



# Bulletin épidémiologique

## Santé animale - alimentation

Avril 2017 trimestriel/numéro 78

### Page 2

Bilan national de la campagne 2015 de visites sanitaires bovines : perceptions et connaissances des éleveurs bovins et des vétérinaires sur la fièvre aphteuse en France métropolitaine

### Page 7

L'infection par le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) entraîne chez le Porc une infection chronique par le virus de l'hépatite E

### Page 12 - Brève

Nouveau foyer de maladie de l'œdème chez le Sanglier, massif des Albères, Pyrénées-Orientales

### Page 13

Investigation d'un cas de botulisme aviaire dans un élevage de poules pondeuses plein-air

### Page 18

Point d'actualité sur la colistine

### Page 20 - Brève

Un nouvel astrovirus associé à une encéphalite chez le mouton

Le *Bulletin épidémiologique* est une publication conjointe de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail et de la Direction générale de l'Alimentation du ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt.

## ÉDITORIAL

Dans ce numéro, vous trouverez des articles couvrant une grande diversité de sujets, de cibles variées, concernant des dispositifs réglementés (n=1) ou non (n=5), des phénomènes sanitaires potentiellement émergents (n=2) ou non (n=4), les ruminants (n=2), les suidés (n=2), les volailles (n=1) ou encore étant partagés par toutes les filières animales (n=1).

Par ailleurs, ce numéro est l'occasion de vous informer que les modalités éditoriales du *Bulletin épidémiologique – Santé animale, alimentation (BE)* évoluent et s'adaptent au contexte de l'organisation sanitaire.

Pour le volet santé animale, la complémentarité continue à se développer entre le *BE* et le Centre de ressources de la Plateforme ESA (<http://www.plateforme-esa.fr/>). Alors que dans le centre de ressources sont publiés des bilans sanitaires sur la situation épidémiologique en France et à l'international, avec des délais de publication rapides adaptés au contexte sanitaire, le *BE* vise à présenter des articles privilégiant l'analyse et l'interprétation approfondie d'une situation.

Ainsi, l'épizootie actuelle d'influenza aviaire hautement pathogène à virus HNx fait actuellement l'objet de notes bimensuelles dans le Centre de ressources, à la fois pour la situation en France et en Europe. Le *BE* quant à lui produira un dossier sur cette épizootie dans son prochain numéro trimestriel, reprenant de manière synthétique ces notes, complétées avec des analyses sur les paramètres épidémiologiques et virologiques de cette épizootie.

En raison d'une actualité sanitaire très chargée, le numéro spécial sur les maladies réglementées et émergentes en santé animale faisant le bilan pour 2015 n'a pas pu être produit avant fin 2016 sur le modèle des autres années. Les articles de ce numéro vont être mis en ligne au fur et à mesure de leur disponibilité, puis regroupés courant 2017 sous la forme d'un numéro spécial. Ce numéro est de plus en plus utilisé et son contenu repris par des acteurs de la santé publique vétérinaire aux plans national et local, et nous les prions de bien vouloir nous excuser pour cette diffusion différée.

Pour des raisons de planification du *BE*, avec la publication annuelle du numéro spécial sur les maladies réglementées et émergentes, et depuis cette année d'un numéro spécial sur la sécurité sanitaire des aliments, la publication des numéros trimestriels est maintenant décalée d'un mois ; ces numéros seront désormais publiés en avril, juillet, octobre et janvier.

Enfin, les articles et brèves du *BE* sont désormais mis en ligne dès qu'ils sont prêts, de manière à les rendre disponibles sans attendre la parution du prochain numéro trimestriel, dans lequel ils seront insérés. Et vous pouvez vous abonner à une alerte mail qui vous signale toute nouvelle parution (dans la rubrique *Abonnement électronique* de la page internet du *BE* <http://bulletinepidemiologique.mag.anses.fr/fr/node/618>).

Bonne lecture,

Le comité de rédaction

# Bilan national de la campagne 2015 de visites sanitaires bovines : perceptions et connaissances des éleveurs bovins et des vétérinaires sur la fièvre aphteuse en France métropolitaine

Noémie Raut (1), Julie Rivière (1), Soline Hosteing (2), Olivier Debaere (3), Eric Collin (2), Stéphanie Philizot (2), Gina Zanella (4)\*

\*Auteur correspondant : gina.zanella@anses.fr

(1) École nationale vétérinaire d'Alfort (EnVA), EpiMAI USC Anses, Université Paris Est, Maisons-Alfort, France

(2) Société nationale des groupements techniques vétérinaires (SNGTV), Paris, France

(3) Direction générale de l'Alimentation, Bureau des intrants et de la santé publique en élevage, Paris, France

(4) Anses, Laboratoire de santé animale, Unité d'épidémiologie, Maisons-Alfort, France

## Résumé

La visite sanitaire bovine a porté en 2015 sur la fièvre aphteuse, compte tenu de la situation épidémiologique inquiétante de certains pays voisins et du risque de réintroduction en France. Les objectifs de cette visite étaient avant tout pédagogiques afin de rappeler les notions fondamentales concernant les aspects cliniques, épidémiologiques et réglementaires. Les principaux objectifs d'analyse étaient d'évaluer la connaissance sur la maladie, par les éleveurs d'une part et par les vétérinaires d'autre part, ainsi que de mieux comprendre les perceptions de ces acteurs sur les procédures d'intervention. Les résultats de l'analyse des visites sanitaires bovines ont permis de mettre en évidence des points pouvant faire l'objet d'actions de sensibilisation auprès des éleveurs et des vétérinaires, notamment concernant les espèces sensibles, la contagiosité et l'importance de la déclaration précoce au vétérinaire de tout signe d'alerte évocateur de la fièvre aphteuse. La clarification de la définition d'un cas suspect ainsi que la possibilité d'échange avec un confrère référent en cas de doute sur des lésions vésiculeuses ou ulcératives et la participation à des exercices pratiques pour les vétérinaires apparaissent comme souhaitables.

## Mots-clés

Visite sanitaire bovine, fièvre aphteuse, épidémiosurveillance

## Abstract

**National report on the 2015 health inspection campaign for cattle: perception and knowledge of cattle farmers and veterinarians regarding foot-and-mouth disease in metropolitan France**

*Due to concerns about the epidemiological situation in neighbouring countries and the risk of foot-and-mouth disease being reintroduced into France, the 2015 health inspection for cattle focused on this disease. The goal of the inspection was informational in nature, and concentrated on fundamental notions regarding the disease (clinical signs, epidemiology and regulation). An analysis of these inspections aimed to evaluate farmers' and veterinarians' knowledge of foot-and-mouth disease and to better understand their perceptions regarding response procedures. The results of the analysis have brought to light certain points that can be applied to activities used to raise the awareness of farmers and veterinarians, especially concerning susceptible species, infectiousness and the importance of early reporting to veterinarians of any foot-and-mouth disease warning signs. Also recommended: clarification of the definition of a suspected case, the possibility of contacting a reference veterinarian if there is any doubt regarding vesicular or ulcerative lesions, and participation of veterinarians in practical exercises.*

## Keywords

Health inspection for cattle, foot-and-mouth disease, epidemiological surveillance

Au vu d'un contexte sanitaire actuellement préoccupant vis-à-vis de la fièvre aphteuse (FA), la visite sanitaire bovine 2015 (VSB 2015) a porté sur les connaissances des éleveurs et vétérinaires vis-à-vis de cette maladie et avait pour but de rappeler les notions fondamentales concernant les aspects cliniques (signes d'appel, lésions), épidémiologiques (espèces sensibles, risque d'introduction en France et dans un élevage, vitesse de diffusion) et réglementaires (procédure en cas de suspicion de fièvre aphteuse). En effet, bien que la France soit actuellement indemne, le risque d'introduction de cette maladie sur notre territoire apparaît non négligeable car elle est toujours présente dans plusieurs régions du monde et particulièrement aux portes de l'Europe (Zanella et al., 2014). Son introduction sur le territoire engendrerait des pertes économiques importantes liées aux pertes de production, ainsi qu'aux mesures de gestion en cas d'apparition de foyers et aux restrictions commerciales (pertes indirectes).

Les objectifs de cette visite étaient principalement pédagogiques et visaient à rappeler, aussi bien aux vétérinaires qu'aux éleveurs, i) les signes d'appel de la FA et les modalités possibles de contamination, ii) l'importance de signaler rapidement un cas clinique évocateur de FA, et iii) la réglementation en vigueur en cas d'une suspicion de FA et de confirmation d'un foyer de FA en France. Une analyse d'un échantillon de questionnaires destinés aux éleveurs ainsi qu'une analyse de la

totalité des réponses des vétérinaires ayant eu au moins un élevage de leur clientèle tiré au sort a été réalisée afin d'estimer la connaissance des éleveurs sur la maladie et de décrire les actions et pratiques des éleveurs et des vétérinaires en cas de suspicion.

## Modalités de réalisation de la VSB 2015 et de sélection des questionnaires pour analyse

Les VSB 2015 devaient être réalisées par les vétérinaires sanitaires du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre 2015, dans tous les élevages bovins quelle que soit leur taille, à l'exception des centres d'insémination artificielle et des ateliers d'engraissement. Le cadre de la visite était présenté dans la note de service DGAL/SDSPA/2014-1041 du 19 décembre 2015, à laquelle étaient annexés les documents supports nécessaires à la visite (questionnaire éleveur, vade-mecum vétérinaire et fiche mémo à laisser à l'éleveur).

Sur les 188 749 visites programmées, 163 322 visites ont été réalisées (86,5 %); 9,4 % n'ont pas été réalisées pour cause de délai dépassé, 2,4 % pour cause d'absence de bovins dans l'atelier au moment de la visite, 1,3 % pour cause d'établissement fermé, et enfin 0,4 % pour

refus de visite (soit par l'éleveur, soit par le vétérinaire). Pour l'analyse des résultats, un échantillon de 6 % des questionnaires éleveur ont été tirés au sort à l'échelle de chaque département, avec pour les départements à faible densité d'élevages bovins un minimum de 30 élevages à prendre en compte.

Un questionnaire à destination des vétérinaires sanitaires a également été conçu, et a été renseigné par les vétérinaires pour lesquels au moins un élevage de la clientèle avait été tiré au sort pour l'analyse du questionnaire éleveur. Lors de leur première connexion sur le logiciel d'enquête pour renseigner les résultats du questionnaire éleveur, les vétérinaires devaient ainsi d'abord renseigner le questionnaire qui leur était destiné (étape obligatoire).

Au total, 9880 questionnaires éleveur ont été exploités et 1853 vétérinaires ont répondu au questionnaire qui leur était dédié. Onze des douze questions du questionnaire éleveur étaient à réponse obligatoire (oui/non ou sélection multiple); de même que pour le questionnaire vétérinaire, à l'exception de questions ouvertes sur le diagnostic différentiel de la FA.

## Résultats de l'analyse des questionnaires

### Aspects cliniques et lésionnels

#### Éleveurs

Après avoir débuté l'entretien de visite par une question portant sur la réaction des éleveurs face à une boiterie associée à de la salivation, les éleveurs ont été interrogés sur les aspects cliniques et lésionnels de la FA chez les bovins, sans proposition de réponse pour évaluer leurs connaissances *a priori* sur cette maladie qu'ils n'avaient pour la plupart jamais rencontrée.

Les signes cliniques ou lésions les plus cités par les éleveurs échantillonnés étaient la fièvre, l'abattement et l'anorexie, ainsi que les lésions sur le mufler (Figure 1). La salivation et la boiterie, signes cliniques très évocateurs de la fièvre aphteuse, ont également été cités par 91 % des éleveurs mais ceux-ci n'ont pas été pris en compte dans l'analyse en raison de leur mention dans l'énoncé de la question précédente.

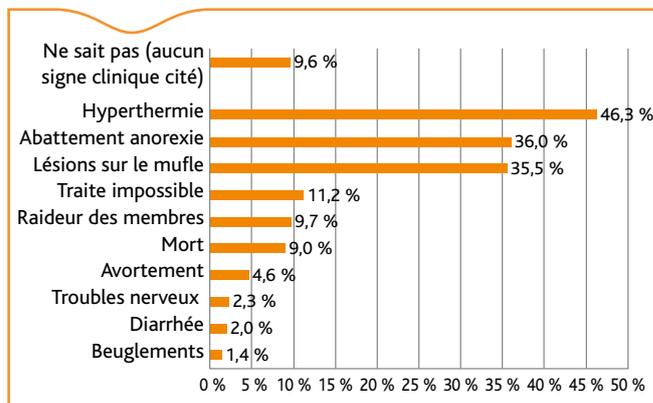


Figure 1. Signes cliniques et/ou lésions cités par les éleveurs comme étant évocateurs de la fièvre aphteuse (proportion d'éleveurs (en %) ayant cité le signe clinique ou la lésion)

#### Vétérinaires

Dans le questionnaire vétérinaire, cinq photos de lésions buccales, toutes évocatrices de FA, étaient présentées. Pour chacune d'entre elles, les vétérinaires devaient indiquer si la lésion leur faisait penser à la FA ou non. Seulement 30 % des vétérinaires ont cité la FA pour chacune des photos, un quart a cité la FA pour trois ou quatre photos et 1 % ne l'a pas cité pour aucune des photos. Les vétérinaires devaient aussi citer les autres maladies auxquelles pouvaient faire penser ces lésions buccales. Les maladies le plus souvent mentionnées étaient la diarrhée virale bovine, la fièvre catarrhale ovine, les stomatites et le coryza gangréneux, qui font bien partie du diagnostic différentiel de la FA. Ces résultats qui correspondent à un diagnostic différentiel probabiliste montrent un manque de sensibilisation vis-à-vis de la maladie qui devrait entrer systématiquement dans le diagnostic différentiel du vétérinaire.

### Aspects épidémiologiques

#### Espèces sensibles à la FA

Les éleveurs ont été interrogés sur les espèces sensibles à la FA (Figure 2). Les espèces pour lesquelles moins de la moitié des éleveurs ont donné la bonne réponse étaient les chameaux et lamas (la méconnaissance des éleveurs vis-à-vis de la sensibilité de ces deux

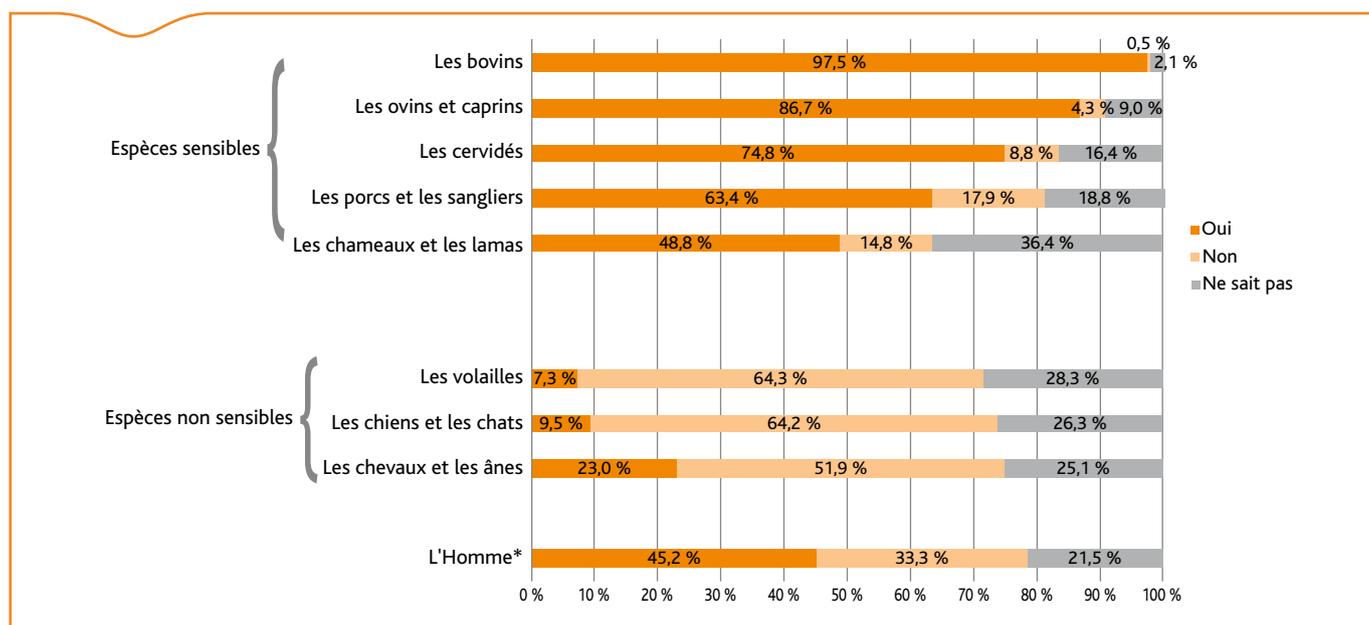


Figure 2. Espèces considérées comme sensibles/non-sensibles à la fièvre aphteuse par les éleveurs (proportion de réponses en %)

\* Quelques cas humains ont été confirmés en Europe (Bauer, 1997). Cependant, considérant l'incidence élevée de la maladie chez les animaux dans le passé et dans d'autres régions du monde, il peut être considéré que l'apparition de cas chez l'Homme est rare et sans conséquences majeures. À noter que d'autres agents pathogènes peuvent entraîner le même type de lésions chez l'Homme.

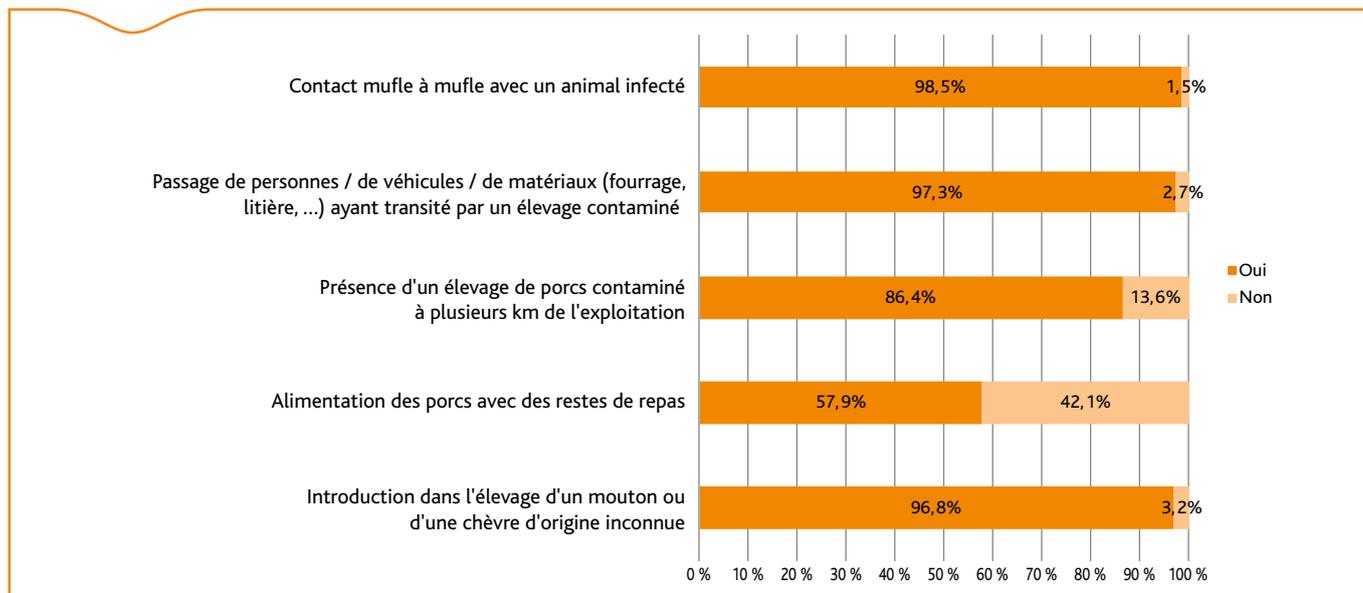


Figure 3. Proportion d'éleveurs ayant considéré des situations comme étant à risque d'introduction du virus aphteux dans une exploitation (en %)

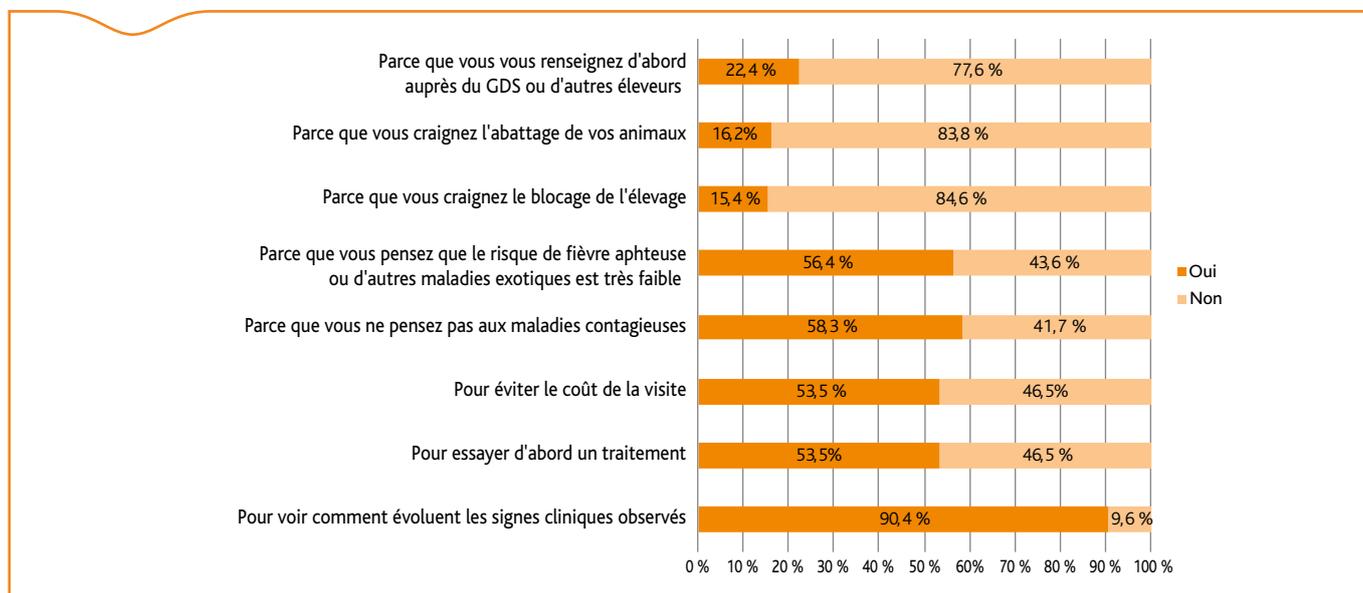


Figure 4. Réponses des éleveurs aux propositions sur les raisons qui feraient qu'ils ne contacteraient par leur vétérinaire en cas de signes cliniques non rattachables à une maladie habituelle de l'élevage (en %)

espèces peut s'expliquer par le fait que les éleveurs bovins en France en possèdent exceptionnellement), les chevaux et les ânes.

### Risque d'introduction du virus aphteux en France et dans une exploitation

Le dernier foyer de FA en France datant de 2001, les éleveurs ont été interrogés sur leur perception du risque de retour de la maladie. Un peu plus de la moitié des éleveurs échantillonnés étaient conscients du risque de réintroduction de la FA en France (65,3 %), 10,1 % jugeaient ce risque faible et un quart n'avait pas d'avis sur la question.

Les éleveurs ont ensuite été interrogés sur les situations à risque, d'après eux, d'introduction de la FA dans un élevage (Figure 3).

Les voies classiques de contamination d'un élevage par le virus de la FA (contact avec des animaux infectés, introduction d'animaux ou de personnes dans l'élevage, voisinage à risque...) sont bien connues des éleveurs, au contraire des voies plus indirectes comme l'alimentation des porcs avec des restes de repas qui n'est pas considérée comme une pratique à risque pour presque la moitié des éleveurs, considérant toutefois que seuls 11 % des éleveurs échantillonnés détiennent des porcs en plus de leurs bovins. Cependant, parmi ces éleveurs bovins détenant également des porcs, 43 % ne savaient pas que cette pratique

pouvait être une source d'introduction de la FA dans leur élevage (pratique réglementairement pourtant interdite).

### Vitesse de dissémination du virus aphteux

La FA est une maladie qui se propage rapidement. Seulement 16,8 % des éleveurs échantillonnés ont mentionné que le virus pouvait infecter entièrement leur élevage à partir d'un premier animal non détecté en quelques heures, 70,3 % ont répondu en quelques jours, 5,8 % en quelques mois, 0,2 % en quelques années et 6,9 % ont répondu qu'ils ne savaient pas.

### Réactivité en cas de symptômes et lésions évocateurs de FA

#### Éleveurs

Afin d'évaluer la connaissance par les éleveurs des critères d'alerte en cas de symptômes évocateurs de la FA et leur réactivité, ils ont été interrogés sur leur réaction face à une unique vache qui boitait et qui salivait dans leur élevage. La majorité ont répondu qu'ils appelleraient de façon systématique leur vétérinaire (58,5 %), environ un tiers ont répondu qu'ils ne l'appelleraient pas forcément (37,5 %), et une minorité (4 %) qu'ils ne l'appelleraient jamais pour l'association des signes cliniques mentionnés.

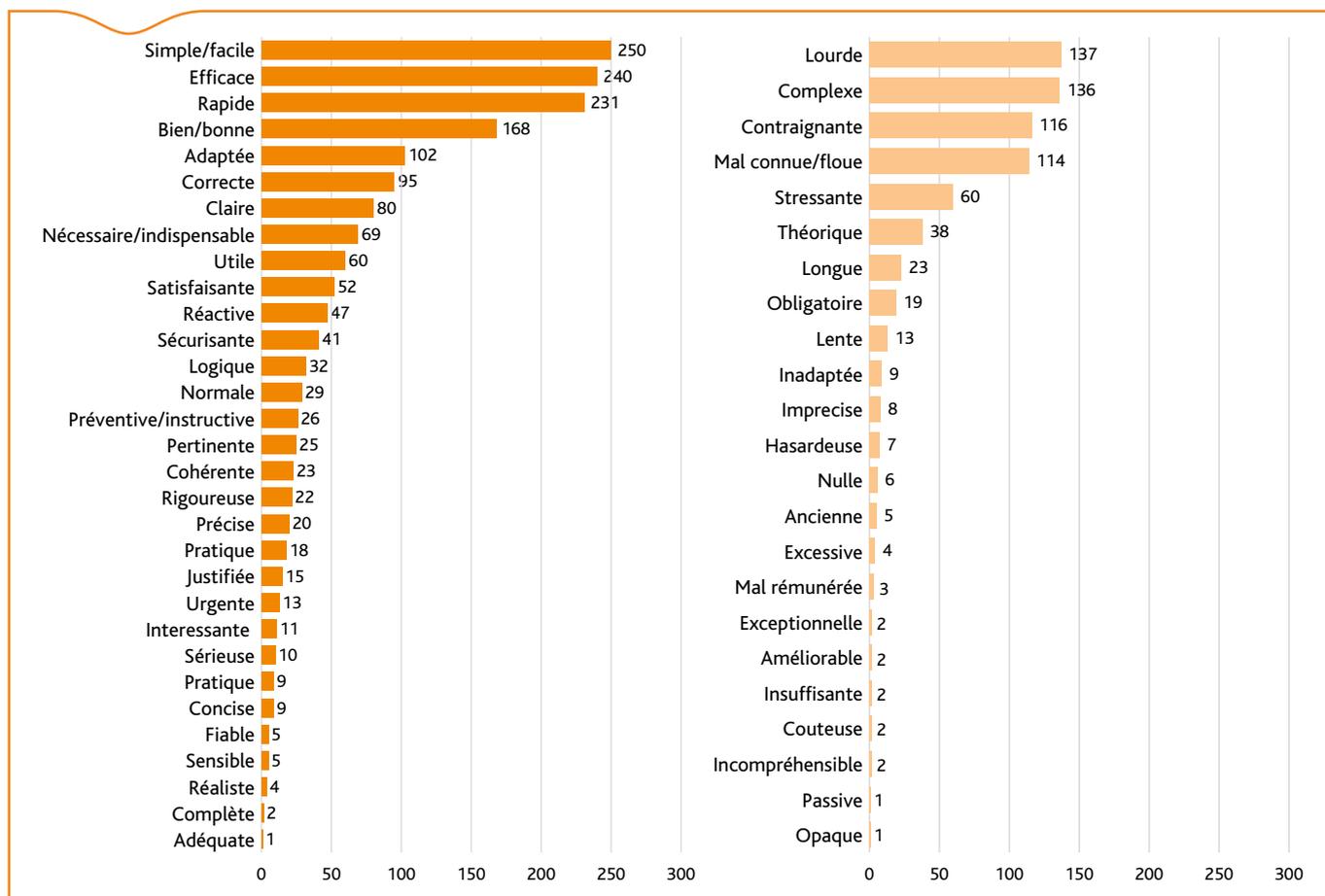


Figure 5. Nombre de citations d'adjectifs positifs (à gauche) et négatifs (à droite) par les vétérinaires pour qualifier la procédure de déclaration d'un cas suspect de fièvre aphteuse (citations libres)

Puis, afin de mieux identifier le seuil de réactivité des éleveurs, il leur était demandé à partir de combien de vaches qui boitaient et qui salivait ils appelleraient leur vétérinaire. Près de 58 % réagiraient dès la première, plus d'un tiers attendrait d'en avoir deux ou trois présentant ces symptômes pour contacter leur vétérinaire, et une minorité (5 %) attendrait qu'il y en ait plus de trois.

De manière plus générale, en cas de suspicion d'une maladie inhabituelle dans l'élevage (question non spécifique de la FA), 90,6 % des éleveurs ont déclaré contacter systématiquement et dès que possible leur vétérinaire (pourcentage toutefois probablement surestimé en raison de la relation enquêteur-enquêté). Différents freins potentiels étaient proposés aux éleveurs ayant répondu qu'ils ne contacteraient pas systématiquement et immédiatement leur vétérinaire (Figure 4). La plupart de ces éleveurs (9,4 %) ont répondu qu'ils attendraient de voir l'évolution des symptômes, ou prendraient des renseignements dans un premier temps par téléphone; certains encore pratiqueraient l'automédication. Tous ces éléments peuvent conduire à un délai supplémentaire dans l'identification d'une suspicion par le vétérinaire, pouvant avoir des conséquences importantes en cas de FA compte tenu de la contagiosité de la maladie.

#### Encadré. Procédure à suivre face à une suspicion de FA

La DDecPP doit être informée de la suspicion de FA le plus rapidement possible et décide, suite à l'avis des experts de l'Anses, de la mise en place d'un arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS) ou non.

Si l'exploitation est mise sous APMS, elle est bloquée, les animaux sont recensés, les prélèvements sont effectués et des informations sont recueillies dans le cadre d'une enquête épidémiologique.

Si les résultats de laboratoire sont positifs, la suspicion est confirmée. Un arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APDI) est pris. Les animaux sensibles sont euthanasiés, les éleveurs sont indemnisés et l'élevage est nettoyé et désinfecté avant une période de vide sanitaire.

#### Vétérinaires

Les vétérinaires ont également été interrogés sur leur réactivité en cas de signes et lésions évocateurs de FA, à partir de photos présentant des lésions buccales évocatrices. Plus de la moitié des 1853 vétérinaires interrogés (56 %) déclareraient une suspicion de FA à partir d'un seul animal présentant de telles lésions dans un élevage si l'Union européenne (UE) était indemne; et ce pourcentage atteindrait les 88 % si un foyer était déclaré au sein de l'UE. Ces résultats illustrent l'importance de maintenir un réseau de vétérinaires sanitaires informés et sensibilisés, le seuil de réactivité des vétérinaires semblant être très différent selon la situation épidémiologique de la maladie dans les pays voisins (phénomène observé également pour d'autres maladies).

## Procédure de gestion d'un cas suspect de fièvre aphteuse

#### Éleveurs

Les éleveurs ont été interrogés sur leurs connaissances concernant la suite de la procédure face à une déclaration de suspicion de FA dans leur élevage. Cette question ne faisait pas appel à saisie de réponse mais permettait au vétérinaire d'introduire le document d'information à l'éleveur dans lequel la suite de cette procédure était décrite.

#### Vétérinaires

Environ 80 % des vétérinaires interrogés ont déclaré que la définition d'un cas suspect de FA était claire pour eux (définition telle qu'existant avant le lancement de la VSB 2015).

Chaque vétérinaire pouvait également donner son avis vis-à-vis de la procédure de déclaration d'une suspicion de FA à la DDecPP, en mentionnant jusqu'à trois adjectifs dans l'espace prévu (environ vingt vétérinaires n'ont pas répondu à cette question) (Figure 5). Les adjectifs positifs cités par les vétérinaires soulignaient la « facilité », l'« efficacité » et la « rapidité » de la procédure, qui

semble ainsi globalement bien perçue, « adaptée », « claire », « correcte », et également « nécessaire », « utile », « satisfaisante », « réactive » et « sécurisante ». Cette procédure de déclaration paraît ainsi « logique », « normale », « préventive », « pertinente », « cohérente », « rigoureuse » et « précise ». Les remarques négatives citées par les vétérinaires portaient au contraire sur la « lourdeur », la « complexité » et la « contrainte » inhérentes à cette déclaration. De plus, plus d'une centaine de vétérinaires ont mentionné que la procédure était « mal connue » ou « floue », soixante qu'elle était « stressante », et une trentaine qu'elle était « théorique » et « longue ». Le nombre d'adjectifs positifs cités est globalement plus élevé que le nombre d'adjectifs négatifs (respectivement 1 714 et 710). Les perceptions des vétérinaires sur cette procédure de déclaration d'un cas suspect de FA sont donc divergentes et il faut par ailleurs signaler que les opportunités d'appliquer cette procédure sur le terrain sont rares, et que les adjectifs mentionnés par les vétérinaires concernent certainement davantage leur perception de cette procédure que leur expérience pratique.

Enfin, une grande majorité des vétérinaires interrogés (87 %) souhaiterait pouvoir échanger avec un confrère référent avant de notifier une suspicion de FA à la DDecPP, en cas de doute sur des lésions de type vésiculaire ou ulcératif. Par ailleurs, environ 82 % des vétérinaires interrogés sont prêts à participer à des cycles de formation pratique sur la FA, et 74 % à des exercices de simulation de foyers de FA au niveau départemental (tous les deux à trois ans).

## Conclusion et recommandations vis-à-vis de la sensibilisation des acteurs (éleveurs, vétérinaires) à la fièvre aphteuse

L'analyse de la VSB 2015 a permis de montrer que le rappel des notions essentielles sur la FA en ce qui concerne la clinique, l'épidémiologie et la réglementation était fondé et nécessaire, et que des actions devraient être menées dans le but d'améliorer la sensibilisation des acteurs de terrain par rapport à cette maladie. Certaines recommandations peuvent ainsi être formulées vis-à-vis de la sensibilisation à la FA des éleveurs et des vétérinaires suite à cette analyse.

Auprès des éleveurs il serait souhaitable de rappeler les signes d'appel de la FA et le fait que la maladie diffuse très rapidement; d'où l'importance de contacter son vétérinaire dès les premiers symptômes évocateurs, sans attendre leur évolution. Il faudrait également les (ré)informer sur le fait que les porcs sont sensibles à la FA, peuvent amplifier de façon importante le virus aphteux et que la loi interdit de leur donner des déchets alimentaires, pratique à risque vis-à-vis de la FA.

Ces éléments pourraient être développés dans les cursus de formation des éleveurs, ou au cours de réunions organisées par les organisations d'éleveurs ou de vétérinaires. Une participation active des éleveurs et de leur structure sanitaire aux exercices de plans d'urgence serait par ailleurs bénéfique, ainsi que la publication régulière d'articles dans la presse agricole.

En ce qui concerne les vétérinaires, la définition d'un cas suspect de FA n'était pas claire pour 20 % d'entre eux: il conviendrait de la rappeler et sûrement de la clarifier, notamment au sujet des signes évocateurs (cliniques, épidémiologiques) de la maladie.

L'apparente sous-déclaration de suspicions de FA pourrait être due, au-delà d'un manque de clarté de la définition d'un cas suspect pour certains vétérinaires, à la présence en France de maladies dont les signes cliniques peuvent évoquer la FA (ex: diarrhée virale bovine, fièvre catarrhale ovine, stomatite papuleuse, coryza gangréneux) et qui ont bien été identifiées comme faisant part du diagnostic différentiel de la FA. En cas de doute sur le bien-fondé de la suspicion, et en raison de la procédure réglementaire inhérente, une réflexion pourrait être engagée sur la mise en place d'un dispositif d'échange direct entre le vétérinaire praticien et un vétérinaire référent spécialement formé à la reconnaissance de la maladie.

La mise en place de cycles de formation pratique sur la FA (suspicion, confirmation) participerait à la (re)sensibilisation des vétérinaires à cette maladie exotique. Par ailleurs, ce type de formation pratique permettrait de rappeler au vétérinaire sanitaire qu'il joue pour la FA, comme pour les autres dangers sanitaires réglementés, un rôle de sentinelle au côté des éleveurs.

Au-delà de la seule FA, la complexité de la surveillance des maladies exotiques et l'impérieuse nécessité de maintenir la vigilance des acteurs de terrain justifient d'une réflexion collégiale sur les pistes d'amélioration de leur surveillance.

## Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des éleveurs, des vétérinaires et des DDecPP qui ont participé à la VSB 2015.

## Références bibliographiques

- Bauer, K. 1997. Foot- and-mouth disease as zoonosis. *Arch Virol Suppl.* 13: 95-7. DOI:10.1007/978-3-7091-6534-8\_9
- Note de service DGAL/SDSPA/2014-1041 du 19 décembre 2014 portant sur la campagne 2015 des visites sanitaires bovines [www.agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/vsb\_2015\_.pdf]
- Zanella, G., Bakkali-Kassimi, L., Zientara, S., 2014. Faits marquants récents sur la fièvre aphteuse dans le monde en 2013 et 2014. *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 63: 28-29. 62, 20-21.

# L'infection par le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP) entraîne chez le Porc une infection chronique par le virus de l'hépatite E

Nicolas Rose (1)\*, Morgane Salines (1), Mathieu Andraud (1), Olivier Bourry (2), Elodie Barnaud (3), Nicole Pavio (3)

\*Auteur correspondant: nicolas.rose@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité d'Épidémiologie et bien-être du Porc, Ploufragan, France.

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Virologie, immunologie porcines, Ploufragan, France.

(3) Anses, Laboratoire de santé animale UMR 1161 Virologie, Anses-ENVA-Inra, Maisons-Alfort, France.

## Résumé

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'une hépatite aiguë chez l'Homme. Dans les pays industrialisés, l'augmentation de la fréquence de cas sporadiques, suite à la consommation de viande de porc insuffisamment cuite, pose la question du risque de transmission zoonotique à partir du réservoir porcin. L'impact de l'infection par le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP), virus immunosuppresseur fortement prévalent en élevage porcin, sur celle du VHE chez le Porc a été étudié: i) à partir de données observationnelles de suivis de cohortes en élevages infectés par le VHE et ii) par l'intermédiaire d'un essai de co-infection expérimentale VHE/SDRP de porcs EOPS (exempts d'organismes pathogènes spécifiés). Les résultats obtenus dans ces deux études montrent un impact important du virus du SDRP sur la dynamique d'infection du VHE et une potentielle chronicité chez des porcs co-infectés, augmentant le risque de présence du virus dans le foie des porcs abattus. La co-infection ou infection préalable par le virus du SDRP retarde l'excrétion du VHE et augmente la durée d'excrétion, la charge virale excrétée et donc la transmission du virus au sein de la population. Une telle synergie pourrait expliquer la persistance enzootique du VHE en élevage et favoriser une excrétion tardive chez les porcs charcutiers jusqu'à l'abattage.

## Mots-clés

Virus de l'hépatite E, zoonose, porc, virus du SDRP

## Abstract

**The infection by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) virus promotes chronic Hepatitis E virus infection in pigs.**

*Hepatitis E Virus (HEV) is responsible for acute hepatitis in humans. In industrialized countries, the increase of sporadic cases frequently due to the consumption of raw pork meat raises the question of zoonotic transmission originating in the pig reservoir. The impact of PRRSV, an immunosuppressive virus that is highly prevalent in pig populations, on HEV infection has been studied based on: i) observational cohort data on HEV-infected farms, and ii) a PRRSV/HEV co-infection experiment using SPF (specific pathogen-free) pigs. The results obtained from both studies showed that PRRSV had a major impact on the dynamics of HEV infection and potential chronic infections in co-infected pigs, increasing the risk of HEV detection in the liver at the time of slaughter. Co-infection or previous infection by PRRSV postponed HEV shedding and increased its duration as well as the viral load shed, and consequently increased transmission of the virus within the population. This type of synergic association could explain the enzootic persistence of HEV in pig farms and increase the likelihood of late shedding in finishing pigs up through slaughter.*

## Keywords

Hepatitis E virus, Zoonosis, Pig, PRRS virus

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un virus à ARN simple brin de polarité positive, non enveloppé, agent étiologique d'une hépatite aiguë chez l'Homme. Transmis principalement par voie oro-fécale, il est généralement responsable de signes cliniques similaires à ceux de l'hépatite A mais en moyenne plus sévères (Emerson and Purcell, 2003). Des formes chroniques peuvent également être observées, notamment chez des individus sous traitement immunosuppresseur (Gerolami et al., 2008; Izopet et al., 2009; Kamar et al., 2008). En Europe, l'hépatite E est aujourd'hui considérée comme une zoonose émergente (Adlhoch et al., 2016). Avec plus de 1800 cas humains autochtones annuels recensés en France par le centre national de référence (CNR) en 2013 et en 2014, une origine alimentaire est le plus souvent suspectée même si l'origine exacte de l'infection n'est identifiée avec certitude que dans un nombre limité de cas. Les produits à base de porc, et notamment ceux contenant du foie cru, consommés crus ou peu cuits, constituent les aliments les plus à risque (Pavio et al., 2014; Renou et al., 2014). Il est établi que la population porcine domestique constitue un des principaux réservoirs du VHE dans la plupart des pays producteurs de porcs. En France, le virus circule dans plus de 65 % des élevages et 4 % des porcs en moyenne sont porteurs du virus au niveau du foie au moment de l'abattage (Rose et al., 2011). L'existence d'une virémie, le plus souvent transitoire, peut cependant conduire à la détection du virus au niveau du muscle. En France, la prévalence de porcs virémiques entrant dans la chaîne alimentaire a été estimée extrêmement basse lors de l'enquête nationale de prévalence réalisée en 2009 (0,4 % des porcs abattus en moyenne contre 4 % de foies positifs (Rose et al., 2011)). Au Royaume-Uni, une étude récente fait cependant état d'une

prévalence de porcs virémiques beaucoup plus élevée (3 % (Grierson et al., 2015)).

En élevage, même si la prévalence de porcs excréteurs est en moyenne maximale entre 90 et 120 jours d'âge selon les études, différentes dynamiques d'infection inter-individuelles et inter-élevages sont observées et sont en lien direct avec la probabilité de contamination des foies des porcs abattus (Rose and Pavio, 2014). Ces variations inter-élevages de la dynamique d'infection du VHE ne sont pas entièrement expliquées à ce jour, de même que certaines excrétions très prolongées (jusqu'à 60 jours) décrites dans la littérature (Kanai et al., 2011) qui contrastent avec les observations expérimentales en conditions contrôlées (une 10<sup>aine</sup> de jours (Andraud et al., 2013)). Certains co-facteurs infectieux pourraient ainsi favoriser l'infection VHE, voire entraîner une forme de chronicité à l'instar de ce qui est observé chez l'Homme.

Le virus du SDRP (syndrome dysgénésique et respiratoire porcin) est extrêmement répandu dans les régions où la population porcine est très dense (environ 60 % de prévalence en Bretagne par exemple). Ce virus a des caractéristiques immunosuppressives qui suggèrent une interaction possible avec le VHE. Il existe peu de données sur l'association potentielle de ces deux virus, essentiellement des découvertes *post-mortem*, avec mise en évidence de la présence des deux virus, sans pour autant apporter la preuve de leur implication directe dans le tableau clinique observé (de Deus et al., 2007; Mao et al., 2013). Une autre étude n'a cependant pas mis en évidence d'association particulière entre la présence de VHE et d'autres infections dont le virus du SDRP (Martelli et al., 2010).

Les travaux décrits dans le présent article associent deux études: i) un suivi de cohorte en élevages infectés par le VHE et le virus du SDRP, ayant pour objectif d'identifier d'éventuels liens entre la dynamique d'infection SDRP et la durée d'excrétion du VHE, ii) une étude expérimentale sur la co-infection des deux virus destinée à quantifier l'impact de l'infection par le virus du SDRP sur l'excrétion du VHE et sa transmission à des porcs contacts.

## Matériel et méthodes

### Étude de cohorte en élevages infectés

#### Protocole d'étude

L'étude longitudinale a été conduite dans trois élevages porcins de type naisseur-engraisseur identifiés comme étant infectés par le VHE d'après les résultats d'une enquête de prévalence antérieure (Rose *et al.*, 2011). Ces trois élevages étaient également infectés par le virus du SDRP avec une présence avérée d'une circulation active du virus chez les porcs en croissance. Au sein des élevages sélectionnés, trois bandes successives de porcelets ont été suivies. Chaque bande comportait un total de 800, 322 et 265 porcelets pour les élevages A, B et C respectivement. Pour chaque bande, un échantillon représentatif de 40 porcelets a été constitué à la naissance par tirage au sort parmi les différentes portées de la bande, soit 120 porcelets par élevage et un total de 360 porcs (3 élevages) ont ainsi été suivis individuellement de la naissance à l'abattage.

En élevage, des prélèvements individuels sanguins et rectaux de matières fécales ont été effectués à 1, 6, 10, 14, 18 et 22 semaines d'âge sur les animaux suivis. À l'abattoir, les porcs suivis individuellement en élevage ont été soumis à des prélèvements de sang au poste de saignée, puis de foie sur la chaîne. La détection des ARN du virus de l'hépatite E dans les matières fécales a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR en temps réel (Barnaud *et al.*, 2012; Jothikumar *et al.*, 2006). Les anticorps anti-VHE ont été détectés à l'aide d'un test commercial validé pour les analyses vétérinaires (HEV ELISA 4.0v - MP Diagnostics, Illkirch, France). Les anticorps dirigés contre le virus du SDRP ont été détectés à l'aide du kit ELISA HerdChek\* PRRS X3 IDEXX (Liebefeld-Bern, Suisse) selon les instructions du fabricant. Pour des raisons logistiques, les analyses sérologiques spécifiques du virus du SDRP n'ont été effectuées que sur la moitié des animaux (20 animaux par bande, soit 180 individus au total).

#### Analyse statistique

L'âge à la séroconversion et à l'excrétion du VHE ainsi que la durée de la période infectieuse ont été estimés par une analyse de survie. Un modèle de survie à risques proportionnels (modèle de Cox) a été utilisé afin d'évaluer l'impact de la chronologie des infections entre le VHE et le virus du SDRP sur l'âge à l'excrétion et à la séroconversion vis-à-vis du VHE. L'effet élevage a été incorporé dans le modèle en tant qu'effet aléatoire (modèle de fragilité de Cox). L'impact de la chronologie des infections sur la durée de la période infectieuse VHE a été exploré par une analyse de survie paramétrique. La chronologie des infections a été estimée de la manière suivante:

- la date de première excrétion du VHE étant connue, la date de l'infection par le VHE a été estimée en considérant que le délai infection – excrétion était de 25 jours, conformément au délai moyen décrit dans la littérature (Satou and Nishiura, 2007),
- la date de séroconversion vis-à-vis du virus du SDRP étant connue, la date de l'infection par ce dernier a été estimée en considérant que le délai infection – séroconversion était de sept jours, conformément au délai moyen décrit dans la littérature (Diaz *et al.*, 2005).

Les effets du niveau de l'immunité maternelle anti-VHE, de l'élevage d'origine des animaux et de l'interaction entre l'élevage et la chronologie des infections ont également été testés dans le modèle.

L'influence de la chronologie des infections entre le VHE et le virus du SDRP sur la contamination des foies au stade de l'abattage a été étudiée par un modèle de régression logistique, avec comme variable

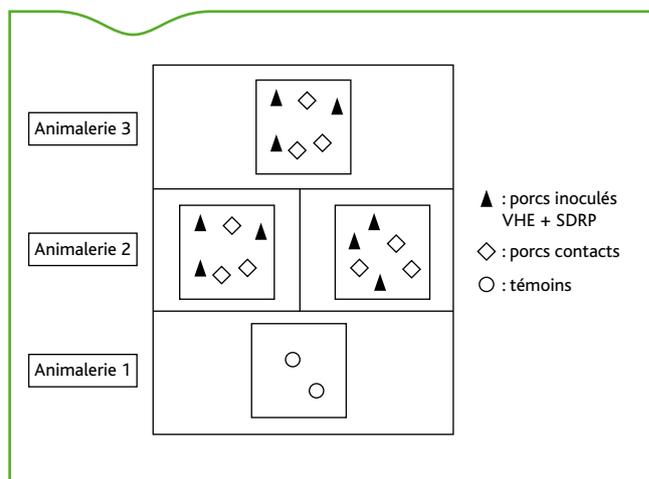


Figure 1. Schéma du dispositif expérimental de co-infection VHE/SDRP

à expliquer le statut VHE des foies à l'abattoir, et comme variable explicative la chronologie des infections virus SDRP/VHE. Les effets du niveau de l'immunité maternelle anti-VHE, de l'élevage d'origine des animaux et de l'interaction entre l'élevage et la chronologie des infections ont également été testés dans le modèle.

### Étude expérimentale de co-infection VHE/ virus SDRP

#### Protocole expérimental

L'expérimentation a été conduite au sein des animaleries protégées du laboratoire de l'Anses de Ploufragan, niveau 3 de biosécurité sous air filtré. Vingt porcs EOPS âgés de cinq semaines ont été utilisés; ils étaient exempts du VHE et du virus du SDRP et n'avaient aucun anticorps maternel spécifique de ces virus. Dix-huit porcelets ont été répartis aléatoirement (stratification en fonction du sexe, de la portée et du poids) dans trois parcs contenant chacun six animaux: trois porcs inoculés par le VHE et le virus du SDRP, et trois animaux contacts. Deux porcelets ont été utilisés comme témoins non infectés (Figure 1).

À J0, trois porcs par parc ont été inoculés: i) par voie orale (sondage œsophagien) avec un inoculum de VHE génotype 3 titrant à  $10^8$  génomes équivalents (GE) sous un volume de 10 mL, préparé selon le protocole décrit par Andraud *et al.* (2013), et ii) par voie intranasale avec un inoculum d'une souche de virus du SDRP de génotype 1, sous-type 1 (PRRS/FR/29/24/1/2005, souche FINISTÈRE) titrant à  $5 \times 10^5$  DCP<sub>50</sub> (dose cytopathogène 50) pour un volume de 2,5 mL par narine.

Les matières fécales des animaux ont été prélevées individuellement trois fois par semaine dès J-3 et jusqu'à 49 jours post-infection (JPI). Une prise de sang a été réalisée avant inoculation puis une fois par semaine. La quantification des ARN du virus de l'hépatite E dans les matières fécales a été réalisée par une RT-PCR quantitative en temps réel (Barnaud *et al.*, 2012). Les résultats sont exprimés en nombre de copies de génome par gramme de fèces (GE/g). La détection des anticorps dirigés contre le VHE a été réalisée avec le kit HEV ELISA 4.0v (MP Diagnostics, Illkirch, France) (Barnaud *et al.*, 2012). La détection des ARN du virus du SDRP dans le sérum a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR en temps réel (Charpin *et al.*, 2012).

#### Analyses statistiques et modèles

##### Influence de l'infection SDRP sur les paramètres de l'infection par le VHE

Les durées d'excrétion du VHE avec ou sans infection SDRP associée ont été estimées et comparées par un modèle de survie paramétrique. L'influence du délai nécessaire à la production d'anticorps anti-VHE sur la durée de la période infectieuse a été étudiée par l'intermédiaire d'un modèle semi-paramétrique de Cox. La réponse immunitaire humorale a été qualifiée d'absente ou de tardive si le délai infection-séroconversion était supérieur ou égal à 25 JPI et de précoce s'il était strictement inférieur à 25 JPI (Satou and Nishiura, 2007).

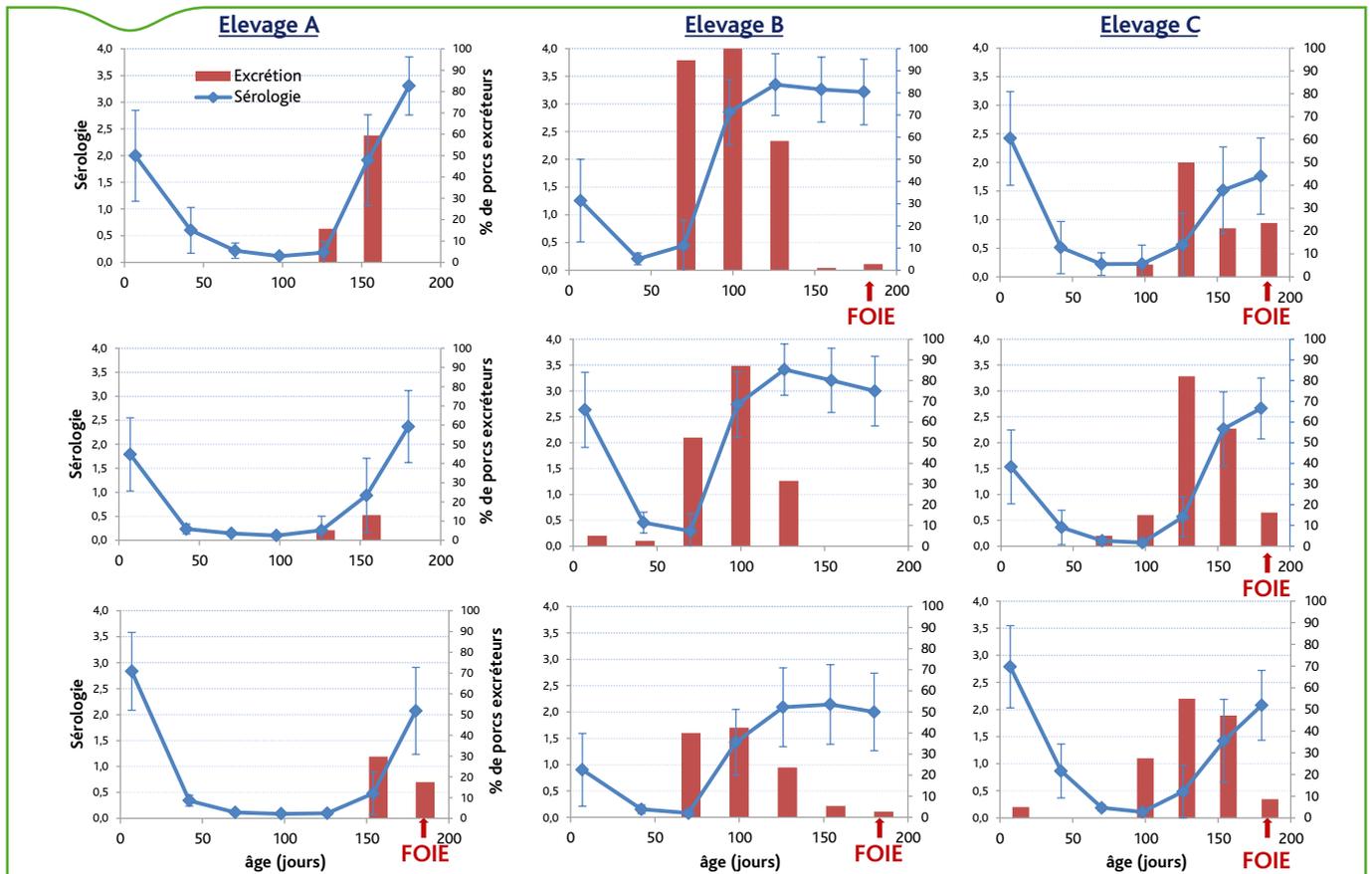


Figure 2. Dynamiques d'infection par le VHE observées dans chaque élevage suivi (3 bandes suivies par élevage)

### Influence de l'infection SDRP sur l'excrétion et la transmission du VHE

Un modèle linéaire mixte prenant en compte des données répétées dans le temps a été utilisé afin d'évaluer la différence entre les charges virales VHE selon le statut des animaux vis-à-vis du virus du SDRP.

La transmission du VHE aux porcs contacts a été modélisée selon deux voies principales: i) la transmission due aux contacts directs entre les porcs infectés et les porcs sensibles, et ii) la transmission indirecte oro-fécale à partir d'un réservoir environnemental au sein d'une même case. Le modèle utilisé est similaire à celui utilisé pour une expérience de transmission du VHE sans co-infection (Andraud *et al.*, 2013). Les paramètres de transmission directe et indirecte, respectivement  $\beta_w$  et  $\beta_E^{(w)}$ , la durée de la période de latence de chaque individu contact et le taux de clairance du virus (qui représente l'élimination des matières fécales au travers du caillebotis de la case et la destruction du virus dans l'environnement) ont été estimés par une approche bayésienne.

## Résultats

### Étude de cohorte en élevages infectés

#### Description des dynamiques d'infection observées

Des profils d'infection très différents ont été mis en évidence selon les élevages. Dans l'élevage A, l'excrétion du VHE a été très tardive et de courte durée alors qu'elle a été relativement précoce et parfois très longue chez certains animaux dans les deux autres élevages (élevages B et C) (Figure 2). Dans ces deux élevages, des porcelets étaient excréteurs dès la phase de maternité. La prévalence maximale d'excrétion atteinte était aussi très variable selon les élevages et les bandes (jusqu'à 100 % dans la bande 1 de l'élevage B contre 10 % dans la bande 2 de l'élevage A). Les plus fortes proportions de foies positifs (jusqu'à 23 %) ont été atteintes dans l'élevage C associées à un pic d'excrétion atteint après 120 jours d'âge. L'analyse de ces données individuelles montre qu'il n'existe pas de relation stricte

entre la contamination des foies et l'âge à la première excrétion décelée, mais que la probabilité d'infection des foies augmente considérablement lorsque le délai infection-abattage est inférieur à 40 jours (OR=3,5 ; IC<sub>95%</sub>[1,4-10,9]).

#### Effet de la chronologie de l'infection SDRP sur les caractéristiques de l'infection par le VHE

Les animaux préalablement infectés par le virus du SDRP ont une excrétion et une séroconversion vis-à-vis du VHE significativement plus tardives que les animaux qui ne se sont pas infectés par le virus du SDRP ou qui se sont infectés après leur infection par le VHE (Hazard Ratio (HR) = 0,49, p-value < 0,01 et HR = 0,46, p-value < 0,01 respectivement) (Figure 3). Les effets de l'immunité maternelle anti-VHE, de l'élevage et de l'interaction entre l'élevage et la chronologie des deux infections ne sont pas significatifs. La durée moyenne de la période infectieuse a été estimée à 27,6 jours [24,4; 31,2] par un modèle de survie paramétrique (distribution de type Weibull) pour l'ensemble des animaux suivis. Cependant, la durée de la période d'excrétion n'était pas significativement associée à une infection préalable par le virus du SDRP (p-value > 0,05).

#### Effet de la chronologie de l'infection SDRP sur la détection du VHE à l'abattoir à partir des foies

Une infection par le virus du SDRP préalable à l'infection VHE est significativement associée à une probabilité plus élevée que les foies soient positifs à l'abattoir (Odds Ratio (OR) = 2,67, p-value = 1,04\*10<sup>-2</sup>). Les effets de l'immunité maternelle anti-VHE, de l'élevage et l'interaction entre l'élevage et la chronologie des deux infections ne sont pas significatifs.

### Étude expérimentale de co-infection VHE/SDRPv

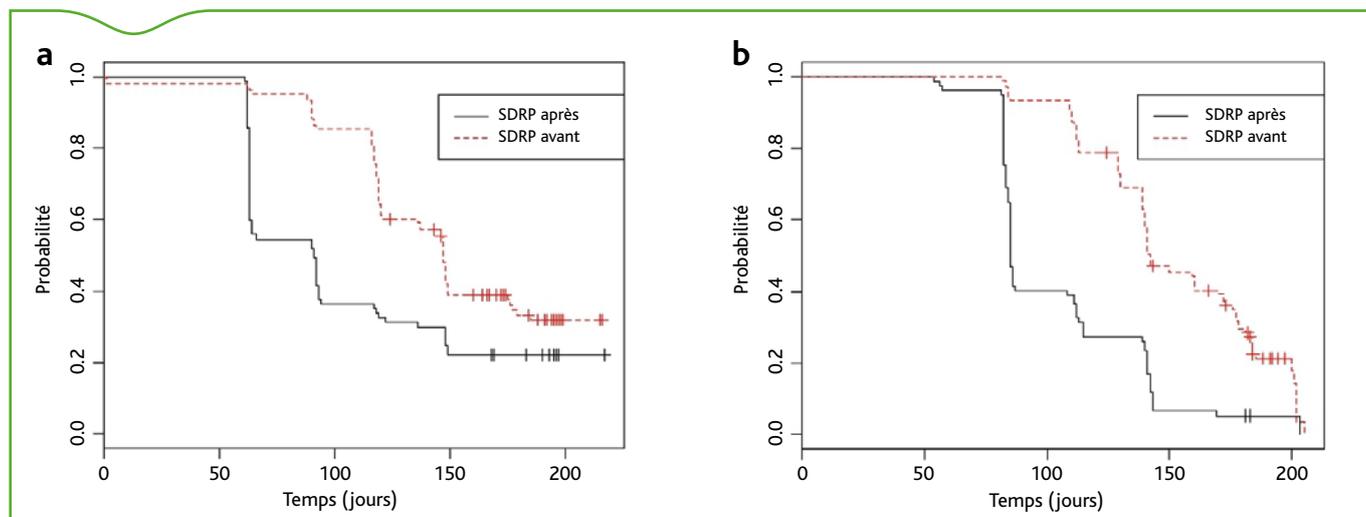
#### Description des données d'infection

L'ensemble des animaux inoculés et contacts sont virémiques pour le virus du SDRP avant la première excrétion du VHE détectée excepté pour deux porcs contacts (données non montrées). L'ensemble des individus exposés au VHE, contacts et inoculés, excrètent le VHE

**Tableau 1. Résultats de la détection du VHE par RT-PCR quantitative sur les échantillons individuels de matières fécales (log[nombre de génomes équivalents/g])**

|        | JPI     | J2 | J4 | J7 | J9   | J11 | J14  | J16  | J18  | J21  | J23  | J25  | J28  | J32  | J35  | J39  | J42  | J44  | J46  | J49  | FOIE |
|--------|---------|----|----|----|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Case 1 | Témoin  | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
|        | Témoin  | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Case 2 | Infecté | -  | -  | -  | 5,03 | 0*  | 4,35 | 5,35 | 6,09 | 6,42 | 7,14 | 7,13 | 6,78 | 6,92 | 6,88 | 7,47 | 7,65 | 6,90 | 6,94 | 7,17 | 6,16 |
|        | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | 4,35 | 5,24 | 6,28 | 6,83 | 7,35 | 7,55 | 7,88 | 8,12 | 8,00 | 7,83 | 7,18 | 8,04 | 7,60 | 7,77 | 6,27 |
|        | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | 5,18 | 6,18 | 6,77 | 7,06 | 7,11 | 7,61 | 7,60 | 7,97 | 7,63 | 6,70 | 7,86 | 7,81 | 6,01 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | 5,43 | 6,06 | 7,25 | 7,19 | 7,57 | 7,28 | 7,15 | 7,73 | 7,69 | 5,94 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 5,46 | 6,57 | 6,55 | 5,80 | 5,18 | 5,69 | 6,07 | 5,54 | -    |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | 2,25 | 5,95 | 6,16 | 6,48 | 5,73 | 6,08 | 6,63 | 6,28 | 6,08 | -    |
| Case 3 | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | -    | 5,19 | 6,04 | 6,20 | 6,45 | 7,22 | 7,43 | 7,94 | 7,80 | 6,65 | 6,59 | 7,21 | 6,00 | 5,16 | 3,19 |
|        | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | -    | 5,34 | 5,74 | 6,84 | 7,27 | 7,18 | 7,36 | 7,19 | 7,25 | 7,41 | 6,90 | 8,14 | 7,29 | 6,83 | 6,38 |
|        | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | 5,01 | 5,84 | 8,70 | 7,59 | 7,62 | 7,60 | 7,83 | 8,10 | 8,14 | 7,77 | 7,91 | 8,12 | 7,05 | 6,69 | 5,56 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | 6,22 | 0*   | 6,16 | 6,61 | 6,69 | 0*   | 7,07 | 7,40 | 7,74 | 6,05 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 6,26 | 6,73 | 6,92 | 6,65 | 7,92 | 7,16 | 6,72 | 6,23 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 6,17 | 6,86 | 7,29 | 7,48 | 7,64 | 8,40 | 8,49 | 6,54 |
| Case 4 | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | -    | 5,37 | 5,49 | 6,59 | 6,83 | 6,90 | 7,02 | 7,62 | 7,42 | 7,63 | 7,18 | 7,46 | 7,20 | 8,32 | 6,51 |
|        | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | -    | 5,78 | 5,98 | 6,61 | 6,51 | 7,19 | 7,48 | 7,25 | 7,26 | 7,27 | 7,93 | 7,27 | 7,76 | 4,31 | -    |
|        | Infecté | -  | -  | -  | -    | -   | 4,91 | 5,64 | 6,35 | 7,06 | 7,35 | 7,24 | 7,37 | 7,56 | 7,50 | 7,02 | 6,64 | 7,61 | 7,16 | 7,75 | 5,98 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 4,94 | 5,31 | 6,37 | 5,53 | 5,61 | 5,70 | 5,87 | -    |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 6,92 | 7,18 | 7,93 | 0*   | 7,16 | 7,94 | 8,01 | 5,77 |
|        | Contact | -  | -  | -  | -    | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 6,12 | 5,93 | 6,05 | 0*   | 4,64 | 5,89 | 5,92 | -    |

JPI : jours post-infection  
\* : testés en duplicat



**Figure 3. Effet de l'infection par le virus du SDRP sur l'âge à l'excrétion (a) et à la séroconversion (b) vis-à-vis du VHE (180 individus suivis individuellement) : courbes de survie**

jusqu'à la fin de l'essai (49 JPI) (Tableau 1). À l'autopsie, quatorze foies sur dix-huit sont positifs en RT-PCR VHE. Seuls quatre individus inoculés sur neuf, et sept individus contacts sur neuf ont présenté une réponse immunitaire humorale anti-VHE (entre 35 et 49 JPI, et 42 et 49 JPI respectivement, données non montrées).

La durée de la période de latence a été estimée à 12,9 jours [12,8; 14,4] pour les porcs inoculés et 13,4 jours [8,6; 17,1] pour les porcs contacts. La durée de la période infectieuse a été estimée à 48,6 jours [27,9; 84,6] (Tableau 2). La durée moyenne nécessaire à la production d'anticorps spécifiques du VHE a été estimée à 43,1 jours [35,7; 52,2] lors de co-infection par le virus du SDRP et à 26,3 jours [23,5; 29,5] en l'absence de co-infection (Tableau 2). Une réponse immunitaire humorale tardive ou absente (>25 JPI) était associée à une augmentation de la durée d'excrétion et donc de la période infectieuse (la fin d'excrétion étant retardée, Hazard Ratio = 0,35,  $P < 0,01$ ).

### Quantification de l'excrétion et de la transmission du VHE > Excrétion du VHE

Chez les individus inoculés, l'infection par le virus du SDRP est significativement associée à une augmentation de la charge en VHE excrétée ( $P = 0,05$ , Figure 5), comparativement à l'infection par le VHE seul (Andraud *et al.*, 2013). L'interaction entre le temps et l'infection par le virus du SDRP est significative et positive, *i.e.* l'impact du virus du SDRP augmente au cours du temps ( $p = 0,04$ ). En revanche, l'effet de l'infection par le virus du SDRP sur les charges VHE excrétées n'est pas statistiquement significatif chez les individus contacts ( $p > 0,05$ , données non montrées).

### > Paramètres de transmission du VHE

Les résultats montrent que, dans ces conditions expérimentales, un porc excréteur de VHE est capable de transmettre l'infection à 0,70 porc par jour, par contact direct ( $\beta_w = 0,70 [1,18 \cdot 10^{-3}; 3,67]$ ) (Tableau 2).

**Tableau 2.** Paramètres de transmission estimés au cours de l'essai expérimental de co-infection VHE/SDRP et comparaison avec les données d'infection VHE seul

|  | VHE + virus du SDRP   | VHE seul*  |
|--|---|--|
| Période de latence (jours)                               | 13,4 [8,6 ; 17,1]   | 7,1 [3,2 ; 12,3]   |
| Période infectieuse (jours)                              | 48,6 [27,9 ; 84,6]  | 9,7 [8,2 ; 11,2]   |
| Transmission directe [ $\beta_w$ ] (jour <sup>-1</sup> ) | 0,70 [1,2*10 <sup>-3</sup> ; 3,67]                                      | 0,15 [0,03 ; 0,31]   |
| Transmission indirecte [ $\beta_E(w)$ ] (g/GE/j)         | 6,6*10 <sup>-6</sup><br>[1,4*10 <sup>-10</sup> ; 1,3*10 <sup>-4</sup> ] | 2,0*10 <sup>-6</sup><br>[1,1*10 <sup>-7</sup> ; 7,0*10 <sup>-6</sup> ] |
| Délai de séroconversion (jours)                          | 43,1 [35,7 ; 52,2]  | 26,3 [23,5 ; 29,5]   |

\*d'après Andraud et al. (2013)

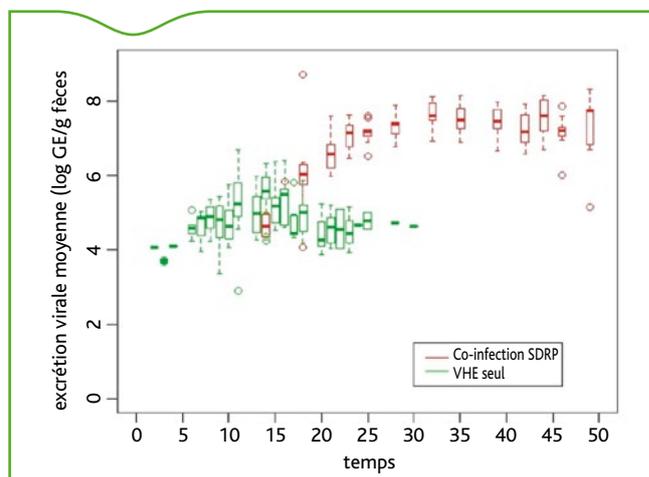
Le taux de transmission indirecte au sein d'une case peut être considéré comme le nombre moyen d'animaux qui peuvent être infectés par une seule particule virale présente dans l'environnement ( $\beta_E^{(w)} = 6,59*10^{-6}$  g/GE/jour [1,43\*10<sup>-10</sup> ; 1,27\*10<sup>-4</sup>]) (Tableau 2). Autrement dit, l'inverse de  $\beta_E^{(w)}$  correspond au nombre moyen de particules virales par gramme de fèces dans l'environnement, nécessaires pour infecter un animal par jour, soit 1,51\*10<sup>5</sup> GE/g/jour [7,86\*10<sup>3</sup> ; 7,00\*10<sup>9</sup>].

## Discussion

L'impact d'une co-infection par le virus du SDRP sur l'infection, l'excrétion et la transmission du virus de l'hépatite E, a été étudié, d'une part en comparant des données observationnelles obtenues en conditions réelles dans des élevages infectés par ces deux virus et d'autre part en situation expérimentale. Les deux approches complémentaires suggèrent que l'infection préalable par le virus du SDRP modifie le processus infectieux du VHE en retardant l'excrétion, mais en augmentant quantitativement la charge virale excrétée au niveau individuel, ainsi que la durée d'excrétion favorisant ainsi sa propagation et sa persistance dans la population.

Les données issues d'élevages suggèrent que la séquence des événements entre les deux infections joue un rôle important. Ainsi, une infection préalable par le virus du SDRP retarde l'âge à l'excrétion du VHE et est associée à une séroconversion retardée. Il est également montré à partir de ces mêmes données que la probabilité de détecter du VHE au niveau du foie des animaux abattus est aussi significativement augmentée chez ces porcs préalablement infectés par le virus du SDRP. Ce délai d'excrétion observé à partir des données de terrain est cohérent avec la latence augmentée mesurée dans l'essai expérimental (13,4 jours dans l'essai de co-infection, contre 7,1 jours lors d'infection par le VHE seul). Une activation de la réponse immunitaire innée par le virus du SDRP, retardant ainsi l'excrétion du VHE pourrait expliquer l'allongement de la durée de la période de latence observée.

La durée d'excrétion du VHE estimée à partir des données terrain n'était pas significativement différente selon la séquence d'infection avec le virus du SDRP (27 jours en moyenne) contrairement à l'augmentation considérable observée au cours de l'essai expérimental: 48,6 versus 9,7 jours pour l'infection VHE simple, soit un allongement d'un facteur 5. Ces données se rapprochent des données de terrain de la littérature (27 jours [20 ; 39]) (Backer et al., 2012)). Dans l'essai décrit par Bouwknegt et al. (2008), la période infectieuse a été évaluée entre 13 et 49 jours, les animaux utilisés provenant d'un élevage conventionnel de haut niveau sanitaire a priori indemne de SDRP. Les résultats de l'essai réalisé montrent que l'excrétion virale des individus inoculés est quantitativement plus importante lors de co-infection par le virus du SDRP. Le taux de transmission directe est 4,7 fois plus élevé lors de co-infection (0,70 par jour contre 0,15 avec le VHE seul (Andraud et al., 2013)). Ainsi, lors de co-infection par le virus du SDRP, la voie de transmission directe joue un rôle plus important dans la transmission du VHE, ce qui peut être mis en lien avec l'excrétion individuelle quantitativement plus importante. Le taux de transmission environnementale au sein d'une case (i.e. le nombre d'animaux infectés par particule virale présente dans l'environnement) est estimé 3,3 fois



**Figure 5.** Distribution des charges génomiques en VHE excrétées au cours du temps, chez les porcs inoculés par le VHE co-infectés ou non par le virus du SDRP

plus élevé lors de co-infection qu'en l'absence. Autrement dit, 3,3 fois moins de particules virales sont suffisantes pour infecter un animal en présence du virus du SDRP. Dans un modèle construit à partir d'un essai d'infection VHE par voie intraveineuse, Bouwknegt et al. (2011) rapportent que la dose orale de VHE pour laquelle la probabilité d'infection est égale à 50 % serait de 1,4\*10<sup>6</sup> GE/g, ce qui est dix fois supérieur à la dose nécessaire estimée dans notre étude. Ces données confortent l'hypothèse d'une plus grande sensibilité vis-à-vis du VHE chez des porcs co-infectés par le virus du SDRP.

En conditions réelles, la séroconversion à l'égard du VHE est significativement retardée chez les animaux préalablement infectés par le virus du SDRP, ce qui est corroboré par une durée de 43,1 jours pour observer une séroconversion chez les animaux co-infectés en situation expérimentale versus 26,3 jours en moyenne chez des porcs infectés par VHE seul. Ce défaut de réponse sérologique est significativement associé à l'allongement de la durée de la période infectieuse lors de co-infection par le virus du SDRP et pourrait donc expliquer la présence de particules virales dans le foie des porcs abattus.

## Conclusion

Les résultats obtenus dans ces deux études montrent un impact important du virus du SDRP sur la dynamique d'infection du VHE et une potentielle chronicité chez des porcs co-infectés, augmentant le risque de présence du virus dans le foie des porcs abattus. Ces résultats mettent en évidence une interaction forte entre un agent pathogène non zoonotique (le virus du SDRP), aux conséquences considérables sur la compétitivité de la filière porcine, et un agent pathogène zoonotique n'affectant pas les animaux (le VHE), aux conséquences sanitaires potentiellement graves chez l'Homme. Ces données soulignent encore la nécessité d'une appréhension globale de la santé animale et de la santé humaine et l'importance des programmes d'assainissement du virus du SDRP en élevage porcin, qui pourraient se révéler être un levier majeur pour la maîtrise du VHE dans la filière.

## Remerciements

L'ensemble de ces travaux a été réalisé grâce au soutien de l'Agence nationale pour la recherche (ANR 2010 - CESA-010 HEVECODYN) et par l'Union européenne (programme FP7, projet PREDEMICS). Les auteurs sont reconnaissants à Virginie Dorenlor, Florent Eono, Eric Eveno, Yann Bailly, Patricia Renson et Frédéric Paboeuf pour leur assistance technique.

## Références bibliographiques

Adlhoch, C., Avellon, A., Baylis, S.A., Ciccaglione, A.R., Couturier, E., de Sousa, R., Epstein, J., Ethelberg, S., Faber, M., Feher, A., Ijaz, S., Lange, H., Mandakova, Z., Mellou, K., Mozalevskis, A., Rimhanen-Finne, R., Rizzi, V.,

- Said, B., Sundqvist, L., Thornton, L., Tosti, M.E., van Pelt, W., Aspinall, E., Domanovic, D., Severi, E., Takkinen, J., Dalton, H.R., 2016. Hepatitis E virus: Assessment of the epidemiological situation in humans in Europe, 2014/15. *J. Clin. Virol.* 82, 9-16.
- Andraud, M., Dumarest, M., Cariolet, R., Aylaj, B., Barnaud, E., Eono, F., Pavio, N., Rose, N., 2013. Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet. Res.* 44, 1-11.
- Backer, J.A., Berto, A., McCreary, C., Martelli, F., van der Poel, W.H.M., 2012. Transmission dynamics of hepatitis E virus in pigs: Estimation from field data and effect of vaccination. *Epidemics* 4, 86-92.
- Barnaud, E., Rogee, S., Garry, P., Rose, N., Pavio, N., 2012. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5153-5159.
- Charpin, C., Mahe, S., Keranflec'h, A., Belloc, C., Cariolet, R., Le Potier, M.F., Rose, N., 2012. Infectiousness of pigs infected by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV) is time-dependent. *Vet. Res.* 43, 69.
- Diaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E., 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 86, 1943-1951.
- Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2003. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13, 145-154.
- Gerolami, R., Moal, V., Colson, P., 2008. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N. En. J. Med.* 358, 859-860.
- Grierson, S., Heaney, J., Cheney, T., Morgan, D., Wyllie, S., Powell, L., Smith, D., Ijaz, S., Steinbach, F., Choudhury, B., Tedder, R.S., 2015. Prevalence of hepatitis E virus infection in pigs at the time of slaughter, United Kingdom, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1396-1401.
- Izopet, J., Kamar, N., Abravanel, F., Dubois, M., Lhomme, S., Mansuy, J.M., Alric, L., Peron, J.M., Rostaing, L., 2009. Chronic hepatitis E. *Virologie* 13, 317-325.
- Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131, 65-71.
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J.M., Ouezzani, L., Peron, J.M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J.P., Izopet, J., Rostaing, L., 2008. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. En. J. Med.* 358, 811-817.
- Kanai, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., Hagiwara, K., 2011. Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies. *J. Med. Virol.* 82, 69-76.
- Martelli, F., Toma, S., Di Bartolo, I., Caprioli, A., Ruggeri, F.M., Lelli, D., Bonci, M., Ostanello, F., 2010. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res. Vet. Sci.*
- Pavio, N., Merbah, T., Thébault, A., 2014. Frequent Hepatitis E Virus Contamination in Food Containing Raw Pork Liver, France. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1925-1927.
- Renou, C., Afonso, A.M.R., Pavio, N., 2014. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver Sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1945-1947.
- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F., Pavio, N., 2011. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 419-427.
- Rose, N., Pavio, N., 2014. Épidémiologie du virus de l'hépatite E chez le porc: comment limiter l'exposition des consommateurs. *Journées Recherche Porcine* 46, 159-168.
- Satou, K., Nishiura, H., 2007. Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet. Res.* 3, 9.

## Brève. Nouveau foyer de maladie de l'œdème chez le Sanglier, massif des Albères, Pyrénées-Orientales *Short item. A new outbreak of edema disease in wild boar, Albères Mountain, Pyrénées-Orientales, France*

Anouk Decors (1)\*, Hervé Morvan (2), Jacqueline Galivel (3), Cyril Agnes (4), Karin Lemberger (5)

\*Auteur correspondant: anouk.decors@oncfs.gouv.fr

(1) Office national de la chasse et de la faune sauvage, Auffargis, France

(2) Laboratoire public conseil expertise et analyses (Laboce), Ploufragan, France

(3) Centre d'analyses Méditerranée-Pyrénées (CAMP-Laboratoire départemental), Perpignan, France

(4) Fédération départementale des chasseurs des Pyrénées-Orientales, Perpignan, France

(5) Faunapath, Lyon, France

**Mots-clés: Maladie de l'œdème, *Sus scrofa*, France/Keywords: Edema disease, *Sus scrofa*, France**

De début septembre à fin novembre 2016, le réseau Sagir (réseau de l'Office national de la chasse et de la faune sauvage et de la Fédération nationale des chasseurs) a enregistré des signaux de mortalité anormale de sangliers dans le massif des Albères (Pyrénées-Orientales). La mortalité était d'amplitude anormale pour le département et très agrégée d'un point de vue spatio-temporel. Deux foyers de mortalité ont été identifiés, centrés sur Maureillas et Argelès. Les premières estimations de terrain chiffrent la mortalité/morbidité observée à environ 75 sangliers. Les juvéniles ont principalement été touchés (sangliers de 4-6 mois, en phase post-sevrage, en bon état corporel). Quelques adultes ont également été observés malades. Certains animaux présentaient une condition corporelle dégradée, associée à une strongylose respiratoire sévère. Des signes nerveux de type convulsions, tremblements et ataxie ont été observés. Les investigations épidémiologiques, cliniques, anatomo-pathologiques, bactériologiques ont permis de conclure avec un haut degré de certitude à l'émergence d'un nouveau foyer de maladie de l'œdème. La maladie de l'œdème se caractérise par une entéro-toxémie aigue souvent fatale, provoquée par quelques sérotypes d'*Escherichia coli*. Les *E. coli* pathogènes prolifèrent dans l'intestin grêle et produisent des shigatoxines (vérotoxines)

responsables de lésions artérielles. En résultent des œdèmes, des morts subites, et des signes neurologiques consécutifs à l'œdème cérébral (Imberechts *et al.* 1992). Il s'agit du deuxième foyer détecté chez des Suidés sauvages en France et dans le monde, dans des conditions naturelles. Le premier foyer avait été identifié en Ardèche, durant l'été 2013 (Decors *et al.* 2015). En Ardèche comme dans les Pyrénées-Orientales, le sérotype identifié est *E. Coli* O139k82.

Des investigations vont être mises en œuvre dans le cadre d'un travail universitaire, pour identifier les facteurs de risque associés à l'émergence de la maladie dans les populations de sangliers ardéchoises et pyrénéennes.

### Références bibliographiques

- Decors A., Richomme C., Morvan H., Botteron C., Nicolier A., Rambaud F., Berny P., Gault G., Belli P., Le Potier M.-F., Fach P., Delannoy S., Baubet E., Etienne F., Lemberger K. 2015. *Diagnostiquer un problème de santé dans la faune sauvage: exemple de la maladie de l'œdème chez le sanglier sauvage (Sus scrofa) en Ardèche.* Bull. Epid. Santé Anim. Alim., 69, 2-7.
- Imberechts H., De Greve H., Lintermans, P. 1992. *The pathogenesis of edema disease in pigs. A review.* Vet. Microbiol., 31, 2-3) 221-233.

# Investigation d'un cas de **botulisme aviaire** dans un élevage de poules pondeuses plein-air

Sophie Le Bouquin (1), Caroline Le Maréchal (2), Valentine Ballan (2), Sandra Rouxel (2), Denis Léon (1), Loïc Balaine (1), Typhaine Poëzevara (2), Emmanuelle Houard (2), Brice Robineau (3), Corinne Robinault (4), Marianne Chemaly (2), Rozenn Souillard (1)

\*Auteur correspondant: sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr

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

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Ploufragan, France

(3) Celtivet, Ploumagoar, France

(4) Direction départementale de la protection des populations des Côtes-d'Armor, Ploufragan, France

## Résumé

Le botulisme est une affection neuro-paralytique sévère due aux toxines de *Clostridium botulinum*, commune à l'Homme et à l'animal. Elle se traduit chez les oiseaux par une paralysie flasque ascendante qui engendre régulièrement des pertes importantes dans les élevages de volailles. Si des cas ont déjà été rapportés et décrits dans l'avifaune et chez les volailles de chair, peu de cas ont été décrits en élevage de poules pondeuses. Cet article rapporte les investigations épidémiologiques conduites en 2014 dans un élevage de 5000 poules pondeuses plein-air des Côtes-d'Armor atteint de botulisme aviaire. Compte tenu de la durée d'élevage particulièrement longue dans cette filière, les investigations avaient pour objectif d'étudier en présence des animaux, la diffusion et la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage au cours des six mois qui ont suivi l'épisode clinique. Une évaluation de la contamination des œufs par *C. botulinum* a aussi été réalisée. Un suivi longitudinal a été conduit, au cours duquel des échantillons ont été collectés dans le bâtiment d'élevage et dans son environnement. Trente œufs propres et trente œufs sales ont aussi été chiffonnés et le contenu de 24 œufs analysés. La bactérie a été détectée dans le bâtiment plus de cinq mois après l'épisode clinique, notamment sur les murs et le circuit des œufs. Concernant l'analyse des œufs, la bactérie a été retrouvée sur la coquille mais jamais dans le contenu de l'œuf, ce qui confirme l'absence de transmission verticale du botulisme. En l'absence de mesures de police sanitaire définies pour ce danger sanitaire de première catégorie, des pistes sont proposées, concernant notamment l'identification des principales zones critiques pour les opérations de décontamination et l'instauration de mesures spécifiques permettant d'éviter la dissémination du germe à l'extérieur du bâtiment atteint.

## Mots-clés

Botulisme, poules pondeuses, investigation épidémiologique

## Abstract

### **Investigation of a botulism outbreak in a free-range laying hen farm**

*Botulism is a severe paralytic disease caused by botulinum neurotoxins (BoNTs), shared by both humans and animals. In birds, an ascending flaccid paralysis has been observed that regularly leads to significant losses in poultry farms. Botulism outbreaks have already been reported and described in wild birds and broiler flocks, but more rarely in other poultry species such as laying hens. This article reports on the epidemiological investigations carried out in 2014 in a flock of 5000 free-range laying hens with avian botulism. Given the duration of the rearing period, the aim of the study was to investigate the distribution and persistence of *C. botulinum* in the poultry farm during the six months following the outbreak. An evaluation of egg contamination by *C. botulinum* was also made. A longitudinal study was carried out and several samples were collected in the poultry house and the surrounding area. Sixty clean and soiled eggs were also swabbed at each visit. In addition, 24 eggs were collected to analyze the eggshell and egg content. More than five months after the outbreak, *C. botulinum* could still be detected in the house, mostly on the walls and in the egg circuit. Regarding egg contamination, the bacterium was detected on the shells but not inside the eggs, confirming the absence of vertical botulism transmission.*

*In the absence of any clear animal health policy measures for this disease, proposals including identification of the main critical areas for decontamination operations and the implementation of specific measures to prevent the spread of the disease outside affected houses, have been made.*

## Keywords

Botulism, Laying hens, Epidemiological investigation

Le botulisme est une affection neuro-paralytique sévère, commune à l'Homme et à l'animal due aux toxines produites par la bactérie *Clostridium botulinum*. Parmi les sept toxines botuliniques caractérisées à ce jour, le botulisme humain est surtout associé aux toxines A, B, E et F, tandis que la toxine C/D est la principale responsable des foyers de botulisme (Le Maréchal et al., 2016; Skarin et al., 2010; Woudstra et al., 2012). Bien que rares, des cas de type E (type toxinique dangereux pour l'Homme) ont déjà été diagnostiqués à la fin des années 1990 en France en élevage de volailles et chez les oiseaux sauvages.

Chez les oiseaux, des signes cliniques de paralysie flasque sont observés et progressent de manière ascendante, touchant d'abord les pattes puis les ailes, le cou et les paupières. L'appareil respiratoire et le cœur sont ensuite atteints, entraînant la mort de l'animal en moins d'une semaine.

En France, le botulisme est actuellement classé comme danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles, incluant donc les volailles et les oiseaux sauvages (arrêté ministériel du 29 juillet 2013).

Une recrudescence du botulisme aviaire a été observée dans les années 2007-2008. Selon les données du RNOEA (Réseau

national d'observations épidémiologiques en aviculture), basées sur des signalements volontaires des correspondants (vétérinaires et laboratoires), 100 à 120 signalements par an étaient alors rapportés. L'incidence est retombée à environ vingt foyers par an depuis 2012. Le botulisme aviaire reste toutefois une préoccupation sanitaire dans les élevages de volailles, car il engendre des pertes importantes (mortalités élevées, non valeurs économiques des animaux, euthanasie des lots...).

Des cas ont souvent été décrits dans l'avifaune sauvage, dans les élevages de gibiers et de poulets de chair (Dohms et al., 1982; Pecelunas et al., 1999; Roberts and Collings, 1973), mais beaucoup plus rarement dans les autres productions, notamment les poules pondeuses (Sharpe et al., 2011; Skarin et al., 2015). Cet article rapporte les investigations épidémiologiques conduites en 2014 dans un élevage de poules pondeuses plein air des Côtes-d'Armor, atteint de botulisme aviaire. Ces investigations ont été conduites afin: i) d'étudier la diffusion et la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage, dans les mois qui ont suivi l'épisode clinique, et ii) d'évaluer la contamination des œufs par *C. botulinum*.

# Matériel et méthodes

## Diagnostic de la maladie

Un total de 5020 poulettes futures pondeuses ont été mises en place le 15 mai 2014 dans un bâtiment de 700 m<sup>2</sup> d'un élevage plein-air. L'accès au parcours s'est fait après trois semaines d'élevage. Aucun évènement sanitaire notable ne s'est produit au cours des premières semaines d'élevage. Le 30 novembre 2014, à 46 semaines d'âge, un étouffement dont l'origine n'a pas été identifiée a causé la mort de 260 poules. Dans les deux jours qui ont suivi, l'éleveur a constaté une paralysie flasque sur certains animaux associée à une augmentation de la mortalité (7 poules trouvées mortes le premier jour et 25 le second). Une suspicion de botulisme a été posée par le vétérinaire du fait des signes observés, sans lésions associées. Six prélèvements intestinaux (4 sur cadavres et 2 sur animaux malades) et quatre prélèvements sanguins (sur animaux malades) ont été réalisés (Encadré 1). Un traitement à base de tylosine (200 g/jour dans l'eau de boisson pendant trois jours soit 20 mg/kg) a été mis en place le 3 décembre. Le test de létalité sur souris associé à une PCR en temps réel ont permis le 8 décembre de confirmer le diagnostic et de mettre en évidence *C. botulinum* de type C/D (Woudstra et al., 2012) (Encadré 2). Le 10 décembre, un arrêté portant mise sous surveillance (APMS) a été pris, fixant l'application de mesures sanitaires dans l'exploitation.

## Collecte d'échantillons et recueil de données épidémiologiques au cours des visites

Un suivi longitudinal a été réalisé dans l'élevage au cours de cinq visites réalisées entre décembre 2014 et mai 2015. Un questionnaire épidémiologique portant sur les caractéristiques de l'élevage et du bâtiment, les pratiques d'élevage et les caractéristiques sanitaires des animaux a été complété à chaque visite. Des prélèvements environnementaux ont été réalisés en différents points du bâtiment (chiffonnettes ou pédi-chiffonnettes sur le sol, les murs, le circuit de

ventilation, le circuit des œufs, le local de conditionnement des œufs, le sas à l'entrée du bâtiment, le bac d'équarrissage et les abords). Des prélèvements d'eau et d'aliment ont aussi été réalisés ainsi que des ténébrions, petit insecte fréquemment rencontré dans les litières d'élevage. En complément, des écouvillons cloacaux ont été réalisés sur dix poules à chaque visite, ainsi que des chiffonnettes sur 30 œufs sales et 30 œufs propres. Par ailleurs, au cours des quatre dernières visites, douze œufs propres et douze œufs sales ont été prélevés en supplément pour analyser le contenu des œufs et les coquilles.

## Protocole de laboratoire

La prise d'essai pour les échantillons était de minimum 20 g pour l'aliment, le sol, les fientes, 100 ml d'eau et 10 à 15 ténébrions (lavés avec un détergent pour éliminer *C. botulinum* s'il était présent en surface). Les ténébrions ont été écrasés puis dilués au 1/10 dans du milieu TPGY (Tryptone Peptone Glucose Yeast). Les autres échantillons ont été dilués au 1/2 puis au 1/5 dans le milieu d'enrichissement TPGY selon les recommandations de la norme NF EN ISO 6887-6, puis homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier (Microgen) pendant quinze secondes. Pour les chiffonnettes, 250 ml de TPGY ont été ajoutés puis l'échantillon a été homogénéisé à l'aide d'un Pulsifier (Microgen) pendant quinze secondes. Les écouvillons cloacaux ont été dilués dans 9 ml de TPGY. Les œufs ont été groupés par trois puis immergés dans du TPGY et frottés pendant deux minutes dans le milieu. Puis les coquilles ont été décontaminées à l'aide d'Anioxyspray WS (Anios) avec un temps de contact de quinze minutes. Les œufs ont ensuite été cassés par trois puis 25 g ont été dilués au 1/10 dans du TPGY et homogénéisés à l'aide d'un Pulsifier (Microgen) pendant quinze secondes.

Les échantillons ainsi préparés ont été incubés au moins quatre jours à 37°C en conditions anaérobies (station A35, Don Whitley). L'ADN a ensuite été extrait à partir d'un ml de chaque enrichissement à l'aide du kit QiaAmp DNA Mini kit (Qiagen). La détection des gènes codant pour la toxine C/D a été réalisée par PCR en temps réel (Le Maréchal et

### Encadré 1. Prélèvements pour le diagnostic du botulisme aviaire

Une étude est en cours depuis 2013 afin d'optimiser le diagnostic du botulisme aviaire. Cette étude est menée conjointement par le LNR botulisme aviaire (Anses, laboratoire de Ploufragan-Plouzané) et par Labocea-site de Ploufragan.

Dans le cadre du schéma diagnostique actuellement en place, les prélèvements suivants sont à réaliser.

Les prélèvements sont à expédier à Labocea, site de Ploufragan. Les foies seront ensuite transmis directement au LNR pour analyse.

| Type d'échantillon | Quantité par prélèvement                     | Nombre d'animaux à prélever | Transport   | Température de transport | Délai d'acheminement |
|--------------------|--|-----------------------------|---|--------------------------|----------------------|
| Sérum              | 5 ml   | 4                           | Tube sec (sans anticoagulant) ou gel avec activateur de coagulation | Température ambiante     | <48 h                |
| Contenu intestinal | 1 g  | 4                           | Pot à coproculture  | Froid (ne pas congeler)  | <48 h                |
| Foie               | Entier (au moins 25 g pour les gros animaux) |                             | Pot/sachet individuel   | Froid                    | <24 h                |
|                    |  |                             |   | -18°C                    | >24 h                |

Nous attirons votre attention sur le fait que ce schéma est susceptible d'évoluer au cours des prochains mois.

### Encadré 2. Méthodes de confirmation du diagnostic de botulisme

Les analyses sont réparties entre Labocea et le LNR.

Labocea réalise le test de létalité sur souris à partir des sérums et contenus intestinaux et la détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel à partir de l'enrichissement d'un mélange d'1 g de contenus intestinaux et d'un mélange d'1 g de foie. L'enrichissement est réalisé en milieu TPGY dans une enceinte anaérobie à 37°C pendant 48 h. L'extraction d'ADN est réalisée à partir d'1 ml de chaque enrichissement et la détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D et D/C est réalisée par PCR en temps réel (Gene Disc).

Le LNR se charge de la détection de *C. botulinum* par PCR en temps réel à partir de l'enrichissement individuel de chaque dans la mesure de 25 g de chaque foie. Les foies sont dilués individuellement au 1/10 en milieu TPGY puis homogénéisés à l'aide d'un pulsifier pendant quinze secondes et enrichis pendant au moins 24 h à 37°C en conditions anaérobies. L'ADN est ensuite extrait par un kit commercial incluant une étape de

lyse chimique puis une purification des ADN sur colonne de silice. Enfin la détection des gènes codant pour les toxines C, D, C/D, D/C et E est réalisée par PCR en temps réel (via un thermocycleur). Cette méthode permet de détecter la présence de *C. botulinum* de type C, D, C/D, D/C et E dans les prélèvements.

Les résultats sont disponibles sous 48 à 72 h (jours ouvrés) après réception des échantillons. Ce délai s'explique par la durée du test sur souris (observation des signes cliniques pendant 48 h) et par l'étape d'enrichissement pour la méthode de détection par PCR.

Pour toute information complémentaire les coordonnées du LNR botulisme aviaire sont :

Tél. : 02 96 01 85 33 (Caroline Le Maréchal, responsable LNR Botulisme aviaire) et 02 96 01 01 48 (Rozenn Souillard, EBEAC)  
Mel: LNR-Botu-aviaire@anses.fr

al., 2016; Woudstra et al., 2012). Un contrôle interne commercial a été utilisé afin de vérifier l'absence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon (QuantiFast Pathogen+ IC Kits, Qiagen).

## Résultats

### Évolution de la maladie

La phase clinique de la maladie a évolué sur une semaine au cours de laquelle 131 poules sont mortes, soit un taux de mortalité de 2,6 %, sans récurrence ultérieure. Aucun problème sanitaire n'a été constaté après 48 semaines, avec une moyenne de trois poules mortes par semaine jusqu'à l'abattage (Figure 1). Une légère chute de ponte (environ 5 %) a été constatée dans les jours qui ont suivi l'épisode de botulisme. En application de l'APMS, un recensement des animaux

présents sur l'exploitation a été réalisé et les mouvements de volailles ont été interdits. Des dispositions complémentaires ont été prises pour éviter la dissémination de la bactérie dans l'environnement : confinement des animaux si possible, isolement des animaux malades, retrait et stockage des cadavres au moins deux fois par jour et interdiction d'enfouissement des cadavres, tri des œufs souillés avant conditionnement. Des mesures de biosécurité renforcées (port d'équipement dédié, lavage et désinfection des mains et du matériel) ont été mises en place. Enfin, des procédures de décontamination, une fois les animaux partis, ont été prescrites.

### Détection de *Clostridium botulinum* dans les échantillons collectés

*C. botulinum* type C/D a été détecté dans 16,4 % des échantillons collectés au cours des cinq visites (Tableau 1). Il a été détecté dans un

Tableau 1. Détection de *C. botulinum* dans l'élevage

|                  |                                      | Visite 1   | Visite 2   | Visite 3   | Visite 4   | Visite 5   | Nb échantillons positifs/nb échantillons prélevés | Total par catégorie | Proportion de prélèvements positifs (en %) |
|------------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|---|---------------------|--|
|                  |                                      | 15/12/2014 | 26/01/2014 | 12/03/2014 | 14/04/2014 | 18/05/2014 |   |                     |  |
| Bâtiment         | 1 pédi-chiffonnette sur caillebotis  | C/D        | ND         | C/D        | ND         | ND         | 2/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette sur les murs          | ND         | ND         | Nég        | ND         | C/D        | 1/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette sur les murs          | ND         | ND         | C/D        | ND         | C/D        | 2/5   | 5/15                | 33   |
| Ventilation      | 1 chiffonnette sortie d'air          | ND         |            |            |            |            | 0/1   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette entrée d'air          | ND         | ND         | ND         | C/D        | ND         | 1/5   | 1/6                 |  |
| Circuit d'œufs   | 1 chiffonnette tapis à œufs en haut  | C/D        | C/D        | ND         | ND         | ND         | 2/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette pondoir en haut       | C/D        | Nég        | ND         | ND         | ND         | 1/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette tapis à œufs en bas   | C/D        | C/D        | C/D        | C/D        | C/D        | 5/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette pondoir en bas        | C/D        | ND         | C/D        | Nég        | C/D        | 3/5   | 11/20               | 55   |
| Eau et aliment   | 1 eau                                | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   |                     |  |
|                  | 1 aliment                            | ND         |            |            |            |            | 0/1   | 0/6                 |  |
| Ténébrions       | 1 prélèvement de ténébrions          | ND         | ND         | ND         | C/D        | Nég        | 1/5   | 1/5                 |  |
| Sas sanitaire    | 1 pédi-chiffonnette sas              | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette local à œufs          | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   | 0/10                |  |
| Poules           | 10 écouvillons cloacaux              |            | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/4   | 0/4                 |  |
| Fientes          | 1 chiffonnette sur les fientes       | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   |                     |  |
|                  | 1 prélèvement de fientes             | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   | 0/10                |  |
| Surface des œufs | 1 chiffonnette sur 30 œufs propres   | C/D        | C/D        | C/D        | Nég        | C/D        | 4/5   |                     |  |
|                  | 1 chiffonnette sur 30 œufs sales     | C/D        | Nég        | Nég        | Nég        | Nég        | 1/5   | 5/10                |  |
| Extérieurs       | 1 chiffonnette dans bac équarrissage | C/D        | Nég        | Nég        | Nég        | Nég        | 1/5   |                     |  |
|                  | 1 prélèvement de terre               | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   |                     |  |
|                  | 1 pédi-chiffonnette sur les abords   | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   |                     |  |
|                  | 1 prélèvement de terre du parcours   |            | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/4   |                     |  |
|                  | 1 pédi-chiffonnette sur parcours     | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 0/5   | 1/24                |  |
| <b>Total</b>     |                                      |            |            |            |            |            |   | <b>24/110</b>       | <b>21,8</b>                                |

ND : non détecté

Nég : négatif

C/D : *C. botulinum* de type C/D

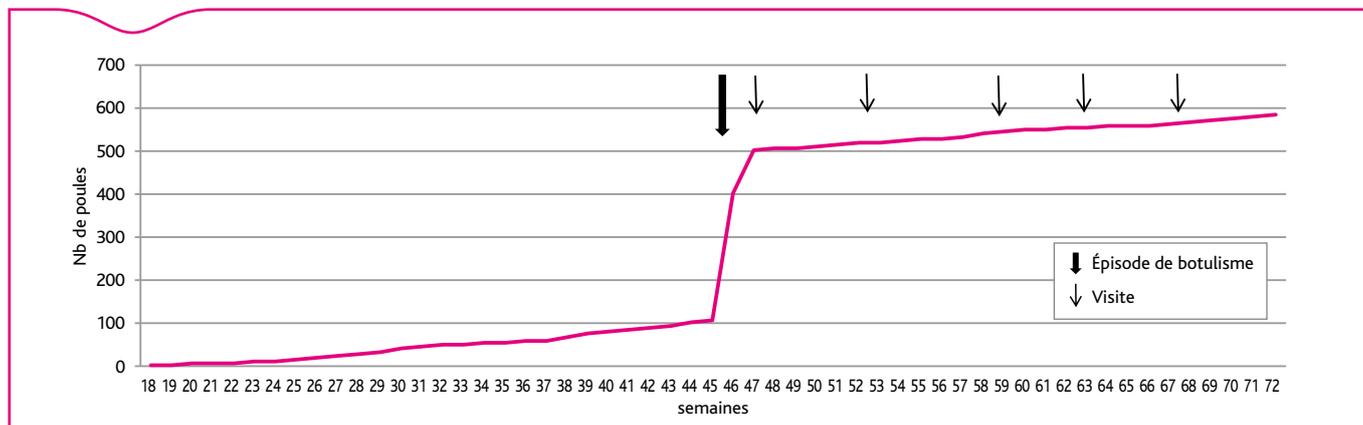


Figure 1. Mortalité cumulée

Tableau 2. Analyse des œufs (par pool de 3 œufs)

|              |        |          |     | Visite 2   | Visite 3   | Visite 4   | Visite 5   |
|--------------|--------|----------|-----|------------|------------|------------|------------|
|              |        |          |     | 26/01/2014 | 12/03/2014 | 14/04/2014 | 18/05/2014 |
| Œufs propres | Pool 1 | Coquille | ND  | ND         | ND         | ND         | ND         |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND         | ND*        |            |
|              | Pool 2 | Coquille | ND  | ND         | ND         | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND         | ND*        |            |
|              | Pool 3 | Coquille | ND  | ND         | ND         | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND         | ND*        |            |
|              | Pool 4 | Coquille | ND  | ND         | ND         | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND         | ND*        |            |
| Œufs sales   | Pool 1 | Coquille | ND  | ND         | ND         | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND*        | ND*        |            |
|              | Pool 2 | Coquille | ND  | ND         | ND         | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND         | ND         |            |
|              | Pool 3 | Coquille | C/D | ND         | ND         | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND         | ND*        |            |
|              | Pool 4 | Coquille | C/D | ND         | ND**       | ND         |            |
|              |        | Contenu  | ND  | ND         | ND**       | ND*        |            |

ND : non détecté  
 \* Pool de 2 œufs  
 \*\* 1 œuf  
 C/D : *C. botulinum* de type C/D

tiers des chiffonnettes (5/15) prélevées à l'intérieur du bâtiment, sur le caillebotis et sur les murs, et dans plus de la moitié des chiffonnettes prélevées sur le circuit des œufs (55 %). *C. botulinum* de type C/D a aussi été détecté dans un prélèvement de ténébrions. À l'extérieur, la bactérie a seulement été retrouvée dans le bac d'équarrissage. Elle n'a jamais été détectée dans les échantillons d'eau ni dans les aliments, pas plus que dans le local de stockage des œufs, dans le sas ou sur le parcours.

*C. botulinum* a été retrouvé pendant quatre mois après l'épisode de botulisme au niveau du circuit d'admission d'air et pendant plus de cinq mois sur les murs du bâtiment, dans les pondoirs et sur les tapis à œufs.

Le germe a aussi été mis en évidence dans la moitié des chiffonnettes effectuées sur les œufs, essentiellement les œufs propres, sur lesquels il était toujours détecté plus de cinq mois après l'épisode de botulisme. Si l'on s'intéresse à l'analyse des œufs (Tableau 2), *C. botulinum* a seulement été détecté sur les coquilles mais jamais dans le contenu de l'œuf.

Il n'a jamais été détecté dans les prélèvements de fientes, ni dans les écouillons cloacaux effectués directement sur les animaux.

## Discussion

Il n'a pas été possible, au vu des données disponibles, d'identifier l'origine de la contamination de cet élevage. Deux hypothèses, qui

peuvent parfois coexister dans un même élevage, sont classiquement avancées pour expliquer le déclenchement d'un épisode de botulisme : l'ingestion de toxines préformées - on parle alors d'intoxication, et la production *in situ* de toxines associée à une colonisation caecale par *C. botulinum* - on parle alors de toxi-infection. Dans le cas présent, la mise en évidence de *C. botulinum* permet de conclure à la survenue d'une toxi-infection. Même si l'existence d'un portage sain reste controversé chez les oiseaux et qu'aucune étude n'a permis de le démontrer, on ne peut toutefois exclure un portage de ce germe à un niveau très faible, inférieur au seuil de détection des méthodes disponibles (Popoff, 1989). Le stress consécutif à l'étouffement survenu le jour précédant la déclaration des premiers signes cliniques aurait alors pu être à l'origine du déclenchement d'une toxi-infection. Les cadavres ont aussi pu constituer une source de contamination des animaux même s'ils ont été ramassés rapidement. Ces derniers constituent en effet un excellent substrat de développement pour *C. botulinum*, du fait des conditions anaérobies et de la présence de matière en décomposition qui représentent des conditions idéales pour sa germination et sa croissance (Popoff, 1989). La présence du bac d'équarrissage à proximité du bâtiment et le passage des camions d'équarrissage devant le bâtiment peuvent aussi être considérés comme des facteurs de risque de contamination de ces volailles, d'autant plus qu'elles sont élevées sur parcours.

Le taux de mortalité observé ici est faible (2,6 %) et inférieur à celui rencontré dans de nombreux cas de botulisme où des mortalités de 20 à 30 % ne sont pas rares (Sharpe *et al.*, 2011; Skarin *et al.*, 2015). Il a été démontré que la sensibilité des animaux diminuait avec l'âge (Dohms and Cloud, 1982), or l'épisode rapporté ici s'est produit sur des animaux âgés de 46 semaines. Les taux de morbidité et mortalité observés varient aussi en fonction de la quantité de toxine ingérée ou assimilée. L'éleveur a très rapidement mis en place des mesures de gestion sanitaire, notamment l'enlèvement des cadavres, la mise en quarantaine des animaux malades et la mise en place rapide d'un traitement antibiotique, qui peuvent aussi expliquer le faible taux de mortalité relevé durant cet épisode. Une légère chute de ponte a été observée ici, mais elle n'a pas été constatée dans les autres cas rapportés et ne semble pas être un signe caractéristique d'un épisode de botulisme (Sharpe *et al.*, 2011; Skarin *et al.*, 2015).

*C. botulinum* a persisté longtemps à l'intérieur du bâtiment et était toujours détectable cinq mois après l'épisode clinique, notamment sur les murs, le circuit des œufs et les coquilles. Ce résultat est cohérent avec ceux rapportés dans la bibliographie qui ont démontré la survie de *C. botulinum* dans l'environnement pendant plusieurs années (Okamoto *et al.*, 1999) et sa persistance même après nettoyage et désinfection dans des élevages infectés (Souillard *et al.*, 2014).

Alors que la contamination verticale n'a jamais été démontrée, la détection de *C. botulinum* dans le bâtiment, longtemps après l'épisode, pourrait s'expliquer par une contamination pseudo-verticale des œufs, via une contamination de la coquille d'origine caecale. En effet, les chiffonnettes réalisées sur le circuit des œufs et celles effectuées sur les

coquilles ont constitué le plus grand nombre d'échantillons contaminés. Même si le portage de *C. botulinum* n'a pu être démontré à partir des écouvillons cloacaux, les volailles pourraient rester porteuses de *C. botulinum* pendant plusieurs mois, à des niveaux non détectables par notre méthode et de ce fait pourraient être responsables de la contamination des coquilles.

Quelle que soit l'origine du maintien de *C. botulinum*, ces résultats permettent d'identifier les supports les plus appropriés pour détecter les bactéries dans l'environnement d'un élevage de poules suspect : le circuit des œufs en particulier semble un excellent candidat. C'est aussi sur ces supports identifiés qu'il faudra renforcer les mesures de nettoyage et de désinfection après le départ des animaux. D'autre part, ces résultats confirment la nécessité de mettre en œuvre des mesures de gestion sanitaire spécifiques sur le lot, notamment en termes de biosécurité, pour éviter la dispersion des clostridies vers d'autres bâtiments d'élevage ou vers d'autres élevages. Des mesures particulières sont aussi à préconiser sur les œufs issus de l'élevage, le matériel nécessaire au ramassage (alvéoles de stockage, palettes, chariots) et les camions de ramassage des œufs qui passent d'élevage en élevage. Une attention particulière devra être portée sur les contaminations croisées entre élevages, via les échanges de matériel (chariots, palettes,...) et le nettoyage et la désinfection du matériel et des véhicules.

En accord avec l'évaluation du risque publiée par l'Afssa (Afssa, 2002; Afssa, 2009), le risque de contamination humaine lié à la consommation d'œufs contaminés est considéré comme nul à négligeable, et est relié à la possible contamination de la coquille par la bactérie et non à la présence de toxine botulinique dans le jaune. Chez une pouleuse malade, une quantité de toxine circulante suffisamment importante pour permettre sa diffusion dans l'œuf provoquerait la mort rapide de l'animal (Afssa, 2009). Cette hypothèse semble être confirmée par notre étude dans laquelle nous avons fréquemment détecté *C. botulinum* sur la coquille, mais jamais dans l'œuf.

Deux méthodes de détection sur les œufs ont été utilisées, par des chiffonnettes ou en analysant directement les coquilles. Au vu des résultats, les deux méthodes peuvent être utilisées, mais la présence de *C. botulinum* ne semble pas liée au niveau de propreté de la coquille. L'état de propreté de la coquille ne semble donc pas être un bon critère pour évaluer la contamination et le tri des œufs sales ne semble pas être une mesure d'hygiène efficace ni suffisante en cas d'épisode de botulisme dans un élevage de pouleuses. Or aucune mesure de restriction spécifique n'a été mise en place pour les œufs propres issus de cet élevage. Considérant la persistance de *C. botulinum* sur la coquille pendant plusieurs mois après l'épisode clinique, les risques de contamination croisée au centre de conditionnement ou à la casserie d'œufs existent et les conditions anaérobies doivent absolument être évitées pour prévenir la production de toxines pendant le processus de préparation des œufs.

## Conclusion

Cette étude de cas a permis de montrer que *C. botulinum* est susceptible de persister pendant plusieurs mois dans un bâtiment d'élevage de poules pouleuses, essentiellement sur le circuit des

œufs, une zone critique pour les opérations de décontamination. *C. botulinum* a été détecté sur des coquilles d'œufs propres et sales mais pas dans leur contenu, ce qui confirme l'absence de transmission verticale pour cette maladie. En l'absence de mesures de police sanitaire définies pour ce danger sanitaire de première catégorie, des pistes sont proposées, concernant notamment l'instauration de mesures spécifiques permettant d'éviter la dissémination du germe à l'extérieur du bâtiment atteint.

## Remerciements

Les auteurs remercient l'éleveur, le vétérinaire sanitaire et les agents de la direction départementale en charge de la protection des populations des Côtes-d'Armor, pour leur participation à cette étude.

## Références bibliographiques

- Afssa 2002. Le botulisme d'origine aviaire et bovine. In Rapport Afssa, 82.
- Afssa 2009. Avis de l'Afssa sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. In Afssa saisine 2008-SA-0334, 9.
- Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.
- Dohms, J.E., Allen, P.H., Rosenberger, J.K., 1982. Cases of type C botulism in broiler chickens. *Avian Dis* 26, 204-210.
- Dohms, J.E., Cloud, S.S., 1982. Susceptibility of broiler chickens to *Clostridium botulinum* type C toxin. *Avian Dis* 26, 89-96.
- Le Maréchal, C., Woudstra, C., Fach, P. 2016. Botulism. In *Clostridial diseases of animals*, In: F. A. Uzal, J. G. Songer, J. F. Prescott, Popoff, M.R. (Eds.) Blackwell Publishing Ltd Ames IA, 303-330.
- Okamoto, K., Adachi, M., Sato, K.I., Chuma, T., 1999. Epidemiological factors in chicken botulism. *Japan Veterinary Medical Association* 52, 168-173.
- Pecelunas, K.S., Wages, D.P., Helm, J.D., 1999. Botulism in chickens associated with elevated iron levels. *Avian Dis* 43, 783-787.
- Popoff, M.R., 1989. Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* 8, 129-145.
- Roberts, T.A., Collings, D.F., 1973. An outbreak of type-C botulism in broiler chicken. *Avian Dis* 17, 650-658.
- Sharpe, A.E., Sharpe, E.J., Ryan, E.D., Clarke, H.J., McGettrick, S.A., 2011. Outbreak of type C botulism in laying hens. *Vet Rec* 168, 669.
- Skarin, H., Lindberg, A., Blomqvist, G., Aspan, A., Baverud, V., 2010. Molecular characterization and comparison of *Clostridium botulinum* type C avian strains. *Avian Pathol* 39, 511-518.
- Skarin, H., Lindgren, Y., Jansson, D.S., 2015. Investigations into an Outbreak of Botulism Caused by *Clostridium botulinum* Type C/D in Laying Hens. *Avian Dis* 59, 335-340.
- Souillard, R., Woudstra, C., Le Marechal, C., Dia, M., Bayon-Auboyer, M.H., Chemaly, M., Fach, P., Le Bouquin, S., 2014. Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. *Avian Pathol* 43, 458-464.
- Woudstra, C., Skarin, H., Annibaldi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Bayon-Auboyer, M.H., Buffereau, J.P., De Medici, D., Fach, P., 2012. Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78, 3120-3127.

# Point d'actualité sur la colistine

Emilie Gay (1), Eric Jouy (2), Nathalie Jarrige (1), Agnese Lupo (3), Marisa Haenni (3), Jean-Yves Madec (3)

\*Auteur correspondant: emilie.gay@anses.fr

(1) Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Epidémiologie, Lyon, France

(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Mycoplasmodologie – Bactériologie, Université Bretagne Loire, Technopôle Saint-Brieuc Armor, Ploufragan, France

(3) Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Antibiorésistance et virulence bactériennes, Lyon, France

## Résumé

La colistine, très utilisée en médecine vétérinaire, est devenue ces dernières années un antibiotique de dernier recours pour traiter certaines infections humaines à bactéries Gram négatif multi-résistantes. Depuis la découverte, fin 2015, d'un mécanisme de résistance transférable entre bactéries vis-à-vis de cet antibiotique, l'usage de la colistine est régulièrement questionné.

## Mots-clés

Colistine, antibiorésistance, *mcr-1*, réglementation, antibiotique d'importance critique

## Abstract

### Latest news on colistin

*Colistin, widely used in veterinary medicine, has in recent years become an antibiotic of last resort for certain multidrug-resistant human infections. Since the discovery in late 2015 of a colistin resistance mechanism that can be transferred between bacteria, use of this antibiotic has been regularly called into question.*

## Keywords

*Colistin, Antimicrobial resistance, mcr-1, Regulation, Critically important antimicrobials*

L'attention portée à l'usage de la colistine a progressivement augmenté ces dernières années. Cette molécule de la famille des polymyxines est couramment utilisée en santé animale, principalement par voie orale pour le traitement des infections digestives à entérobactéries en filières porcine, avicole et bovine (Anses ANMV, 2016). En médecine humaine, la colistine a longtemps été peu utilisée, notamment en raison du risque de neuro- et de néphro-toxicité. Cependant, cette molécule connaît un regain d'intérêt depuis quelques années pour lutter contre les infections par des bactéries multi-résistantes (notamment aux carbapénèmes), ce qui a conduit l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) à classer la colistine injectable comme antibiotique de dernier recours pour la médecine humaine en 2013 (ANSM, 2013).

## La résistance à la colistine

Compte tenu des faibles taux de résistance des bactéries à la colistine (Kempf et al., 2013), ainsi que des connaissances sur la nature chromosomique - donc non transférable - de cette résistance, l'usage de cette molécule en médecine vétérinaire n'avait jusqu'à récemment pas été remis en question (Anses, 2015; EMA, 2013, 2014). En novembre 2015, la description d'un gène de résistance plasmidique - donc transférable - à la colistine, nommé *mcr-1*, chez des souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) isolées d'animaux (porcs), de viande (porcs et volailles) et chez l'Homme a changé les données du problème (Liu et al., 2016). Cet article a tout de suite été suivi de plusieurs correspondances, dont l'une indiquant que ce gène avait aussi été détecté en France dans des souches de salmonelles (Webb et al., 2016). Dans les six mois qui ont suivi, de très nombreuses publications ont fait état de la détection de ce gène chez des bactéries isolées chez l'Homme et chez l'animal dans le monde entier, y compris dans des souches antérieures à la découverte de *mcr-1* (1980 en Chine, 2005 en France), mais avec des prévalences faibles (Skov and Monnet, 2016). En juin 2016, un nouveau gène de résistance plasmidique, nommé *mcr-2*, a été identifié dans des souches porcines et bovines de *E. coli* en Belgique (Xavier et al., 2016).

En France, la proportion de *mcr-1* au sein des souches de *E. coli* résistantes aux céphalosporines de dernières générations isolées de veaux malades (souches issues du Résapath, réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) atteint 21 %, vraisemblablement en lien avec une co-localisation sur les mêmes plasmides des gènes de résistance à ces classes d'antibiotiques (Haenni et al., 2016b). La proportion de souches *mcr-1* est en augmentation ces

dernières années au sein de ces souches, mais l'utilisation de colistine suit quant à elle une tendance nettement décroissante chez les bovins, suggérant que la diffusion de *mcr-1* n'est pas uniquement liée à l'usage de cet antibiotique (Haenni et al., 2016a). Chez les porcs et les volailles la diminution de l'usage de la colistine est encore plus marquée ces dernières années (Anses ANMV, 2016). La prévalence du gène *mcr-1* chez les *E. coli* commensaux de ces espèces en France a été déterminée dans le cadre de la surveillance européenne de l'antibiorésistance en portage à l'abattoir et a été estimée à 5,9 % chez les dindes, 1,8 % chez les poulets de chair et 0,5 % chez les porcs (Perrin-Guyomard et al., 2016).

## Les réactions des agences européennes

Les différentes instances européennes ont actualisé leurs avis et recommandations suite à ces nouveaux éléments.

L'évaluation du risque lié à la résistance bactérienne à la colistine en santé publique, publiée par l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) en juin 2016, identifie plusieurs actions pour prévenir et réduire le risque (ECDC, 2016). L'amélioration des méthodes de détection de la résistance à la colistine et de la surveillance de l'usage et de la résistance tant chez l'Homme que chez l'animal est notamment préconisée.

En juillet 2016, l'European Medicines Agency (EMA) a mis à jour son avis sur l'utilisation de la colistine chez l'animal, en élevant le niveau de risque de la catégorie 1 (risque faible ou limité) à la catégorie 2 (risque élevé) avec un objectif de réduction de l'usage (EMA, 2016). L'objectif est de passer sous la barre des 5 mg/PCU (Population correction unit) pour les pays fortement ou modérément utilisateurs (dont la France) et de 1 mg/CPU pour les pays les moins utilisateurs, afin de réduire de 65 % l'usage de la colistine en Europe sans augmentation de l'usage des autres antibiotiques, en particuliers ceux d'importance critique.

Enfin, l'avis de l'Anses sur l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire d'octobre 2016 recommande de ne pas inscrire la colistine sur la liste des antibiotiques d'importance critique mais d'en diminuer l'usage de moitié en trois ans, tout en renforçant la surveillance de l'usage et de la résistance (Anses, 2016a).

Parallèlement, suite à deux référés communautaires, l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) a supprimé les indications concernant l'usage préventif des médicaments vétérinaires à base de

colistine seule, à administrer par voie orale et en a limité la durée de traitement à sept jours, et a retiré les autorisations de mise sur le marché (AMM) des douze spécialités de colistine associée à d'autres antibiotiques par voie orale (EMA and EC, 2015).

Pour le moment en France, la colistine ne fait pas partie de la liste des antibiotiques d'importance critique, dont la prescription est encadrée réglementairement en médecine vétérinaire<sup>(1)</sup>. Suite à ces différents avis, un arbitrage interministériel doit avoir lieu prochainement pour déterminer si les choses restent en l'état ou sont amenées à évoluer.

## Les outils disponibles pour le suivi de l'usage et de la résistance à la colistine

En médecine vétérinaire, le rapport annuel European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) de l'EMA permet de suivre l'usage de la colistine en Europe (EMA and ESVAC, 2015). Des indicateurs plus précis sont donnés dans le rapport annuel de suivi des ventes de l'ANMV pour la France (Anses, ANMV, 2016).

La résistance est quant-à-elle suivie par deux systèmes complémentaires au niveau national. Il y a d'une part les plans de surveillance réglementaires (Union européenne) annuels de la résistance aux antibiotiques. Ces plans sont basés sur des mesures de concentrations minimales inhibitrices (CMI) par micro-dilution en milieu liquide pour des bactéries sentinelles et zoonotiques en portage chez les veaux, porcs et volailles à l'abattoir, mais ils ne sont pas réalisés pour toutes ces espèces chaque année (EFSA and ECDC, 2016). D'autre part, le Résapath assure la surveillance continue de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes chez tous les animaux (Anses, 2016b), en se basant sur les résultats de laboratoires d'analyses vétérinaires qui réalisent les antibiogrammes par la méthode par diffusion en milieu gélosé. Or, pour la colistine, seule la détermination de CMI par micro-dilution est aujourd'hui préconisée. Cette méthode, en raison notamment de son coût et du manque de souplesse dans le nombre et le choix des antibiotiques testés, est pour l'instant peu adaptée à la réalisation en routine des antibiogrammes par les laboratoires d'analyses vétérinaires. La méthode par diffusion en milieu gélosé est donc préférentiellement utilisée, mais elle doit être accompagnée, pour une certaine plage de résultats, d'une mesure de CMI. En routine, cette dernière est réalisée à l'aide de bandelettes contenant un gradient de concentrations. Cependant, ces deux méthodes, même associées, ne permettent pas de détecter toutes les souches résistantes. Dans le cadre du Résapath, une nouvelle méthode compatible avec l'activité des laboratoires d'analyses vétérinaires a récemment été proposée et doit être testée en routine (Jouy *et al.*, 2017).

Quelle que soit la décision à venir sur le statut de la colistine, cette molécule fait d'ores et déjà l'objet d'une surveillance particulière, tant du point de vue de l'usage que de la résistance. Cette surveillance est amenée à s'améliorer dans les années à venir, mais la diminution de son usage est déjà amorcée.

## Références bibliographiques

- 1 Anses, 2015. Avis relatif à la saisine n°2015-SA-0118 concernant les antibiotiques critiques pour la santé humaine et animale. Maisons-Alfort, France.
- 2 Anses, 2016a. Avis relatif à la saisine n°2016-SA-0160 concernant l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire. Maisons-Alfort, France.
- 3 Anses, 2016b. Résapath - Réseau d'épidémiologie de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales, bilan 2015. Lyon et Ploufragan-Plouzané, France, 152p.

- 4 Anses, ANMV, 2016. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2015. Maisons-Alfort, France, 97p.
- 5 ANSM, 2013. Caractérisation des antibiotiques considérés comme « critiques ». Rapport d'expertise, 16p.
- 6 ECDC, 2016. Plasmid-mediated colistin resistance in enterobacteriaceae. Rapid risk assessment. [http://ecdc.europa.eu/en/publications/\\_layouts/forms/Publication\\_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1514](http://ecdc.europa.eu/en/publications/_layouts/forms/Publication_DispForm.aspx?List=4f55ad51-4aed-4d32-b960-af70113dbb90&ID=1514)
- 7 EFSA, ECDC, 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal, 14(2): 4380, 207pp.
- 8 EMA, 2013. Use of colistin products in animals within the European Union: Development of resistance and possible impact on human and animal health. EMA/755938/2012.
- 9 EMA, 2014. Answers to the requests for scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. EMA/381884/2014.
- 10 EMA, 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. EMA/CVMP/CHMP/231573/2016.
- 11 EMA, EC, 2015. Décision adoptée le 16 mars 2015 suite à un référé pris au titre de l'article 35 de la directive 2001/82/CE relative aux médicaments vétérinaires et concernant toutes les AMM de formes orales de colistine. EMA/EC/2015.
- 12 EMA, ESVAC, 2015. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2013. EMA/387934/2015.
- 13 Haenni, M., Métayer, V., Gay, E., Madec, J.Y., 2016a. Increasing Trends in mcr-1 Prevalence among Extended-Spectrum-beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from French Calves despite Decreasing Exposure to Colistin. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 6433-6434.
- 14 Haenni, M., Poirel, L., Kieffer, N., Chatre, P., Saras, E., Métayer, V., Dumoulin, R., Nordmann, P., Madec, J.Y., 2016b. Co-occurrence of extended spectrum beta lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. Lancet Infect. Dis. 16, 281-282.
- 15 Jouy, E., Haenni, M., Le Devendec, L., Le Roux, A., Chatre, P., Madec, J.Y., Kempf, I., 2017. Improvement in routine detection of colistin resistance in *E. coli* isolated in veterinary diagnostic laboratories. J. Microbiol. Methods 132, 125-127.
- 16 Kempf, I., Fleury, M.A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J.Y., Jouy, E., 2013. What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? Int. J. Antimicrob. agents 42, 379-383.
- 17 Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.H., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. 16, 161-168.
- 18 Perrin-Guyomard, A., Bruneau, M., Houe, P., Deleurme, K., Legrandois, P., Poirier, C., Soumet, C., Sanders, P., 2016. Prevalence of mcr-1 in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. Euro Surveill. 21.
- 19 Skov, R.L., Monnet, D.L., 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill. 21.
- 20 Webb, H.E., Granier, S.A., Marault, M., Millemann, Y., den Bakker, H.C., Nightingale, K.K., Bugarel, M., Ison, S.A., Scott, H.M., Loneragan, G.H., 2016. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect. Dis. 16, 144-145.
- 21 Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro Surveill. 21.

(1) Décret n° 2016-317 du 16 mars 2016 relatif à la prescription et à la délivrance des médicaments utilisés en médecine vétérinaire contenant une ou plusieurs substances antibiotiques d'importance critique.

## Brève. Un nouvel astrovirus associé à une encéphalite chez le mouton *Short item. A novel astrovirus associated with encephalitis in sheep*

Didier Calavas<sup>1\*</sup>

\*Auteur correspondant: didier.calavas@anses.fr  
Anses, Laboratoire de Lyon, Unité Épidémiologie, Lyon, France

**Mots-clés: Mamastrovirus, ovins/Keywords: Mamastrovirus, sheep**

Un nouveau *Mamastrovirus* (voir Encadré) a été isolé chez deux moutons de même race appartenant au même troupeau du Pays de Galles, à neuf mois d'intervalle (Pfaff et al., 2017). Le premier animal était une brebis de quatre ans ayant présenté des troubles neurologiques: animal à part du troupeau, tremblements, aggravation de ces signes par la simulation, puis décubitus latéral; l'euthanasie a été réalisée deux jours après l'observation des signes cliniques. Le second animal était un agneau de dix jours ayant également présenté des signes neurologiques: démarche circulaire, mordillement des pattes avant et du sol, tremblements; l'euthanasie a été réalisée après dix jours d'évolution clinique.

À l'autopsie, les deux animaux présentaient une encéphalo-myéélite non suppurée du cortex cérébral et de la moelle épinière, ainsi qu'une inflammation des ganglions rachidiens dorsaux, caractéristiques d'une infection virale.

Une recherche de virus par des techniques de métagénomique a permis de mettre en évidence un nouvel astrovirus. Les deux virus entièrement séquencés chez les deux animaux ont une identité nucléotidique de 99,9 %. Sachant que ces deux virus ont été isolés dans le même troupeau à neuf mois d'intervalle, cela pose la question du cycle épidémiologique (très probablement portage asymptomatique, existence d'un réservoir naturel peu probable).

Les souches de *Mamastrovirus* peuvent être classées en trois géno-groupes qui entraînent respectivement des affections intestinales, des encéphalites ou des infections asymptomatiques. De manière remarquable, les virus du géno-groupe 2 ont été décrits dans des encéphalites chez l'Homme, le vison, les bovins et les ovins (les virus isolés dans le cas rapporté appartiennent également à ce groupe), ce qui suggère soit un ancêtre commun, soit des caractéristiques génétiques partagées. La proximité phylogénétique entre virus de ce groupe isolés de bovins et d'ovins questionne sur la transmission interspécifique de ces virus.

La portée épidémiologique de cette découverte est pour l'instant inconnue. Quoi qu'il en soit, la recherche d'astrovirus pourrait entrer dans le diagnostic différentiel des affections à expression neurologique chez le mouton, incluant en particulier le louping ill (flavivirus transmis par des tiques de l'espèce *Ixodes ricinus*, présent

principalement au Royaume-Uni, mais aussi dans le Pays basque espagnol, en Norvège, Bulgarie et Turquie) ou encore la tremblante dans sa forme classique.

### Références bibliographiques

De Benedictis P, Schultz-Cherry S, Burnham A, Cattoli G. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect Genet Evol.* 2011 Oct;11(7):1529-44. doi: 10.1016/j.meegid.2011.07.024. Epub 2011 Aug 5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843659>

Pfaff F, Schlottau K, Scholes S, et al. A novel astrovirus associated with encephalitis and ganglionitis in domestic sheep. *Transbound Emerg Dis.* 2017;00:1-6. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12623/abstract>

### Encadré. Les astrovirus

Les virus de la famille des *Astroviridae* sont des virus à ARN à simple brin, que l'on rencontre très largement chez les mammifères dont l'Homme (*Mamastrovirus*) et les oiseaux (*Avastrovirus*). Le premier virus de cette famille a été décrit en 1975. De tels virus ont été décrits chez plus d'une vingtaine d'espèces d'animaux domestiques (bovins, ovins, porcins, volailles, chats, chiens, rats...) et d'animaux sauvages terrestres et aquatiques (De Benedictis et al., 2011). Chez l'Homme, ils sont responsables de diarrhée et de gastro-entérites chez les bébés, les jeunes enfants, les personnes immunodéprimées et les personnes âgées. Ils ont été associés avec des diarrhées chez l'agneau. La transmission est oro-fécale et on ne connaît pas de vecteur ni de réservoir naturel de ces virus.

Chez l'animal, ils ont également été décrits dans des hépatites chez les canards ou des néphrites chez le poulet. Des encéphalites à astrovirus ont été observées chez des patients immunodéprimés, des bovins et des visons.

La grande variété d'espèces touchées, la diversité génétique et l'existence de recombinaisons suggèrent des transmissions interspécifiques, avec des adaptations virales à de nouveaux hôtes subséquentes à des transmission interspécifiques (De Benedictis et al., 2011).

Directeur de publication: Roger Genet  
Directeur associé: Patrick Dehaumont  
Comité de rédaction: Didier Boisseleau, Anne Brisabois, Corinne Danan, Benoît Durand, Françoise Gauchard, Pascal Hendrikx, Paul Martin, Elisabeth Repérant, Sylvain Traynard  
Rédacteur en chef: Didier Calavas  
Rédactrices en chef adjointes: Anne Bronner, Corinne Danan

Editeur scientifique: Julien Cauchard  
Responsable d'édition: Fabrice Coutureau  
Assistante d'édition: Céline Leterq  
Anses - [www.anses.fr](http://www.anses.fr)  
14 rue Pierre et Marie Curie  
94701 Maisons-Alfort Cedex  
Courriel: [bulletin.epidemiolo@anses.fr](mailto:bulletin.epidemiolo@anses.fr)

Conception et réalisation: Parimage  
Crédits photos: Anses, Parimage  
Impression: Bialec  
23 Allée des Grands Pâquis - 54180 Heillecourt  
Tirage: 3500 exemplaires  
Dépôt légal à parution/ISSN 1630-8018

