



1ères Journées Maghrébines d'aviculture

Détection et caractérisation des virus de la bronchite infectieuse et de la grippe aviaire en circulation dans le Nord-Est de l'Algérie

**BARBERIS A., BOUDAUD A., ALLOUI N., RAHAB H.,
LACHHEB J., DUCATEZ M. & GHRAM A.**

Plan

- 1. Importance de la Bronchite Infectieuse et de l'Influenza Aviaire**
- 2. Structure et caractéristiques de l'IBV et de l'IAV**
- 3. Objectifs de l'étude**
- 4. Description de l'expérience**
- 5. Résultats**
- 5. Conclusion et recommandations**

La maladie respiratoire des volailles est une dominante pathologique, avec:

- Une **prévalence** variable selon l'étiologie, mais pouvant atteindre **100 %** dans certaines conditions d'élevage.
- Un taux de **mortalité** variant de **1 à 47%** (Hassan et al., 2016), mais pouvant atteindre **100 %** dans le cas des formes hautement pathogènes de l'influenza aviaire.

Importance particulière de la BI et de l'IA:

- Dans bon nombre de pays, la BI et l'IA (H9N2) sont les pathogènes respiratoires dominants (Hassan et al., 2016);
- Plus de 66% des maladies respiratoires sont des coïnfections
- Plus de 41% des coïnfections sont des infections mixtes par la bronchite infectieuse (BI) et l'influenza aviaire (IA) (Hassan et al., 2016).

Objectifs de l'étude

L'IBV et l'IAV possèdent plusieurs caractéristiques, qui font d'eux deux pathologies d'une importance économique majeure en élevage avicole.

- Notre étude a été menée pour atteindre **trois objectifs** :
 - **Détecter**, via des techniques moléculaires, l'infection par l'IAV et l'IBV
 - Déterminer **la prévalence** des deux infections
 - **Caractériser le génome** des isolats algériens

Méthodologie :

Collectes des échantillons :

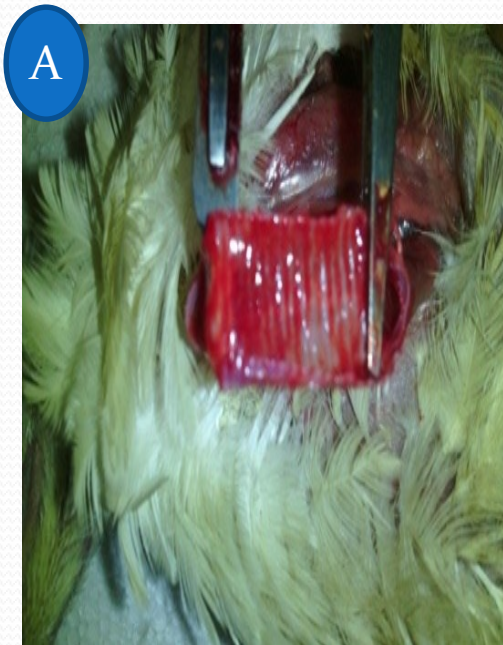
Première période : Janvier-Avril 2017

Pouls d'organes	Origine	Destinée
28 pouls d'organes: trachée, poumon, rein, intestin...	25 Bâtiments de P. chair et P. pondeuse	Recherche d'IBV dans 28 pouls
		Recherche d'IAV dans 11 pouls

Deuxième période : Aout-Septembre 2017

Pouls d'organes	Origine	Destinée
30 pouls d'organes: trachée, poumon, rein, intestin...	6 Bâtiments de P. chair et P. pondeuse	Recherche d'IBV dans 30 pouls
		Recherche d'IAV dans 9 pouls

Figure: Lésions constatées sur des poulets morts de l'IA. **A:** lésions hémorragiques de la trachée. **B:** présence d'un bouchon au niveau de la lumière de la trachée. **C:** lésions hémorragiques des intestins et du pancréas.



Techniques de détection de l'infection:

En ciblant un gène stable, la détection de l'ARN viral a été réalisée par:

- **RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) "Taqman"**
- **RT-PCR Classique (RT-PCR en point final)**

RT-PCR classique:

Désignation	Amorce	Position de l'amorce	Gene cible	Taille du produit PCR
IBV				
Amorce F	IBV 5' GU391	391-408	5' UTR	142 pb
Amorce R	IBV 5' GL533	512-533		
AIV				
Amorce F	M + 25		Gene M	99 pb
Amorce R	M - 25			

RT-PCR en temps réel "Taq Man"

Désignation	Amorce	Position de l'amorce	Gene cible	Taille du produit PCR
IBV				
Amorce F	IBV 5' GU391	391-408	5' UTR	142 pb
Amorce R	IBV 5' GL533	512-533		
Sonde	5' FAM + 3' BHQ1	473-494		
AIV				
Amorce F	M + 25		Gene M	99 pb
Amorce R	M - 124			
Sonde	5' FAM + 3' BHQ1			

Typage de l'IAV:

- Les échantillons positifs au gène M de l'IA, ont été testés par un kit utilisant des amorces spécifiques du gène H9.
- Les produits PCR (**252 pb**) ont été révélés sur un gel d'agarose 1.5 %.

Amplification sur des œufs embryonnés:

- Les échantillons avérés positifs à l'infection (IBV ou IAV), sont amplifiés par passage sur œufs embryonnés, avant d'être soumis à la RT-PCR et au séquençage

Amplification du gène S1 (IBV) et du gène H9 (IAV)

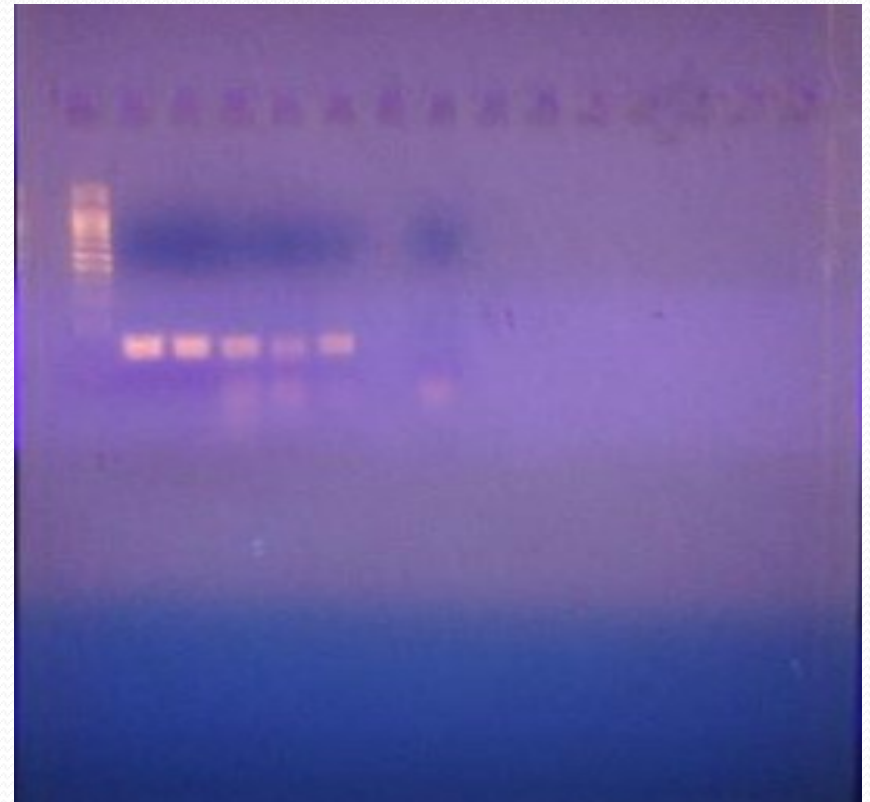
Designation	Séquence d'amorce (5'-3')	Position de l'amorce	Taille du produit PCR
IBV			
S1 Oligo 5'	5'TGAAAACACTGAACAAAAGACA ₃ '	20248-20267	1720 pb
S1 Oligo 3'	5' CAT AACTAACATAAGGGCAA ₃ '	21948-21967	
IAV			
HAF₁	5'GAATTGATTATTATTGGTCAGTA ₃ '	710-732	550 pb
HAR₁	5'TCATCAATCCTTATTGTTGATCA ₃ 'T	1272-1249	

Prévalence:

IBV

- 4 sur les 28 pouls d'organes testés étaient (+) à l'IBV:
Prévalence = 14,28%
- Les 4 échantillons (+) proviennent de 3 bâtiments sur les 25 étudiés: **proportion des exploitations touchées = 12%**

Figure : échantillons positifs passés sur le même gel (2T, 9T, 16T et 16 R).

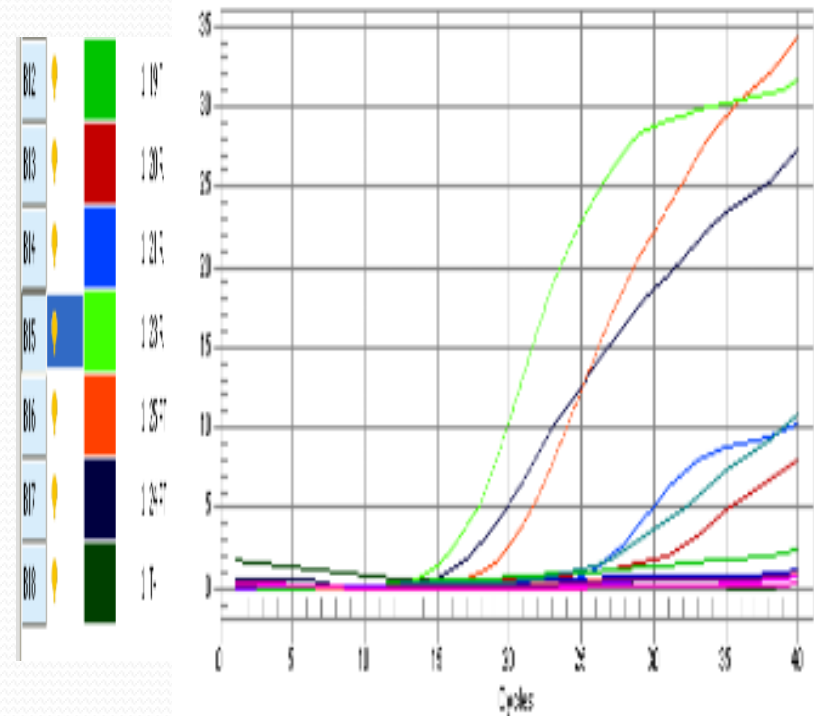


Prévalence:

AIV

- Tous les pouls d'organes se sont avérés (+) à l'AIV:
Prévalence = 100%
- **Proportion des exploitations touchées = 100%**

Figure : résultats de la QRTPCR sur certains échantillons



Co-circulation / Co-infection:

- La présente étude a confirmé la co-circulation des virus BI et IA, mais la co-infection n'a été mise en évidence dans aucun des échantillons prélevés pour les besoins de l'enquête.

Résultats de la détection de l'IAV par les 2 types de la RT-PCR

Période	Bâtiment	Echantillon	qRT-PCR	RT-PCR
Avril – Mai 2017	n° 19	Trachée	+	/
		Rein	+	/
	n° 20	Trachée	+	/
		Rein	+	/
	n° 21	Trachée	/	+
		Rein	+	/
	n° 23	Trachée	/	/
		Rein	+	/
	n° 24	Trachée, Poumon	+	+
		Rein	+	+
	n° 25	Trachée, Poumon	+	/
		Rein	+	+

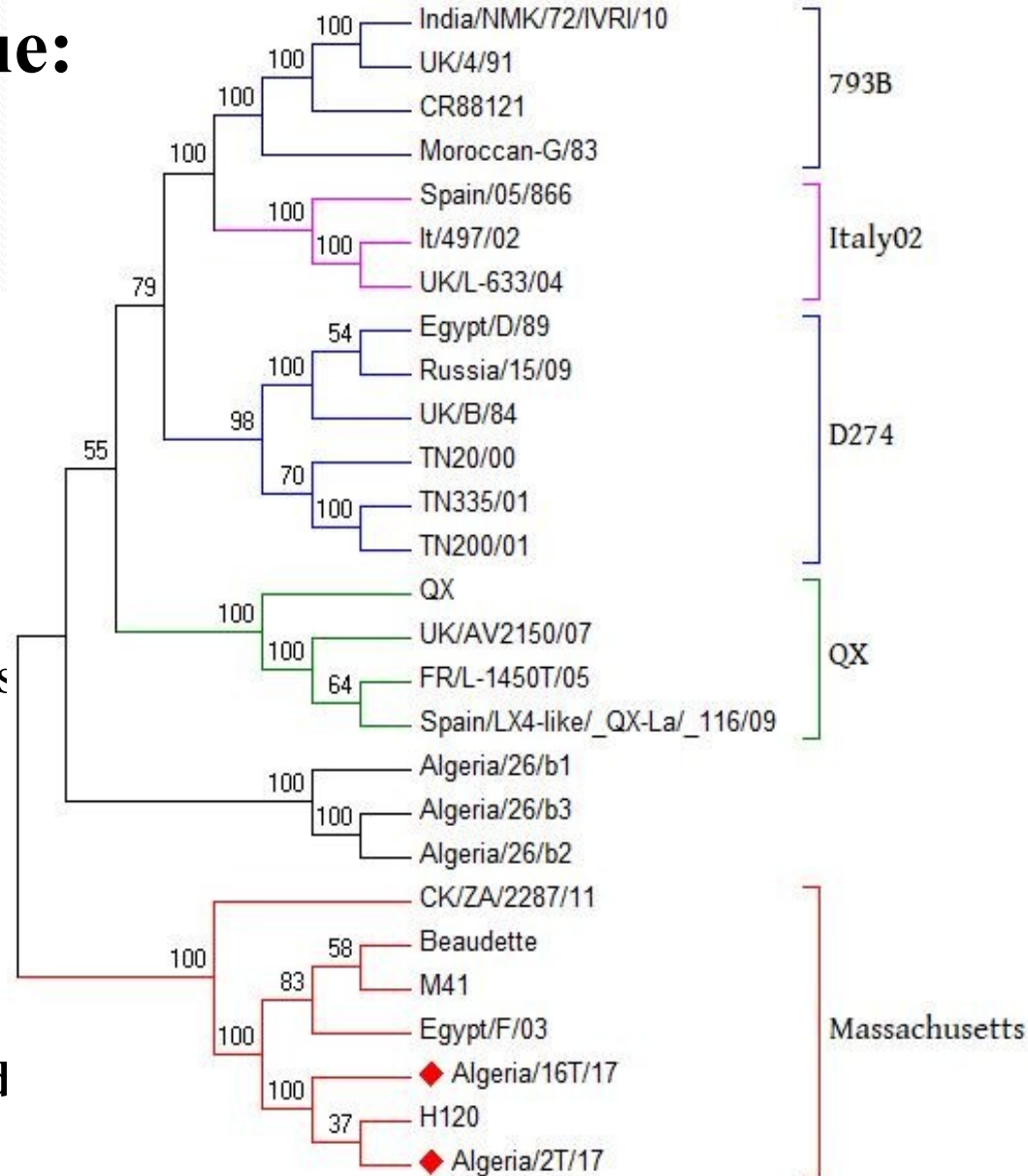
Résultats de la détection de l'IAV par les 2 types de la RT-PCR

Période	Bâtiment	Echantillon	qRT-PCR	RT-PCR
Août – Septembre 2017	n° 26	Trachée	/	+
		Intestin	/	+
	n° 27	Trachée	/	+
		Intestin	/	+
	n° 28	Trachée	/	+
		Rein	/	/
	n° 29	Trachée		+
		Intestin	/	/
	n° 30	Trachée	/	+
		Intestin	/	/
	n° 31	Trachée	/	+
		Intestin	/	+

Analyse phylogénétique:

IBV

- Sur les 4 échantillons (+), 2 souches seulement ont pu être séquencées et ont fait par la suite l'objet d'une analyse phylogénétique,
- Les 2 isolats, **Algeria/16T/17** et **Algeria/2T/17** sont monophylétiques avec les souches réf. du génotype Massachusetts (Bootstrap: 100%)
- Les 2 isolats de l'étude sont distancés génétiquement des souches algériennes isolées par Sid en 2013 dans la **région Centre Nord de l'Algérie**




Similitude de nucléotides avec les souches de Référence (GenBank):

IBV

- Les 2 souches algériennes de l'étude sont des souches sauvages (similitude avec la souche vaccinale H120 > 99% (Worthington et al., 2006))
- Le fort % de similitude (92-93%) confirme l'appartenance des 2 isolats algériens au génotype Massachusetts

	Massachusetts	QX	Italy02	D274	793B	Algeria/2T/17	Algeria/16T/17
Massachusetts							
QX	75%						
Italy02	75%	78%					
D274	67%	68%	74%				
793B	75%	78%	85%	69%			
Algeria/2T/17	93%	78%	77%	72%	76%		
Algeria/16T/17	92%	78%	77%	71%	77%	99%	
Algeria IBV 2013	76%	74%	78%	75%	77%	79%	79%

- 
- La présente étude confirme la circulation du génotype Massachusetts, considéré de distribution mondiale, en raison probablement de la systématisation des vaccins de type Mass. (Jones et al ., 2009 ; Farsang et al., 2002)
 - Les 2 isolats IBV de la présente étude sont assez différents des souches isolées en 2013 dans le Centre Nord du pays, lesquelles semblent très apparentées au nouveau génotype Africain NER/28/2007 and NGA/BB92/2007 (Sid et al., 2015)

Génotypage des souches IAV

- En attendant le séquençage du site de clivage (non encore réalisé), le kit RT-PCR spécifique du gène H9 a permis de révéler l'appartenance des souches de l'étude au sous type H9

Effet saison sur la circulation d'IAV :


Bien que la collecte des prélèvements ne s'est pas étalée sur toute l'année, la prévalence de l'IA ne semble pas être affectée par l'effet saison: prévalence de 100% sur les 2 périodes de prélèvements

Ces résultats corroborent ceux de la plus part des travaux qui font état d'une persistance de l'infection par le sous type H9

Shanmuganatham et al (2013) ont noté une prévalence plus importante de l'IA pendant la saison hivernale. Ce constat ne concerne cependant que la forme hautement pathogène H5N1

Effet de la vaccination dans les conditions naturelles dans le contrôle des foyers de l'IA

Période	Bâtiment	Vaccination	Mortalité
Avril 2017	n° 19	Non vaccinés	40-60 %
	n° 20		
	n° 21		
	n° 23		
	n° 24		
	n° 25		
Aout-Septembre 2017	n° 26	Non vacciné	40-60 %
	n° 27		
	n° 28		
	n° 31		
	n° 29	Vacciné H9N2	17 %
	n° 30	Vacciné H9N2	30 %

- 
- Les taux de mortalité ont été relativement faibles dans les foyers vaccinés
 - La protection incomplète conférée par le vaccin H9N2 (vaccins inactivés) est attribuée en partie à la dérive antigénique parmi les virus sauvages en circulation
 - Le même constat a été rapporté par plusieurs autres travaux (Sun et al., 2012 ; Salaheldin et al., 2017)

Conclusion et recommandation:

- L'étude a démontré la co-circulation du génotype Massachusetts et du sous type faiblement pathogène H9N2 parmi les volailles commerciales dans le Nord-Est de l'Algérie
- Le suivi régulier via la caractérisation des souches en circulation permettra de réagir en temps réel à tout bouleversement épidémiologique concernant les virus de la BI et de l'IA