	mue	52-66		ponte prolongée	> 68
	2 <sup>ème</sup> ponte	67-85			
	> 2 <sup>ème</sup> ponte	> 85			

**Tableau 1 :** Correspondance période de vie – âge des canards barbarie.

Les analyses statistiques ont été effectuées par régression logistique avec effet aléatoire (procédure glimmix du logiciel SAS) afin de déterminer les influences potentielles des différents facteurs étudiés (année, âge, période). La notion d'élevage est considérée comme un facteur aléatoire : un même élevage peut présenter plusieurs bandes de différents âges à la même période ou encore une bande différente - lors d'un retour sur élevage positif - d'un âge différent à une période différente. On estime qu'un facteur présente un effet significatif, puis que ses modalités sont significativement différentes lorsque la probabilité de conclure à tort par le seul fait du hasard est inférieure à 0,05.

<sup>1</sup> Pour ce faire ces laboratoires ont mis en oeuvre la technique IHA mentionnée ci après mais en se limitant à une dilution des sérums ne dépassant pas le seuil de positivité (1/16) et en ne testant qu'un seul antigène H5 ou H7 fourni par le LCR

## 2. RESULTATS

### Contexte de l'étude

Même si la (quasi)totalité des élevages de reproduction a été visitée au cours des 3 années, cela n'a pas été le cas chacune des 3 années : ainsi, seuls 66% des élevages de canards reproducteurs déterminés H5 séropositifs une des trois années au moins ont été prélevés les 3 années successivement. Les 34% restants se partagent principalement entre des prélèvements en 2005 et 2006 ou en 2005 seulement. Une telle distribution peut donc avoir comme répercussion un biais non connu sur les résultats.

### 2.1. Résultats sérologiques globaux.

Les résultats sérologiques obtenus sont reportés dans le tableau 2.

Pour les canards, 122 bandes sur les 1206 analysées se sont avérées séropositives vis à vis du sous type H5 (soit environ 10%). Concernant les oies, 177

lots ont été testés au cours des années 2005 à 2007, et 64 lots ont été conclus H5 séropositifs (soit environ 36%).

### 2.2. Analyses détaillées en fonction de l'espèce, production, âge, période de prélèvement.

#### 2.2.1. Influence de l'étage Sélection – Multiplication

Des différences significatives sont mises en évidence lorsque l'on compare les animaux "sélection" avec les animaux "multiplication" : que ce soit des canards pékins ( $p=0,015$ ), Barbarie ( $p=0,039$ ) ou encore les deux cumulés ( $p<0,0001$ ), la prévalence du nombre de lots H5 séropositifs est très nettement supérieure à l'étage multiplication par rapport à l'étage sélection.

En raison du faible nombre de bandes de palmipèdes de l'étage sélection et de leur absence de séropositivité H5, seuls les animaux de l'étage multiplication feront l'objet du reste de l'étude.

Type de production et année	nombre de bandes			nombre d'élevages <sup>2</sup>		
	H5 séronégatifs	H5 séropositifs <sup>1</sup>	concernés par l'enquête (% séropositivité)	H5 séronégatifs	H5 séropositifs <sup>1</sup>	concernés par l'enquête (% séropositivité)
pékin multiplication 2005	190	30	220	118	20	138
pékin multiplication 2006	176	21	197	114	14	128
pékin multiplication 2007	142	18	160	100	14	114
<b>total pékin multiplication</b>	<b>508</b>	<b>69</b>	<b>577 (12,0%)</b>	<b>213 <sup>2</sup></b>	<b>41 <sup>2</sup></b>	<b>253 (16,2%) <sup>2</sup></b>
pékin sélection 2005	20	0	20	8	0	8
pékin sélection 2006	13	0	13	7	0	7
pékin sélection 2007	11	0	11	6	0	6
<b>total pékin sélection</b>	<b>44</b>	<b>0</b>	<b>44 (0,0%)</b>	<b>8 <sup>2</sup></b>	<b>0</b>	<b>8 (0,0%) <sup>2</sup></b>
barbarie multiplication 2005	169	25	194	127	17	144
barbarie multiplication 2006	175	15	190	147	9	156
barbarie multiplication 2007	151	13	164	127	13	140
<b>total barbarie multiplication</b>	<b>495</b>	<b>53</b>	<b>548 (9,7%)</b>	<b>208 <sup>2</sup></b>	<b>32 <sup>2</sup></b>	<b>240 (13,3%) <sup>2</sup></b>
barbarie sélection 2005	11	0	11	7	0	7
barbarie sélection 2006	15	0	15	7	0	7
barbarie sélection 2007	11	0	11	6	0	6
<b>total barbarie sélection</b>	<b>37</b>	<b>0</b>	<b>37 (0,0%)</b>	<b>8 <sup>2</sup></b>	<b>0</b>	<b>8 (0,0%) <sup>2</sup></b>
<b>TOTAL CANARDS</b>	<b>1084</b>	<b>122</b>	<b>1206 (10,1%)</b>	<b>437 <sup>2</sup></b>	<b>73 <sup>2</sup></b>	<b>510 (14,3%) <sup>2</sup></b>
oies multiplication 2005	38	19	57	26	13	39
oies multiplication 2006	39	29	68	31	13	44
oies multiplication 2007	31	16	47	28	14	42
<b>total oies multiplication</b>	<b>108</b>	<b>64</b>	<b>172 (37,2%)</b>	<b>48 <sup>2</sup></b>	<b>28 <sup>2</sup></b>	<b>76 (36,8%) <sup>2</sup></b>
oies sélection 2005	1	0	1	1	0	1
oies sélection 2006	2	0	2	2	0	2
oies sélection 2007	2	0	2	2	0	2
<b>total oies sélection</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>5 (0,0%)</b>	<b>2 <sup>2</sup></b>	<b>0</b>	<b>2 <sup>2</sup></b>
<b>TOTAL OIES</b>	<b>113</b>	<b>64</b>	<b>177 (36,2%)</b>	<b>50 <sup>2</sup></b>	<b>28 <sup>2</sup></b>	<b>78 (35,9%) <sup>2</sup></b>

**Tableau 2 :** répartition des résultats sérologiques en fonction du type de production et de l'année.

<sup>1</sup>: au moins un sérum positif vis à vis de minimum 2 des 3 antigènes H5 utilisés (2 antigènes LCR A/Ostrich/Denmark/72420/96/H5N2 et A/Duck/Denmark/64650/03/H5N7, et 1 antigène français – A/Duck/France/02166/02/H5N3 en 2005 et 2007, A/Duck/France/05057b/05/H5N2 en 2006).

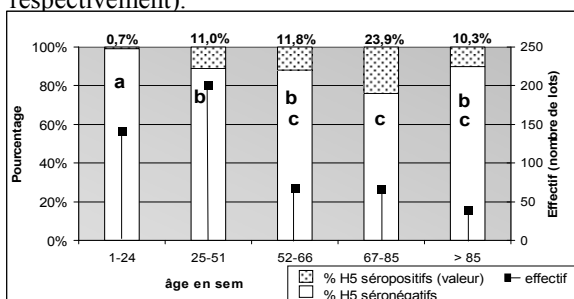
<sup>2</sup>: le fait que plusieurs bandes dans un même élevage aient pu être testées- soit la même année, soit différentes années- explique que le nombre d'élevages soit inférieur au nombre de bandes. Un élevage a été considéré positif à partir du moment où au moins une bande au cours des 3 ans s'est révélée positive.

### 2.2.2. Les canards Barbarie reproducteurs (multiplication)

Les analyses statistiques effectuées sur les données cumulées des 3 années ne montrent pas d'effet de la période de prélèvement ( $p=0,44$ ) même si l'on observe des pourcentages de séropositivité différents entre les saisons (6,7% en été, 9,8% en automne à 12,4 % en hiver).

Une influence de l'âge sur la séropositivité (figure 1) est, quant à elle, mise en évidence ( $p=0,002$ ) : la période de pré-ponte (1 à 24 semaines) avec une prévalence de séropositivité très inférieure (0,7%) est significativement différente des autres classes d'âge. Le pourcentage moyen de positivité H5 chez les adultes est de 13,4%.

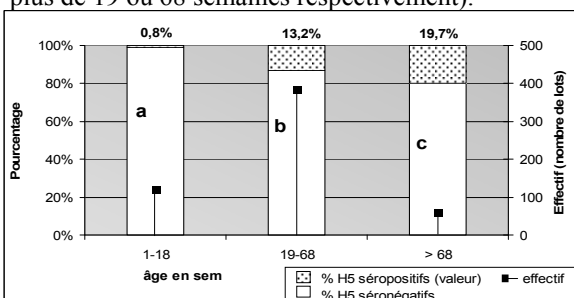
De plus, en seconde ponte le nombre de canards Barbarie séropositifs H5 est aussi significativement augmenté (23,9%) en comparaison avec les classes d'âge 1-24 et 25-51 ( $p=0,0003$  et  $0,004$  respectivement).



**Figure 1 :** Canards Barbarie Multiplication : influence de l'âge. Les pourcentages affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

### 2.2.3. Les canards pékin reproducteurs (multiplication)

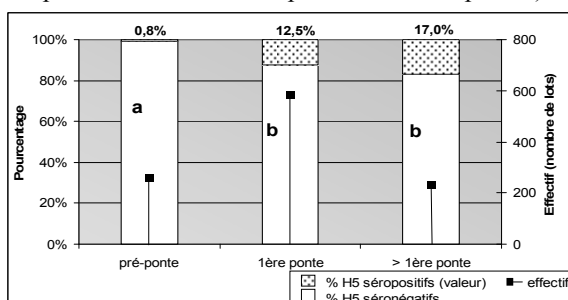
Comme pour les canards Barbarie, aucune influence de la période de prélèvement n'a été mise en évidence ( $p=0,39$ ), malgré la même observation de variations de séropositivité entre l'été et l'hiver (9,8% en été, 10,9% en automne à 17,2 % en hiver). De même, l'influence de l'âge sur la séropositivité (figure 2) est démontrée ( $p=0,002$ ) : les 3 classes d'âge sont significativement différentes les unes des autres, avec un pourcentage de séropositivité croissant avec l'âge des animaux (0,8% pour la pré-ponte contre 13,2 et 19,7 % pour les animaux de plus de 19 ou 68 semaines respectivement).



**Figure 2 :** Canards Pékin Multiplication : influence de l'âge. Les pourcentages affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

### 2.2.4. Les canards barbarie et pékin (multiplication)

Aucune différence significative n'ayant été mise en évidence entre les canards barbarie et pékin ( $p=0,148$ ), les analyses peuvent donc être effectuées en cumulant les données correspondant à environ 11% de séropositivité H5. Dans ces conditions, il n'est pas observé de différence significative concernant l'influence de la période de prélèvement. L'influence de l'âge est une nouvelle fois démontrée : les animaux en période de pré-ponte présentent un taux significativement bien plus faible de séropositivité en H5 (0,8%) que les animaux plus âgés (13,8%) ( $p=0,0002$  et  $< 0,0001$  respectivement avec "1<sup>ère</sup> ponte" et "> 1<sup>ère</sup> ponte").

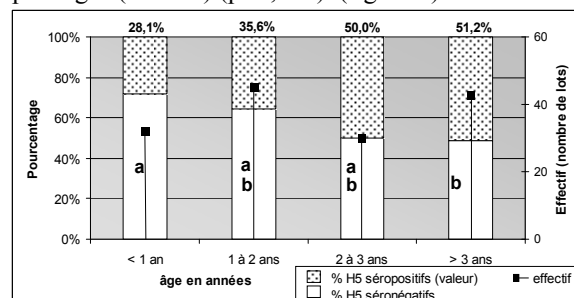


**Figure 3 :** Canards Barbarie et Pékin Multiplication : influence de l'âge. Les pourcentages affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

### 2.2.5. Les oies reproductrices (multiplication)

De même que pour les canards, aucune influence de la période de prélèvement n'a été mise en évidence concernant les oies reproductrices ( $p=0,15$ ).

L'influence de l'âge des animaux est démontrée ici par la seule différence significative entre les animaux les plus jeunes ( $< 1$  an) et les animaux les plus âgés ( $> 3$  ans) ( $p=0,032$ ). (figure 4).



**Figure 4 :** Oies multiplication : influence de l'âge. Les pourcentages affectés d'une même lettre ne sont pas significativement différents.

## 3. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La présente étude s'est focalisée sur les infections à influenza virus de sous types H5, car en France les infections par des virus de sous-types H7 sont tout à fait rares dans les élevages de volailles.

Les infections par des virus de sous-types H5FP dans les élevages de palmipèdes de l'étagé multiplication sont beaucoup plus fréquentes

(environ 11% des lots de canards reproducteurs, environ 37% des lots d'oies reproductrices en moyenne pour les années 2005 à 2007 présentent une séropositivité en H5 ).

Les séropositivités ont justifié des investigations en retour dans les élevages concernés, diligentées par les Services Vétérinaires et standardisées par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI). Cependant chez les reproducteurs, en raison probablement des délais de retour dans les élevages supérieurs à la courte période d'excrétion virale et des difficultés de mises en œuvre de protocoles de recherche, seuls 3 virus H5 ont été détectés au niveau moléculaire (1 H5N?, 1 H5N2 et 1 H5N3-le seul isolé), si bien que la connaissance des caractéristiques des virus H5 en cause chez les reproducteurs est très insuffisante alors qu'elle est plus étayée chez les canards prêts à gaver (Cherbonnel et al., 2007 ; Briand et al., 2009). Ces difficultés d'accès à des prélèvements satisfaisants ne sont pas favorables à une surveillance étroite de l'évolution de ces virus H5. Cette situation est très dommageable pour anticiper des situations épidémiologiques à risque, compte tenu de la plasticité du génome des influenza virus en général et de la possibilité d'infections asymptomatiques des canards par des virus influenza hautement pathogènes.

Alors que l'étagage sélection apparaît indemne probablement grâce à la mise en œuvre d'une meilleure biosécurité dans ce type de production, chez les palmipèdes reproducteurs en multiplication il est démontré que les séropositivités sont liées à l'âge ou au stade de production des animaux prélevés. Chez les canards, le nombre de lots H5 séropositifs en période de pré-ponte est significativement différent du nombre de lots de canards H5 séropositifs plus âgés. Afin de mieux cerner les facteurs favorisant l'introduction des

virus influenza au cours des six premiers mois de ponte, une étude épidémiologique est en cours à l'AFSSA Ploufragan, pilotée par V. Michel responsable de l'unité EBEAC.

De plus, chez les canards de Barbarie, le stade de seconde ponte apparaît aussi concourir à accroître le nombre de lots séropositifs.

Les oies reproductrices présentent, quant à elles, un taux de séropositivité (37,2%) plus élevé que chez les canards : cette donnée pourrait être expliquée par le fait que les oies reproductrices sont élevées en extérieur et présentent une durée de vie plus longue que les canards, circonstances susceptibles de conduire à des expositions plus fréquentes par les virus considérés, ou par une réceptivité particulière aux virus de sous-types H5 faiblement pathogènes ou encore par une persistance prolongée des anticorps H5.

Dans les trois productions de canards et oies reproducteurs, aucune relation entre la séropositivité et la saison de prélèvement n'a été mise en évidence.

Au vu de ces résultats, l'âge des animaux et donc le stade de production ressort donc comme un facteur important au niveau épidémiologique : il est donc important de tenir compte de ces éléments pour réaliser l'échantillonnage selon les objectifs poursuivis (suivi d'élevage à risque, enquêtes de prévalence).

## REMERCIEMENTS

Les auteurs adressent leurs remerciements à tous les partenaires des enquêtes sérologiques, Services vétérinaires, Vétérinaires sanitaires, personnels des DSV, laboratoires vétérinaires départementaux de criblage et à la DGAI.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Briand F.X., Le Gall-Reculé G., Bluteau A., Guillou-Cloarec C., Ogor K., Macé C., Ferré S., Schmitz A., Guionie O., Massin P., Lamandé J., Allée C., Cherbonnel M., Picault J.P., Jestin V., Mise en évidence de réassortiments multiples chez les influenza virus de sous-type H5 faiblement pathogènes français entre 2002 et 2008, Proceedings JRA 2009 in press
- Cherbonnel M., Lamandé J., Allée A., Schmitz A., Ogor K., Le Gall-Reculé G., Le Bras M-O., Guillemoto C., Pierre I., Picault J-P., Jestin V. 2007. Avian Disease, (51), 408-413.
- Hesterberg U., Harris K., Brown I. (2008) Avian Influenza in 2006/07 Implications for Surveillance, SCOFCAH meeting, Brussels, 09-04-2008.
- Jestin V. et Francart J. 2005, Bulletin épidémiologique, (18), 1-3.
- OIE - Code sanitaire pour les animaux terrestres 2008 : chapitre 10.4 Influenza Aviaire

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