APERÇU DE LA PRESENCE DE VARIANTS DU VIRUS DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE EN PRODUCTIONS AVICOLES EN FRANCE EN 2016, ET DONNEES DE PROTECTION VACCINALE

Blond Françoise[1], Boelm Gert-Jan[2], Gaillard Nathalie[3], Vancraeynest Dieter[4], Ledoux Anne-Laure[3], Geerligs Harm[4]

[1] Zoetis ZA Le Haut Montigné, Torcé, 35370, France
[2] GD Animal Health, Arnsbergstraat 7,7400 AA Deventer, Pays-Bas
[3] Zoetis, Bâtiment VIVA, 10, Rue Raymond David, 92240 - Malakoff, France
[4] Zoetis, Mercuriusstraat 20, B-1930 Zaventem, Belgique

Auteur de correspondance : francoise.blond@zoetis.com

RÉSUMÉ

La bronchite infectieuse (BI), maladie virale contagieuse des volailles de genre *Gallus*, est causée par un virus à ARN de la famille des Coronaviridés. La plasticité de son génome permet l'émergence régulière de variants du virus (IBV), pouvant alors échapper à la protection vaccinale des volailles.
Depuis 2002, Zoetis met un service de diagnostic moléculaire (RT-PCR qualitative) de la BI à disposition des prescripteurs d'Europe et du Moyen-Orient. Depuis 2014, ce service basé en France (35), recherche les variants pertinents de l'IBV, y compris les plus récents. Il a permis de réaliser près de 2 500 analyses en 2015. Sur le premier semestre de 2016, en France, près des trois quarts (73 %) des échantillons soumis provenaient de poulets de chair, un cinquième (19 %) de pondeuses, puis des poulets de chair label (3 %), et poulets de chair certifiés, reproducteurs chair ou ponte et pondeuses bio (1 % chacun). Le variant QX a été identifié dans 5,7 % des prélèvements (en production chair comme ponte), et peut être incriminé dans 4,1 % des cas (Ct précoce et/ou signes cliniques). Le variant 2 (IS/1494) n'a pas été mis en évidence. Le variant Q1, inclus plus récemment dans cette batterie des tests, n'a pas été identifié.
Pour évaluer le niveau de protection vaccinale offert par l'utilisation des vaccins vivants atténués Poulvac® IB H120 et Poulvac® IB QX à un jour d'âge, une épreuve virulente sur oiseaux EOPS a été réalisée avec ces variants, à trois semaines d'âge. Les taux de protection observés (tests de ciliostase réalisés 5 jours post-inoculation) étaient de 100%, 95 %, 80 % et 50 % vis-à-vis de la souche 793B et des variants QX, Q1 et 2, respectivement. Le niveau de protection obtenu pour d'autres associations de valences de vaccins du commerce sera discuté.

ABSTRACT
Overview of the presence of infectious bronchitis virus variant strains in the French poultry industry in 2016, and vaccine protection data

Infectious bronchitis (IB), a contagious viral disease of poultry of the *Gallus* species, is caused by an RNA virus, belonging to the *Coronaviridae* family. Its genome plasticity allows the regular emergence of variant viruses (IBV), which might evade vaccine protection.
Since 2002, Zoetis has been offering a molecular diagnostic service (qualitative RT-PCR) for IBV to poultry practitioners in Europe and the Middle-East. Since 2014, this service performed in France (35) routinely screens for the relevant IBV variants, including the most recent ones. In 2015, nearly 2,500 analysis were performed. Over the first semester of 2016, in France, nearly three quarters (73%) of the submitted samples were from broilers, one fifth (19%) from laying hens, 3% from free-range and certified broilers, while 1% were from broiler breeders, 1 % from laying breeders and 1 % from organic laying hens. The QX variant was identified in 5.7% of the samples (in broilers as well as in laying hens), and could be associated to 4.1% of the cases (early Ct and/or clinical signs). Variant 2 (IS/1494) was not found. The Q1 variant, more recently added to this assay, was not identified either.
In order to evaluate the level of vaccine protection achieved by the attenuated live vaccines Poulvac® IB H120 and Poulvac® IB QX delivered by eye-drop at day old, a challenge was performed on 3-week-old SPF chickens with these variants. The observed protection rates (ciliostasis tests performed 5 days post-inoculation) were 100%, 95%, 80% and 50% towards strain 793B and variants QX, Q1 and 2, respectively. The protection level achieved by another association of vaccines is discussed.

INTRODUCTION

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire (IBV) est l'un des virus respiratoires les plus prévalents dans les productions avicoles actuelles. Différents sérotypes sont décrits dans le monde, et le niveau de protection croisée produit par les vaccins du commerce vis-à-vis des différents sérotypes de l'IBV est fortement variable. En outre, la plasticité de son génome (ARN), alliée à ce degré variable de protection croisée expliquent pour partie l'émergence répétée de variants viraux, échappant au spectre de protection des vaccins disponibles. C'est dans une perspective de surveillance qu'un service de diagnostic centralisé a été mis en place pour l'Europe et le Moyen-Orient par Zoetis. En parallèle, des expérimentations explorent l'efficacité des vaccins existants sur des variants présents et/ou émergents en associant des vaccins vivants contre l'IBV dans un même protocole vaccinal. L'arrivée sur le marché de vaccins contre le variant QX, largement présent en Europe, permet aussi d'évaluer des protocoles associant un tel vaccin avec un autre plus classique (contre les souches de type Massachussetts) dans la protection contre de nouveaux variants, déjà détectés dans certains pays européens, et de permettre aux prescripteurs d'anticiper l'impact de tels variants s'ils devenaient présents dans la filière de leur pays.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Service diagnostic

Un service centralisé de diagnostic moléculaire de l'infection par le virus IBV a été mis en place par Zoetis à partir de 2002 auprès des prescripteurs en aviculture, pour l'Europe, le Proche- et le Moyen-Orient. Initialement dédié à la détection des génotypes dominants, ce service a progressivement été enrichi par la détection des variants majeurs du virus IBV ayant été décrits (par exemple apparition du variant QX-like en Europe dès 2004). La technique de RT-PCR qualitative en temps réel, avec des amorces sélectionnées sur une région du gène S1 de ce Coronavirus permet d'identifier les génotypes pertinents (OIE, 2012). La technique utilise des kits commerciaux et est appliquée aux écouvillons oropharyngés ou cloacaux.
Parmi les génomes de variants récemment ajoutés à la batterie de tests RT-PCR réalisés de manière systématique sur les prélèvements reçus figurent :

- Le variant QX (Worthington, 2008)
- le variant 2 (ou Israël 2 – Susan, 2010),
- le variant Q1 (Toffan, 2001).

L'interprétation des résultats de RT-PCR se fait en confrontant les commémoratifs transmis par le prescripteur (en particulier sur le schéma vaccinal des oiseaux du lot et présence ou non de signes cliniques) aux résultats de PCR (valeur de Ct : précoce, moyen ou tardif). Un Ct précoce pour une souche vis-à-vis de laquelle il n'y a pas de valence vaccinale utilisée dans l'élevage, associé avec des signes cliniques évocateurs de bronchite infectieuse est compatible avec la circulation d'une souche de terrain. À l'inverse, un Ct tardif vis-à-vis d'une souche 793B dans un élevage où cette valence vaccinale a été utilisée est plus probablement indicateur de la détection de la souche vaccinale, et ce, en particulier, en l'absence de signes cliniques.

1.2. Essais de protection vaccinale

L'efficacité attendue de différentes associations de vaccins actuellement commercialisés vis-à-vis de variants QX, Q1 et variant 2, ainsi que de la souche 793B a été évaluée dans une série de quatre essais conduits en station expérimentale (GD, Deventer, Pays-Bas). Ces quatre essais ont été conduits en conformité avec la monographie 0442 (section 2-4-3-1) de la Pharmacopée européenne et selon les conditions standards du site de recherche évitant toute contamination.
Dans chaque essai, 72 poussins d'un jour, de statut EOPS ont été tirés au sort pour inclusion dans l'un des 3 groupes expérimentaux (24 poussins par groupe), qui ont reçu une vaccination par goutte oculaire (0,05 ml) au jour de l'inclusion (J0), avec :

- le vaccin Poulvac® IB H120 et le vaccin Poulvac® IB QX (groupe P) ;
- les vaccins vivants d'une autre gamme reposant sur la souche Massachussetts (Ma5) et 4/91 (groupe N) ;
- aucun vaccin (groupe T).

Les oiseaux faisaient l'objet d'un examen clinique individuel au moins une fois par jour. Les anomalies cliniques (retard de croissance cloaque sale, écoulement occulonasal, dyspnée, toux et plumes ébouriffées) étaient notées individuellement et ont fait l'objet d'une compilation sur la période J0-J25.
Tous les opérateurs étant intervenus par la suite ont effectué les manipulations en aveugle vis-à-vis de la nature des vaccins utilisés pour chaque groupe.
Vingt jours plus tard (J20), ces groupes ont fait l'objet d'une épreuve virulente avec : soit le variant QX (10^4 log EID_{50} , voie oculaire 0,05 ml par oiseau), soit le variant Q1 10^5 EID_{50} voie oculaire, 0,05 ml par oiseau soit le variant 2 10^5 EID_{50} voie oculaire, 0,05 ml par oiseau soit la souche 793B (10^5 EID_{50}, voie oculaire, 0,1 ml par oiseau). Chaque oiseau a fait l'objet d'une notation individuelle pour les signes cliniques respiratoires, de 0 à 3 :
0 – Pas de respiration anormale
1 – Légers/rares râles trachéaux, entendus après avoir provoqué le déplacement du poulet
2 – Râles trachéaux modérés/fréquents, mais pas continus, entendus après avoir provoqué le déplacement du poulet
3 – Râles trachéaux marqués et continus
Les notes cliniques ont été additionnées pour chaque groupe dans chaque essai, et ont été analysées par le test non paramétrique de Kurskal-Wallis.
Cinq jours plus tard (J25), les oiseaux ont été sacrifiés (injection IV de penthobarbital sodique) et leur trachée a été prélevée. Le test de ciliostase, a été réalisé, en conformité avec la Pharmacopée Européenne, sur 20 sujets tirés au sort dans chaque groupe comprenant 24 animaux.
Brièvement, pour chaque trachée, 10 sections transversales (0,5 à 2 mm de large) ont été placées dans un milieu approprié, à 37° C puis ont été examinées en microscopie optique (40-100x). L'activité ciliaire a été notée pour trois sections de chaque partie (supérieure, moyenne et inférieure) de la trachée, pour chaque oiseau. Cette observation était réalisée dans les 2 h suivant le prélèvement ; la notation était de 0 si plus de 50 % d'une section présentait des mouvements ciliaires et de 1 si moins de 50 % en présentait. Un oiseau était considéré comme non affecté (protégé) si au moins 9 des 10 sections présentaient une activité ciliaire normale. Pour chaque oiseau, son statut (protégé ou non) a été déterminé, et pour chaque groupe, la note totale d'activité ciliaire (somme des notes individuelles) et le taux de protection (nombre de sujets protégés sur nombre de sujets inoculés) ont été calculés. Les différences de proportions d'oiseaux protégés entre les groupes (comparaisons par paires ont été réalisées entre les groupes vaccinés et non-vaccinés) ont été évaluées avec le test exact de Fischer.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Service diagnostic

Le service diagnostic a permis de réaliser près de 2 500 analyses en 2015, et à l'automne 2016, il était estimé que l'année porterait sur 2 000 échantillons analysés, venus d'Europe, et du Proche-comme du Moyen-Orient.
Sur le premier semestre de 2016, en France, 130 échantillons ont été soumis par les prescripteurs et analysés. Moins de un dixième (8/130) ont été trouvés négatifs pour le génome de l'IBV.
Près des trois quarts (73 %) de ces échantillons provenaient de poulets de chair, un cinquième (19 %) de pondeuses, puis des poulets de chair label (3 %), et poulets de chair certifiés, reproducteurs chair ou ponte et pondeuses bio (1 % chacun).
La souche 793B a été identifiée dans 77,1 % des prélèvements (94/122) ; dans un tiers de ces cas (33/94), sa présence était compatible avec la détection d'un virus vaccinal. Dans près de la moitié des cas (45/94), la confrontation des niveaux de Ct et des signes cliniques indiquait une présence compatible avec la circulation d'une souche du terrain.
Le variant QX a été identifié dans 5,7 % des prélèvements (7/122) en productions chair comme ponte, et peut être incriminé (Ct précoce et signes cliniques ou Ct précoce et contamination vaccinale non possible) dans 5 de ces cas 4,1 % des cas confirmant la présence de ce variant en France.
À l'automne 2016, le variant 2 n'avait pas été mis en évidence en France, ni dans la majorité des Etats membres de l'U.E.
Le variant Q1, inclus dans cette batterie de tests à l'été 2016, n'avait pas été identifié dans les prélèvements reçus.
À titre de comparaison, en Pologne et sur la même période, le variant QX a été détecté dans 39,3 % des prélèvements (valence absente des programme vaccinaux) et le variant 2 dans 36,7 % d'entre eux, avec 12,0 % des prélèvements positifs pour les génomes des deux variants. Ces dernières données reposent sur l'analyse d'environ 50 échantillons mensuels, de bonne qualité (nombre négligeable d'échantillons inexploitables).

2.2. Essais de protection vaccinale

Sur les anomalies cliniques relevées sur la période J0-J25, il n'a pas été observé de différence d'occurrence entre les groupes vaccinés, qui ont tous deux présenté un nombre d'anomalies cliniques proche au sein d'un essai (voir le tableau 1). Toutefois, la compilation du nombre d'anomalies cliniques relevées dans les quatre études fait apparaître une moindre occurrence dans les groupes P. Bien que non traitées statistiquement, ces données suggèrent que la tolérance des vaccins vivants utilisés dans le groupe P est au moins aussi bonne que celle des vaccins utilisés dans le groupe N.
Sur la protection croisée vis-à-vis des quatre souches d'épreuve, les données d'activité ciliaire font clairement apparaître qu'il n'y a pas de différence de protection évaluée par le taux de protection ou par la note totale d'activité ciliaire entre les groupes P et N (voir le tableau 2). Ces essais confirment que les deux associations vaccinales testées ont une efficacité préventive significative vis-à-vis des variants QX, Q1, variant 2 et de la souche 793B, et que cette efficacité n'est pas significativement différente dans les groupes P et N. Enfin, vis-à-vis du variant 2, les niveaux de protection obtenus, bien que significativement supérieurs à celui du lot non vacciné, ne sont pas satisfaisants.
Sur les notes cliniques relevées après l'épreuve virulente, il n'y avait pas de différence entre les groupes vaccinés et le groupe témoin négatif pour les épreuves virulentes avec les variants QX et variant 2, ni avec la souche 793B (voir le tableau 3), même si la note clinique totale est systématiquement plus élevée dans le groupe témoin négatif par rapport aux groupes vaccinés. Dans l'essai avec l'épreuve virulente à variant Q1, les deux groupes vaccinés présentent une note clinique totale significativement plus faible que le groupe témoin négatif. Il n'y a pas de différence pour la note clinique totale entre ces deux groupes P et N : les associations vaccinales testées ont une efficacité préventive comparable.
Vis-à-vis de la souche 793B et du variant 2, ces résultats sont en cohérence avec les niveaux de protection obtenus pour les mêmes associations de vaccins vivants et publiés fin 2016 (Bru, 2016).

CONCLUSION

L'activité diagnostique développée par Zoetis sur les virus de la bronchite infectieuse permet de disposer d'une indication de la présence et de la prévalence des variants de ce virus dans les pays concernés. Elle confirme la présence du variant QX et l'absence des variants Q1 et 2 en France.
Les essais de protection vaccinale montrent qu'en association deux vaccins vivants (l'un contre le variant QX et l'autre une souche Massachussetts-like) d'un même fabricant dans un programme vaccinal, il est possible d'obtenir un taux de protection élevé vis-à-vis des variants QX, Q1 et 793B, mais que le taux de protection vis-à-vis du variant 2 n'est satisfaisant pour aucune des deux associations vaccinales testées. Il n'y a pas de différence au regard des résultats de test de ciliostase ni du score clinique après épreuve virulente sur les oiseaux vaccinés par les deux protocoles testés, pour aucun des virus utilisés. Les deux associations vaccinales ont des performances comparables en termes de protection contre les souches actuellement présentes en France. En revanche, les signes cliniques relevés post-vaccination dans cet essai (analyse statistique non réalisée) semblent plus limités avec les vaccins de la gamme Poulvac®.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bru T., 2016. Av. Pathol., (published ahead of print) 7 p.
OIE, 2012. In : Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres de l'OIE, 7e éd., chapitre 2.3.2 (version de 2013)- http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf
Pharmacopée européenne, 2005. Monographie n° 0442.
http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/09_monographs_on_vaccines_for_veterinary_use/Avian%20infectious%20bronchitis%20vaccine%20(live).pdf
Susan S., 2010. J. Am. Sci. (6), 669-675
Toffan A., 2011. Vet. Rec. (169) 212-213. - http://veterinaryrecord.bmj.com/content/169/8/212.2.full?ijkey=377ec91f04e6cf8da2327efb0523f67520e0a681&keytype2=tf_ipsecsha
Wang Y. D., 1998. Chin. J. Anim. Quarant., (15), 1-3.
Worthington K. J., 2008. Av. Pathol. (37) 247-257.

Tableau 1. Nombre d'anomalies cliniques observées entre la vaccination (J0) et l'épreuve virulente (J21) dans chacun des quatre essais.

Traitement	Retard de croissance	Cloaque sale	Écoulement occulonasal	Dyspnée	Toux	Plumes ébouriffées
Epreuve virulente à IB QX						
Groupe P	2	13	12	14	6	7
Groupe N	2	5	29	22	27	13
Témoin négatif	2		1			
Epreuve virulente à IB Q1						
Groupe P		23	39	29	49	3
Groupe N	8	14	41	25	55	9
Témoin négatif						2
Epreuve virulente à IB 793B						
Groupe P		11	21	6	61	13
Groupe N		70	14	11	54	11
Témoin négatif		18				
Epreuve virulente à variant 2						
Groupe P	8	2	12	1	12	3
Groupe N	9	61	17	18	67	7
Témoin négatif	9	9		2	5	4
Total quatre essais						
Groupe P	10	49	84	50	128	26
Groupe N	19	150	101	76	203	40
Témoin négatif	11	27	1	2	5	6

Tableau 2. Résumé des résultats de protection croisée des quatre essais, chez les poulets vaccinés avec les associations vaccinales (groupes P et N) à J0 et éprouvés à J21, par rapport au groupe témoin négatif (non vacciné).

Traitement	Taux de protection¥	Note de ciliostase totale
Epreuve à IB QX		
Groupe P	95% (19/20)^{B}	10
Groupe N	90% (18/20)^{B}	6
Témoin négatif	0% (0/20)^{A}	200
Epreuve virulente à IB Q1		
Groupe P	80% (16/20)^{B}	24
Groupe N	90% (18/20)^{B}	21
Témoin négatif	5% (1/20)^{A}	172
Epreuve virulente à IB 793B		
Groupe P	100%^{A}	0
Groupe N	100%^{A}	0
Témoin négatif	5%^{B}	190
Epreuve virulente à IB variant 2		
Groupe P	50%^{A}	80
Groupe N	50%^{A}	76
Témoin négatif	0%^{B}	199

¥ : Des lettres différentes en exposant dans une même colonne indiquent une différence statistiquement significative (P<0,05)

Tableau 3. Résumé des notes cliniques des quatre essais, chez le poulets vaccinés avec les associations vaccinales (groupes P et N) à J0 et éprouvés à J21, par rapport au groupe témoin négatif (non vacciné), sur les 5 jours suivant l'épreuve virulente.

Traitement	Note clinique				
	0	1	2	3	Total¥
Essai avec l'épreuve virulente à IB QX					
Groupe P	18	2	0	0	2^{A}
Groupe N	19	1	0	0	1^{A}
Témoin négatif	12	6	2	0	8^{A}
Essai avec l'épreuve virulente à IB Q1					
Groupe P	17	2	1	0	4^{B}
Groupe N	18	2	0	0	2^{B}
Témoin négatif	8	3	6	3	24^{A}
Essai avec l'épreuve virulente à IB 793B					
Groupe P	18	2	0	0	2^{A}
Groupe N	17	3	0	0	3^{A}
Témoin négatif	15	4	1	0	6^{A}
Essai avec l'épreuve virulente à IB variant 2					
Groupe P	16	3	0	1	6^{A}
Groupe N	13	7	0	0	7^{A}
Témoin négatif	11	5	4	0	13^{A}

¥ Des lettres différentes en exposant dans une même colonne indiquent une différence statistiquement significative ($P<0,05$)