

PRELEVER L'AIR A LA PLACE DES ECOUVILLONNAGES POUR DETECTER LE VIRUS DE L'INFLUENZA AVIAIRE CHEZ LE CANARD MULARD

Keïta Alassane¹, Niqueux Eric¹, Allée Chantal¹, Ogor Katell¹, Schmitz Audrey¹, Amelot Michel¹, Courtois David¹, Le Coq Thierry¹, Thomas Rodolphe¹, Grasland Béatrice¹, Le Bouquin Sophie¹, Scoizec Axelle¹

*Anses – Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, BP 53, 22440 Ploufragan,
Alassane.keita@anses.fr*

RÉSUMÉ

Cette étude évalue la détection et la quantification du virus de l'influenza aviaire (VIA) dans des bioaérosols en animalerie confinée. Le but était d'évaluer un nouveau collecteur (Biodosi ND, codé BDS, CEA Tech) par rapport à un collecteur témoin (Coriolis ND, codé COR, Bertin Technologies). Des canards mulards ont été infectés expérimentalement par la souche de VIA A/decoy duck/France/161105a/2016 (H5N8) hautement pathogène, avec $4,6 \times 10^6$ DIE50 (titre viral) dans 100 µL d'inoculum par animal. L'excrétion virale a été suivie sur écouvillonnage individuel oropharyngé et cloacal : à J-3 (J0 = inoculation) puis à J1, J2, J3, J4, J7, J11 et J14. Aux mêmes dates, des échantillons d'air ont été prélevés par le COR (cyclonique, peu maniable) et par le BDS (portatif, autonome, basé sur la précipitation électrostatique). Pour BDS, deux protocoles ont été utilisés avec une mesure dans l'air ambiant de l'animalerie et une mesure dans la zone de respiration de deux canards placés spécifiquement dans une caisse contenant l'échantillonneur. Le temps de prélèvement variait de 10 à 60 min, selon le protocole et le jour de prélèvement, un prélèvement plus long étant réalisé à partir de J7 pour anticiper la diminution de l'excrétion virale. Les prélèvements ont été analysés par RT-PCR temps réel et la viabilité du virus vérifiée sur œufs embryonnés de poules EOPS. A partir des écouvillons, il y avait 100 % d'animaux excréteurs de J1 à J9, 70 % à J11 et 30 % à J14. Pendant la période de forte excrétion (J2 à J4), pour COR et BDS, tous les échantillons d'air étaient positifs, quantifiables et la viabilité du virus a été démontrée. De J7 à J14, bien que les écouvillons soient toujours positifs, les échantillons d'air étaient souvent négatifs, le seuil de détection n'étant pas toujours atteint malgré une augmentation du temps de prélèvement. Pour le virus testé, l'échantillonnage de l'air pourrait ainsi être un moyen prometteur, non invasif et plus respectueux du bien-être pour la surveillance de l'excrétion virale. Cependant, il semble moins sensible que le prélèvement par écouvillonnage.

ABSTRACT

Could air sampling be a substitute for individual oropharyngeal and cloacal swabs on live animals to detect avian influenza virus in Mule ducks?

This study assessed the ability to detect and quantify avian Influenza A virus (AIAV) in bioaerosols in confined facility. The aim was to evaluate a new collector (Biodosi®, coded BDS, CEA Tech) compared to a control collector (Coriolis®, coded COR, Bertin Technologies). Mule ducks were experimentally infected by ocular instillation of high pathogenicity AIAV H5N8 A/decoy duck/France/161105a/2016, with 4.6×10^6 EID50 in 100 µL per animal. Virus shedding was monitored on individual oropharyngeal and cloacal swabs: on D-3 (D being the day of infection) and then 1, 2, 3, 4, 7, 9, 11 and 14 days post-infection (dpi). On the same days as swab sampling, bioaerosols were collected using COR (cyclonic, unwieldy) and BDS (portable, self-contained and based on electrostatic precipitation). For BDS two air sampling protocols were used: in the facility and at the breathing zone of two ducks that were placed in a solid-panel crate containing the sampler. Sampling time varied from 10 to 60 min, depending on sampling protocol and day, longer sampling being used between 7 to 14 dpi to anticipate the viral excretion decrease. Samples were analysed by real time RT-PCR and viability of the virus was checked on SPF hen embryonated eggs. From swab samples, there were 100%, 70% and 30% excreting animals from 1 to 9, 11 and 14 dpi, respectively. During the period of high viral excretion (2 to 4 dpi), all air samples were positive and quantifiable for COR and BDS. In addition, viability of the virus during this period was demonstrated. From 7 to 14 dpi, the detection threshold was not always reached despite an increase in sampling time, although the animals still excreted the virus from swab samples. For the virus tested, air sampling could be a promising way to carry out non-invasive and welfare-friendly viral shedding monitoring. However, it seemed less sensitive than individual swabs.

INTRODUCTION

De nombreux agents pathogènes viraux ou bactériens, responsables d'infections en élevages, peuvent être transmis par l'air (Spekreijse et al., 2013). Actuellement, la détection de ces agents pathogènes est souvent réalisée à partir de prélèvements sur animaux vivants. Ils sont réalisés par des techniques de référence (e.g. prises de sang, écouvillons) souvent invasives, chronophages, parfois douloureuses pour les animaux et éprouvantes ou parfois dangereuses pour les préleveurs (vétérinaires, éleveurs et salariés d'élevage). La collecte d'air à l'échelle d'un individu, d'un groupe restreint d'animaux ou d'un lot constitue une matrice innovante pour un diagnostic plus facile, rapide et respectueux du bien-être animal. Toutefois, la recherche d'agents pathogènes dans l'air en élevage est rarement pratiquée car compliquée à mettre en œuvre compte tenu du manque d'équipements adaptés et de protocoles validés quant au mode de prélèvement et à l'analyse des échantillons obtenus. Dans le cadre de l'évaluation d'un dispositif de collecte innovant, un projet a été conduit sur la collecte et la caractérisation d'un virus influenza aviaire hautement pathogène. Le collecteur à tester (Biodosi ND, codé BDS, CEA Tech) a été comparé à un collecteur de référence (Coriolis ND, codé, COR, Bertin Technologies). Cette expérimentation avait pour objectif la détection et la quantification de virus influenza aviaire hautement pathogène H5N8 dans des prélèvements d'air avec les échantillonneurs COR et BDS en conditions expérimentales.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Le collecteur de particules

Le collecteur BDS est portable, pèse environ 500g, silencieux et autonome (autonomie d'une heure sur batterie) avec un débit d'aspiration de 10 litres/min. Le principe est basé sur une collecte de nano particules (≤ 10 nm) sur une bague métallique par un système de précipitation électrostatique sans utilisation de pièce mécanique ni de ventilateur. Le collecteur emploie une haute tension pour collecter les particules aéropartées et aspirer l'air ambiant. Les particules ainsi collectées peuvent ensuite être récupérées après élution dans un milieu liquide approprié pour la recherche des agents infectieux ciblés. Le collecteur COR a été utilisé comme témoin, car déjà utilisé pour la détection de virus influenza (Scoizec et al., 2018). Mais il est peu maniable, bruyant et contient des pièces mécaniques, à la différence du BDS.

1.2. Phase expérimentale

Animaux

10 canards mulards mâles ont été élevés dans les animaleries de l'Anses Ploufragan de un jour à 6 semaines d'âge, âge auquel ils ont été inoculés avec une souche H5N8 HP A/decoy duck/France/161105a/2016_2.1a, par instillation intra-oculaire à la dose de $4,6 \cdot 10^6$ DIE50 par sujet, sous un volume de 100 μ l (J0 = Inoculation).

Prélèvements d'air

Les prélèvements d'air ont été réalisés à J-3, J+1, J+2, J+3, J+4, J+7, J+9, J+11 et J+14

Collecteur COR

L'échantillonneur était placé dans la salle à 1 m du parquet de canards à 45 cm de hauteur, dans le flux d'air allant du parquet vers le point d'extraction d'air. Le débit d'aspiration était de 300L/min, 10 min/échantillon soit un échantillonnage de 3 m³ collectés. Pour chaque prise d'échantillons, un cône contenant 10 mL de milieu MEM-H (Milieu minimum de Earl et Tampon Hepes) + 0.1% penicilline-streptomycine a été placé au niveau du cyclone de l'appareil. A J+1, J+4 et J+14, le prélèvement était répété trois fois d'affilée (cf tableau 1).

Collecteur BDS

En parallèle des prélèvements par COR, les prélèvements d'air par BDS ont été réalisés selon deux modalités, avec un débit d'aspiration de 10 litres/min pendant 10 min :

- Échantillonnage de l'air ambiant : l'air ambiant de la salle était collecté dans les mêmes conditions et aux mêmes dates que pour le COR (voir supra).

- Échantillonnage sur un groupe restreint de canards : deux canards étaient placés dans une caisse fermée en plastique avec des parois pleines comportant deux trous d'aération d'environ 75 cm². Le BDS, protégé par une petite cage métallique, était placé à l'intérieur de la caisse pour la réalisation du prélèvement.

A J+1 et J+4, jours de répétitions des prélèvements par COR, les prélèvements de 10 min sur caisse et air ambiant ont également été répétés trois fois. Une analyse rapide des prélèvements à J+1 a été faite. Compte tenu des résultats obtenus et pour s'assurer de la validité du choix de la durée de prélèvement par BDS, il a été choisi de porter la durée d'échantillonnage à 40 min sur l'air ambiant et 20 min sur caisse à partir de J+7 et de porter cette durée à 60 et 30 min respectivement, le jour restant de répétition des prélèvements par COR (J+14).

Prélèvements des animaux

Les 10 canards ont été prélevés individuellement selon la méthode classique : écouvillon oropharyngé et écouvillon cloacal. A J-3 par rapport à l'épreuve, puis à J+1, J+2, J+3, J+4, J+7, J+9, J+11 et J+14, c'est-à-dire selon le même calendrier que la réalisation des prélèvements d'air.

Analyses de laboratoire

Prélèvements par COR

Les échantillons ont été concentrés par centrifugation : 10 minutes à 4000 *g* à 4 °C, à l'aide du dispositif de filtration Amicon® Ultra-15 30K (Merck Millipore Ltd, Ireland), afin de récolter environ 1,5 mL d'échantillon concentré. L'ARN a ensuite été extrait, à l'aide du MagAttract Virus Mini kit pour extraction automatisée avec le M48 Biorobot (Qiagen) à partir de 100 µL d'échantillon concentré. 5 µL d'extrait d'ARN issus des 100 µL élués après extraction ont été testés par RT-PCR temps réel (rRT-PCR) ciblant la matrice gène M (détection du génome du virus IA de type A).

Des essais d'isolement ont été réalisés pour les échantillons concentrés correspondant au premier jour pour lequel les détections par rRT-PCR étaient positives pour l'ensemble des mesures (sous condition que la charge de génome viral détectée dans l'échantillon soit jugée suffisante, c'est-à-dire supérieure ou égale à 10³ copies du gène cible / réaction), soit J+2.

Prélèvements par BDS

Les échantillons composés d'une bague de collecte en inox disposée dans 2mL de milieu MEM-H+ 5% de sérum de veau fœtal + 0.1% pénicilline-streptomycine ont été passés 30 secondes au vortex pour que les particules collectées électrostatiquement soient transférées dans le milieu. L'ARN a ensuite été extrait à partir de 100 µL issus de l'échantillon initial de 2mL, à l'aide du MagAttract Virus Mini kit pour extraction automatisée avec le M48 Biorobot (Qiagen). 5 µL d'extrait d'ARN issus du volume final de 100 µL élués après extraction ont été testés par rRT-PCR gène M. Le volume d'échantillon initial restant (2 mL-100 µL) a été conservé pour des essais d'isolement par ovoculture, à partir des échantillons correspondant au premier et au dernier jour pour lesquels une détection était positive (sous condition que la charge de génome viral détectée dans l'échantillon soit jugée suffisante, c'est-à-dire supérieure ou égale à 10³ copies du gène cible / réaction). Ces jours correspondent à J+2 et à J+14.

Écouvillons oropharyngés et cloacaux

Les écouvillons individuels sont repris, lysés et extraits comme décrit précédemment. Le génome du virus IA de type A est recherché par RT-PCR temps réel (rRT-PCR) ciblant la matrice gène M.

Quantification de l'ARN viral dans les échantillons d'air

Le nombre de copies de gènes M par mètre cube d'air est estimé à partir des valeurs brutes de Ct (cycle threshold) obtenues en rRT-PCR gène M, d'après une calibration obtenue par dilution sériée d'un ARN transcrit synthétique (correspondant au gène M cible)

de concentration connue. Cette estimation quantitative n'est retenue que pour les valeurs supérieures ou égales à la limite de détection de la RT-PCR. En-dessous de cette valeur, seul le résultat qualitatif (détection du gène cible) est retenu.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de la présente étude était d'évaluer la détection et la quantification du virus de l'influenza aviaire par le BDS, en prenant comme témoin le COR, dispositif déjà utilisé dans certaines études (Scoizec et al., 2018). Le tableau 1 présente les résultats d'excrétion virale dans l'air ambiant et le tableau 2 pour les canards en cage. En dehors de la phase de forte excrétion (J+2 à J+4), la détection par le BDS semble fluctuante. Ainsi, le seuil de détection n'était pas toujours atteint malgré un allongement de la durée de prélèvement en deuxième semaine après épreuve pour pallier à la diminution attendue du niveau de charge virale excrétée par le lot. Les concentrations mesurées dans l'air, lorsque le signal était suffisant pour les estimer, semblent comparables à celles mesurées par COR. Cependant, la détection par le BDS semble moins sensible que celle par le COR. Par exemple à J1, deux répétitions sur les trois réalisées montrent une quantification pour le COR versus une seule détection et pas de quantification pour le BDS.

Sur un groupe restreint d'animaux (cage de deux canards)

Malgré un manque de répétabilité de la détection par le BDS (avec un échantillon de 100L) en démarrage d'excrétion (à J+1) et une non détection malgré une augmentation du volume prélevé (échantillon de 300L) en fin d'excrétion (à J+14), la capacité de détection du génome viral d'IA par le BDS sur l'air dans une cage contenant un à deux canards excréteurs semble bonne même si le signal détecté ne permet pas toujours d'estimer les quantités présentes dans l'échantillon (limite de détection de la méthode). De plus, la détection du génome viral par écouvillonnage oropharyngé sur l'un des deux canards à J+14, pourrait ne pas correspondre à une réelle excrétion de virus infectieux par voie aérienne mais à une contamination de la zone oropharyngée par ingestion de matières virales présentes dans l'environnement (par exemple sur le plumage, l'aliment, l'eau de boisson, du fait de l'excrétion dans les jours précédents).

Essais d'isolement du virus

Des prélèvements collectés à J+2 avec le collecteur COR (air ambiant) et avec le collecteur BDS (deux modalités de collecte) ont permis de ré-isoler un agent hémagglutinant dès le premier passage sur œufs embryonnés de poules EOPS.

Les autres prélèvements analysés sont ceux du 14e jour post-épreuve (dernier point de prélèvement pour

lequel seul l'échantillon collecté à partir de l'air ambiant avec le BDS était détecté, avec un niveau de quantification de charge pouvant être retenu) et du 11e jour post-épreuve (point de prélèvement immédiatement antérieur, pour lequel les 2 modalités de collecte avec le BDS sont détectées, bien que les charges en génome viral soient inférieures au niveau minimal de quantification retenu). Les 3 échantillons testés (BDS dans l'air ambiant au 11e jour, BDS en caisse au 11e jour et BDS dans l'air ambiant au 14e jour) étaient négatifs après 2 passages successifs sur œufs embryonnés. Ces prélèvements n'ont donc pas permis d'isoler de virus.

CONCLUSION

La preuve de concept est faite quant à l'utilisation possible du collecteur BDS pour la détection et la caractérisation du virus recherché, malgré un débit d'aspiration beaucoup plus faible que pour le COR (10 litres/min pour le BDS versus 300 litres/min pour le COR). Il a cependant été noté un manque de répétabilité dans la détection avec le BDS qui pourrait être compensé par un allongement de la durée de collecte et/ou une augmentation du nombre d'animaux dans le cas de la collecte en caisse. Pour le BDS, on peut également noter un manque de sensibilité de la détection par rapport aux résultats des écouvillons.

Tableau 1 : détection et quantité d'ARN d'IA de type A dans les échantillons d'air prélevés sur l'air ambiant

Jour post épreuve	N° de la répétition	% d'animaux excréteurs ^A	COR – MEM H		BDS – air ambiant	
			Durée ^B	Résultat ^C	Durée ^B	Résultat ^C
1	1	100%	10	5,26	10	détecté
1	2	100%	10	5,05	10	non détecté
1	3	100%	10	détecté	10	non détecté
2	1	100%	10	6,23	10	6,75
3	1	100%	10	6,36	10	7,05
4	1	100%	10	7,11	10	7,33
4	2	100%	10	7,54	10	7,37
4	3	100%	10	7,61	10	7,50
7	1	100%	10	NA	40	non détecté
9	1	100%	10	NA	40	détecté
11	1	70%	10	NA	40	détecté
14	1	30%	10	NA	60	6,62
14	2	30%	10	NA	NR	NR
14	3	30%	10	NA	NR	NR

^A Proportion de canards présents dans la salle pour lesquels du génome viral d'IA de type A a été détecté sur l'écouvillon oropharyngé et/ou sur l'écouvillon cloacal par RT-PCR gene M

^B Durée en minutes du prélèvement d'air

^C Résultat de l'analyse du prélèvement d'air : quantité estimée de génome viral dans l'air en log10 de copies d'ARN, NA non analysé à ce jour, NR non réalisé, détecté signifie que le signal d'amplification obtenu par rRT-PCR est trop tardif pour retenir l'estimation de la quantité de copies d'ARN présente dans l'échantillon, et non détecté signifie qu'aucun signal d'amplification du gène cible n'a été obtenu par rRT-PCR.

Tableau 2. Détection et quantité d'ARN d'IA de type A dans les échantillons d'air prélevés dans une caisse contenant deux canards

Jour post épreuve	N° de la répétition	Canard 1 Excrétion ^A	Canard 2 Excrétion ^A	BDS	
				Durée ^B	Résultat ^C
1	1			10	déecté
1	2	POS/NEG	POS/POS	10	non déecté
1	3			10	déecté
2	1	POS/POS	POS/POS	10	6,93
3	1	POS/POS	POS/POS	10	7,81
4	1			10	6,96
4	2	POS/POS	POS/POS	10	7,15
4	3			10	déecté
7	1	POS/NEG	POS/POS	20	déecté
9	1	NEG/NEG	NEG/POS	20	déecté
11	1	POS/NEG	NEG/NEG	20	déecté
14	1	NEG/NEG	POS/NEG	30	non déecté

^A Résultats de l'analyse par RT-PCR gene M de l'écouvillon oropharyngé et de l'écouvillon cloacal du canard : POS signifie que du génome viral d'IA de type A a été déecté et NEG signifie qu'il y a absence de détection.

^B Durée en minutes du prélèvement d'air

^C Résultat de l'analyse du prélèvement d'air : quantité estimée de génome viral dans l'air en log10 de copies d'ARN, déecté signifie que le signal d'amplification obtenu par rRT-PCR est trop tardif pour retenir l'estimation de la quantité de copies d'ARN présente dans l'échantillon, et non déecté signifie qu'aucun signal d'amplification du gène cible n'a été obtenu par rRT-PCR

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Scoizec A, Niqueux E, Thomas R, Daniel P, Schmitz A and Le Bouquin S, 2018. Front. Vet. Sci., 5-15.
- Spekreijse D, Bouma A, Koch G, Stegeman A, 2013. Influenza Other Respir Viruses, 7(2), 132–138.