

EFFICACITE D'UN DESINFECTANT A BASE DE COMPOSES D'AMMONIUM QUATERNAIRE ET DE GLUTARALDEHYDE CONTRE LE VIRUS DE LA GRIPPE AVIAIRE

Claeys Elie¹, Grab Larry¹, Ledoux Luc¹, Rodríguez González Elisabet¹

¹ CID LINES an Ecolab Company Waterpoortstraat 2, 8900 Ieper, Belgium

elien.claeys@cidlines.com

RÉSUMÉ

Influenza aviaire (IA) est une maladie virale hautement contagieuse qui affecte plusieurs espèces d'oiseaux. Les épidémies impactent la santé animale et publique, le commerce et l'économie des pays touchés. Le rôle essentiel d'une bonne hygiène dans les élevages pour atténuer les risques liés à l'IA, a conduit à mener une série d'études pour valider l'efficacité virucide d'un désinfectant à large spectre composé d'ammonium quaternaire (QAC) et de glutaraldéhyde (VIROCID®). Trois études indépendantes en laboratoire ont été réalisées, utilisant des méthodes et des procédures distinctes pour examiner l'efficacité virucide de ce désinfectant VIROCID® contre trois souches virales de sous-types différents (H5N1, H5N8, H9N2). Toutes les études ont montré une grande efficacité du VIROCID® contre différentes souches d'IA dans diverses conditions, démontrant ainsi son efficacité en tant que programme efficace contre la grippe aviaire, toutes à la dilution de 0,25%.

ABSTRACT

EFFICACY OF A DISINFECTANT BASED ON QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS AND GLUTARALDEHYDE AGAINST AVIAN INFLUENZA VIRUS

Avian Influenza (AI) is a highly contagious viral disease that affects several bird species. Epidemics impact animal and public health, trading and the economies of affected countries. The essential role of good hygiene in livestock farms to mitigate the risks linked to AI has led to a series of studies being carried out to validate the virucidal effectiveness of a broad- spectrum disinfectant composed of quaternary ammonium (QACs) and glutaraldehyde (VIROCID®). Three independent studies were performed, using distinct methods and procedures to examine the virucidal effectiveness of this VIROCID® disinfectant against three different viruses (H5N1, H5N8, H9N2). All studies showed high effectiveness of VIROCID® against different AI strains under various conditions, demonstrating its efficacy as an effective program against Avian Influenza, all at 0,25% dilution.

INTRODUCTION

L'influenza aviaire (IA) est une maladie virale très contagieuse qui touche les oiseaux domestiques et sauvages. Les virus de la grippe aviaire ont également été isolés, bien que moins fréquemment, chez des espèces de mammifères, y compris chez l'homme. Cette maladie complexe est causée par des virus divisés en de multiples sous-types présentant un taux de mutation élevé, de sorte qu'elle évolue rapidement. La maladie est répandue dans le monde entier, mais certains sérotypes sont plus présents que d'autres dans différentes régions du monde, ce qui rend la lutte contre la maladie encore plus difficile.

Les virus de la grippe A qui infectent les volailles peuvent être divisés en deux groupes différents en fonction de la gravité de la souche : 1) l'influenza aviaire faiblement et moyennement pathogène (IAFP) qui provoque généralement peu ou pas de signes cliniques. 2) l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) qui peut entraîner des signes cliniques graves et des taux de mortalité élevés, proches de 100 %. L'IAFP peut muter en IAHP.

Son impact et son importance ne sont pas seulement liés au taux de mortalité élevé qui affecte la production de volailles, mais aussi à l'impact négatif qu'il a sur le commerce de la viande et, donc, sur l'économie.

Pour éviter son impact, la désinfection des matériaux contaminés par l'influenza aviaire est un aspect essentiel du processus de prévention et de contrôle des foyers d'influenza aviaire. La sélection d'un désinfectant ayant prouvé son efficacité contre le virus de l'influenza aviaire est indispensable pour une utilisation en routine.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Essai 1 : Laboratory Evaluation of a virucidal agent against High Pathogenic Avian Influenza Virus, H5N1 subtype.

Le laboratoire de l'OIE-FAO et le Laboratoire National de Référence pour la maladie de Newcastle et l'Influenza Aviaire ont appliqué la méthode "Use-dilution test" utilisé par l'Association of Official Agricultural Chemists (protocole Nordaméricain) pour évaluer l'efficacité des désinfectants contre les bactéries. La procédure comprend : a) un test de toxicité du désinfectant sur des embryons de poulet SPF à la dilution recommandée (0,25%) ; b) l'évaluation de l'activité du désinfectant à la dilution recommandée. L'isolat (A/duck/Vietnam/12/05 containing $10^{7.5}$ EID₅₀/ml) viral H5N1 AI a été obtenu auprès d'un centre national de diagnostic vétérinaire à Ha Noi (Viêt Nam). Le virus a été titré par une

technique virologique standardisée. La suspension virale titrée a été utilisée pour produire 60 mL de liquide allantoïque infecté par le virus H5N1. Des anneaux stériles en acier inoxydable ont été utilisés comme supports (8 mm x 10 mm x 2 mm).

Essai 2: H5N8, par Wageningen Bioveterinary Research, Pays-Bas.

Cette étude a pour but de tester l'efficacité de Virocid® contre la grippe aviaire et d'examiner la dilution efficace du désinfectant. Les matériaux sont les suivants : a) isolat HPAI H5N8 (A/dk/Neth/16014829-001005-2016), b) cellules MDCK, c) DMEM additionné de glutamax + 5% SVF + 0,1% pénicilline, d) eau dure comme diluant et e) solutions de salissure toutes deux conformes à la norme européenne NF - EN 14675, et enfin, f) un milieu désinfectant neutralisant DMEM additionné de glutamax + 5% FCS + 0,1% pénicilline.

Un échantillon du produit dilué avec de l'eau dure est ajouté à une suspension de virus : 1 volume (V) de la suspension de virus est mélangée à 1 V de l'eau dure contenant l'agent de salissure. Huit La désinfectant dilué à 1,25 fois la concentration finale est ajoutée (8V) au mélange et placée dans un bain-marie. Le mélange est maintenu au bain-marie à 10°C ± 1°C pendant 5 et 30 min. ± 10 s. À la fin du temps de contact, une partie du mélange est prélevée et diluée dix fois dans un milieu glacé pour neutraliser l'activité virucide. Des dilutions de 10E-2 et 10E-7 de l'échantillon sont réalisées et sont testées immédiatement ou conservées à -70°C. Pour le titrage au point final ; les plaques sont incubées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5 % de CO₂ pendant quatre jours. Après avoir été lavées, séchées et congelées, les plaques sont lues au microscope et jugées pour la présence du virus. Les titres sont calculés selon la méthode de Spearman-Kärber.

Essai 3: H9N2, par un test commercial Microbiotest Inc, (États-Unis) basé sur l'évaluation de la toxicité.

Ce test est conçu pour prouver l'efficacité virucide. L'essai est conçu pour simuler l'utilisation par le consommateur et est conforme aux directives de l'EPA DIS/TSS-7, et suit la procédure décrite dans la méthode d'essai de l'American Society for Test Materials (ASTM) désignée E-1053-97. Les matériaux utilisés pour le test suivant sont les suivants: Virus de l'influenza aviaire, souche Turkey/Wis/ 66 (H9N2) des laboratoires Charles River ; œufs de poule embryonnés comme hôte, composé d'ammonium quaternaire et glutaraldéhyde comme ingrédient actif dilué à 1:400, SVF contenant 0,1 % de glycine comme neutralisant, 400 ppm d'eau dure synthétique AOAC et 5 % de charge organique, Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) et SVF + 0,1 % de glycine comme réactifs et milieux. Dans des conditions de test de 10 minutes à température

ambiante de 25 °C. Pour réaliser le test, une aliquote de 0,2 mL de virus stock a été étalée sur des boîtes de Petri pré-stérilisées et laissée sécher pendant 30 à 60 min à température ambiante. Puis, 2,0 mL de désinfectant ont été ajoutés et laissés en contact pendant 10 minutes. Plus tard, le mélange a été racle de la surface, ce qui a permis d'obtenir une réduction proche d'une dilution de 1 log₁₀. Le mélange inoculum neutralisé/désinfectant (0.2 mL) ont été inoculés par voie intra-allantoïque dans des œufs embryonnés et incubés pendant 5 à 7 jours à 37+/- 2°C. Les embryons morts ont été jetés et enregistrés et après une période d'incubation complète, les œufs ont été mirés puis conservés à 2 +/- 2°C pendant la nuit. Ensuite, le liquide allantoïdien a été récolté et analysé pour détecter la présence du virus répliquant en utilisant le test d'héماغglutination suivant la norme SOP 1006.11 et en le comparant à un contrôle négatif.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'essai 1, ayant pour objet l'évaluation en laboratoire du désinfectant comme agent virucide contre le virus de la grippe aviaire hautement pathogène, sous-type H5N1, Souche A/canard/Vietnam/12/05 contenant 10^{7.5}EID₅₀/mL, a montré que lorsque le Virocid® est appliqué à 0,25% et dans des conditions expérimentales du test AOAC (5% de matière organique et 400 ppm eau dure), il n'est pas toxique pour le développement des embryons de poulet et capable d'inactiver complètement la suspension virale analysée. Le Virocid® est efficace à la concentration de 0,25%. (Tableau 1.).

Résultats du deuxième essai pour le désinfectant à 0,25%, 0,5% et 1% en présence de souillures organiques (3g/L de BSA) à 10°C pendant 5 et 30 min d'incubation selon la norme NF - EN 14675 ont montré une réduction du titre viral important (5.25-5.38 Log₁₀) supérieure à ce qui est exigé dans la norme (au moins 4 log₁₀). Virocid® est montré

efficace au cours de cet essai réalisé selon la norme NF EN 14675 à la concentration de 0,25%. (Tableau 2.).

Le troisième essai de validation est basé sur la démonstration de l'efficacité dans des conditions très complexes de dosage 1:400 (0,25%), 10 min. temps de contact, à 25°C et 400 ppm de matières organiques et d'eau dure synthétique. Virocid® a démontré son efficacité dans la réduction de la souche Turkey/Wis/66 (H9N2) dans les œufs embryonnés en (>4 log₁₀ à la dose de 0,25%. (Tableau 3.).

CONCLUSION

Le virus de la grippe aviaire est présent dans le monde entier et affecte fortement la production de volailles, provoquant de nombreuses pertes non seulement en raison de la mortalité et de la morbidité élevées, mais aussi en raison de l'impact créé par les animaux abattus et les restrictions commerciales.

Afin d'éviter son impact important, un programme de biosécurité complet doit être mis en place pour éviter l'entrée du virus dans les élevages de volailles.

Pour réduire son impact, des mesures de nettoyage et de désinfection sont nécessaires pour éviter la propagation du virus. Le choix d'un bon programme de nettoyage et de désinfection est crucial pour obtenir un succès et une performance optimale.

Virocid® a démontré son efficacité à la concentration de 0,25% contre le virus de la grippe aviaire, et plus précisément contre les souches d'IAHP, en suivant trois méthodes différentes reconnues. Ce produit désinfectant, enregistré et approuvé dans les listes de plus de 100 pays s'avère un choix approprié pour son application dans le cadre de mesures de biosécurité appliquées en production avicole contre l'IA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CEC (1992). Directive 92/40/CEE du Conseil du 19 mai 1992 établissant des mesures communautaires de lutte contre l'influenza aviaire. *Journal officiel de la Commission européenne*, L 167, 1-15
- Davison S., Benson C. E., Ziegler A. F. & Eckroade R. J. (1999). Évaluation de la désinfection avec l'ajout de composés anti-congélation contre le virus non pathogène H7N2 de la grippe aviaire. *Maladies aviaires* 43 : 533-537.
- Lorenz D. E. & Jann G. J. (1964). Utiliser le test de dilution et le virus de la maladie de Newcastle. *Applied Microbiology* 12, 1 : 24-26.
- Norme européenne EN 14675 : désinfectants et antiseptiques chimiques - Essai quantitatif en suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des désinfectants chimiques et des antiseptiques utilisés dans le domaine vétérinaire - Méthode d'essai et exigences (Phase 2, étape 1), 2015.
- PDP VIR 05 "Isolamento e tipizzazione preliminare dei virus Influezzali aviari".
- Directives de l'EPA DIS/TSS-7, novembre 1981.
- WOAH - Organisation mondiale de la santé animale - Influenza aviaire (<https://www.woah.org/en/disease/avian-influenza/>)

Tableau 1. Résultats de l'essai 1 : Évaluation en laboratoire du désinfectant comme agent virucide contre le virus de la grippe aviaire hautement pathogène, sous-type H5N1, Souche A/canard/Vietnam/12/05 suivant la méthode "Use-dilution test" utilisé par l'Association of Official Agricultural Chemists (protocole Nordaméricain)

Tableau 1 : Œufs embryonnés											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Résultats
Test de toxicité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tous vivants après 10 jours
Test d'infectivité	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Tous morts après 48 heures d'inoculation
Efficacité des désinfectants	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Tous vivants après 2 passages en aveugle

Tableau 2. Résultats des valeurs de réduction du désinfectant pour l'essai du centre Wageningen Bioveterinary Research, Pays-Bas, sous isolat HPAI H5N8 (A/dk/Neth/16014829-001005-2016)

Température	10 °C		
Salissures	3 g/L BSA		
Temps de contact (min)	5	30	120'
Concentration du désinfectant (%)	Réduction du titre viral (Log10)		
0,25	≥5,38	≥5,25	
0,50	5,25	≥5,25	
1,0	≥5,38	≥5,25	

Tableau 3. Résultats de l'essai 3 : Virus de l'influenza aviaire isolate, souche Turkey/Wis/ 66 (H9N2) par un test commercial basé sur l'évaluation de la toxicité au Microbiotest Inc, (États-Unis).

Dilution	IA titre		Récupération de la plaque de contrôle	Contrôle du titre de la colonne	Titre du stock de virus
	Lot N° 400206	Lot N° 400408			
10 ⁻¹			PNS	PNS	ND
10 ⁻²	----	----	++++	+D++	
10 ⁻³	----	----	++++	++++	
10 ⁻⁴	----	----	++++	++++	
10 ⁻⁵	----	----	++++	++++	
10 ⁻⁶	----	----	+ - + -	+ + - +	++++
10 ⁻⁷	----	----	----	----	++++
10 ⁻⁸			ND	ND	+ - + -
(ELD/EID50)/mL	≤ 10 ^{1,50}	≤ 10 ^{1,50}	10 ^{6,00}	10 ^{6,33}	≥ 10 ^{8,00}

+ : Virus IA détecté ; hémagglutination observée.
 - : aucun virus IA détecté ; aucune hémagglutination observée
 D : embryon mort rejeté
 ND : indéterminé
 PNS : échantillon post-neutralisé

