

RESEAU DE SURVEILLANCE DE LA GRIPPE AVIAIRE CHEZ LES OISEAUX SAUVAGES EN CATALOGNE, ESPAGNE *

Anna Alba¹, Natàlia Majó^{1, 2}, Núria Busquets¹
et Jordi Casal^{1, 2}

RESUME : Afin de détecter la circulation de souches hautement et faiblement pathogènes, la surveillance du virus de la grippe aviaire du type A chez les oiseaux sauvages a été réalisée en 2006. La population étudiée a compris principalement les espèces aquatiques des zones humides qui présentent le plus grand risque quant au nombre, à l'origine des routes migratoires ou à la probabilité de contact avec les oiseaux domestiques. Tout au long de l'année, nous avons échantillonné un total de 778 animaux, parmi lesquels 300 ont été obtenus par surveillance active, 293 par surveillance passive et 185 par sentinelles. Les échantillons ont été testés en temps réel PCR pour la présence du génome du virus de la grippe aviaire et il a été procédé ultérieurement à la répllication et au sous-typage des échantillons positifs. Parmi les 593 échantillons, neuf ont donné des résultats positifs chez *Anas platyrhynchos*, 44 n'ont pu être exploités et 540 ont fourni des résultats négatifs. Tous les échantillons de sentinelles ont été négatifs. Parmi les neuf échantillons positifs, quatre ont été répliqués dans des œufs embryonnés et ont pu être sous-typés, détectant les sous-types H4N6, H3N8 et H6N8. Les souches faiblement pathogènes (H6, H4 et H3) détectées en Catalogne sont semblables à la plupart des souches virales communes décrites en Europe et au Canada. Le séquençage et la comparaison avec les virus espagnols montrent que les virus H6N8 de l'Espagne et des Pays-Bas sont proches en termes d'évolution.

Les arbres phylogénétiques du virus espagnol H6N8 confirment la similitude de ce virus avec ceux isolés des pays situés sur les mêmes routes migratoires (de l'Europe du Nord ou Centrale jusqu'en Afrique).

Mots-clés : Epidémiologie, virus Influenza, oiseaux sauvages, souches faiblement pathogènes.

SUMMARY : During 2006 the surveillance of type A avian influenza viruses in wild birds continued, in order to detect the circulation of high and low pathogenicity strains of avian Influenza viruses (LPAIV, HPAIV). The population under study included mostly aquatic bird species of wetlands that pose the greatest risk regarding the number, the origin of the flyway and the likelihood of contact with domestic birds. In year 2006, we sampled a total of 778 birds, among whom 300 individuals were obtained by active surveillance, 293 by passive surveillance and 185 by sentinels. These samples were tested by real time PCR for the presence of the genome of the bird flu virus. Replication and subtyping were then carried out on all positive samples.

* Texte de la communication orale présentée lors de la Journée AEEMA, 1er juin 2007

¹ Unité d'Épidémiologie Vétérinaire, Centre de recherche en santé animale (CReSA), Campus UAB, Edifici CReSA, 08193-Bellaterra (Barcelone), Espagne

² Département de santé et anatomie animales, Faculté vétérinaire, Campus UAB. Edifici V, Université autonome de Barcelone, 08193-Bellaterra (Barcelone), Espagne

* Correspondance : ana.alba@cresa.uab.cat

Of the 593 samples from Anas platyrhynchos examined, nine yielded positive results, 44 could not be assessed and 540 gave negative results. All sentinel samples resulted negative. Of the nine positive samples, four were replicated in embryonic eggs and were subtyped, detecting subtypes H4N6, H3N8 and H6N8. The strains of low pathogenicity (H6, H4 and H3) detected in Catalonia were equivalent to the most common viral strains reported in Europe and Canada. The sequencing and comparison showed that, in terms of evolution, the H6N8 virus detected in Spain was close to other H6N8 viruses detected in the Netherlands.

The phylogenetic trees of the Spanish H6N8 virus confirmed the similarity of these isolated strains with other strains from other countries located on the same migratory routes (from North and Central Europe to Africa).

Keywords : Epidemiosurveillance, virus Influenza, wild birds, low pathogenic avian influenza strains.



I - INTRODUCTION

Actuellement, l'étude de la circulation des virus de la grippe aviaire du type A et leur détection précoce est devenue un objectif prioritaire pour la santé animale et la santé publique dans le monde entier. L'importance de son étude réside dans les pertes économiques et sanitaires provoquées et dans les possibles implications que pourrait avoir une pandémie de grippe.

L'épidémiosurveillance de l'influenza aviaire (IA) chez les oiseaux sauvages en Catalogne a commencé en 2005. La détection d'un nombre élevé de cas en Europe au cours de l'année 2005, tant chez les oiseaux sauvages que de basse-cour, infectés par le virus de la grippe aviaire hautement pathogène H5N1, a fait que l'on considère nécessaire la poursuite et l'amélioration des programmes de surveillance des oiseaux sauvages en 2006.

II - DESCRIPTION DU RÉSEAU

1. OBJECTIFS DU RESEAU

La surveillance a pour but de détecter la circulation de souches hautement et faiblement pathogènes de la grippe aviaire H5 et H7 dans la population d'oiseaux sauvages de Catalogne et de détecter la circulation d'autres souches de grippe aviaire afin d'entreprendre la lutte le plus précocement possible.

2. ORIGINE DES DONNEES

La population étudiée est constituée par des oiseaux sauvages, principalement les espèces hivernantes d'oiseaux aquatiques qui présentent un plus grand risque à cause de leur grand nombre, de l'origine des routes

migratoires ou de la probabilité de contact avec les oiseaux domestiques.

Selon Gutierrez [2005], le nombre d'oiseaux sauvages hivernants est estimé en Catalogne à 350 000 oiseaux appartenant à 123 espèces différentes (tableau 1). Selon la localisation de ces oiseaux et la présence d'exploitations avicoles (figure 1), nous avons identifié plusieurs zones à risque où se concentrent les principaux efforts de suivi (figure 2) ; ces zones sont le delta de l'Ebre, le delta du Llobregat et Aiguamolls de l'Empordà jusqu'à la côte, et une zone humide continentale de surveillance spéciale localisée au Pla d'Urgell, Segrià et La Noguera.

Tableau 1
Le recensement d'oiseaux sauvages hivernant en Catalogne
 [selon Gutiérrez [2005]]

Familles	Gérone	Barcelone	Tarragone	Lleida	Total
<i>Anatidae + Rallidae</i> Aquatiques	16 123	7 075	113 033	4 846	141 077
<i>Laridae + Sternidae</i> Marins	31 591	30 627	25 606	2 589	90 413
Autres familles	12 202	9 351	96 060	9 061	126 674
Recensement total	59 916	47 053	234 699	16 496	358 164

Figure 1
Distribution des volailles en Catalogne et dans les zones humides

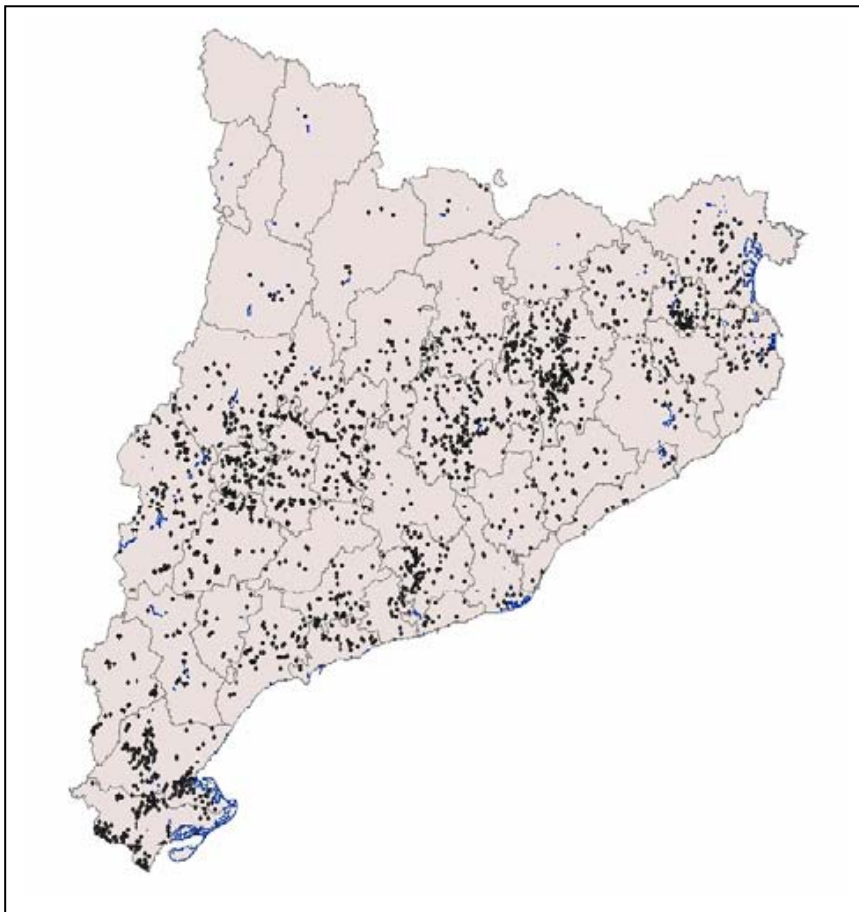


Figure 3
Zones naturelles considérées sensibles à la grippe aviaire



Selon le *Plan de surveillance de la grippe aviaire chez les oiseaux de basse-cour et les oiseaux sauvages en Espagne* proposé par le Ministère de l'Agriculture [MAPYA, 2006], les oiseaux sauvages des zones humides considérées à risque en Catalogne se distinguent en trois catégories : oiseaux aquatiques, oiseaux marins et autres.

Dans la catégorie des oiseaux aquatiques, les espèces prioritaires à échantillonner pour la surveillance de l'IA appartiennent à la famille des *Anatidae* et les principales espèces considérées à risque sont celles que nous indiquons sur le tableau 2. Nous avons échantillonné aussi dans cette catégorie des oiseaux d'autres espèces qui sont localisés dans des habitats semblables comme les oiseaux des familles des *Phoenicopteridae*

(spécialement *Calidris alpina*, *Calidris ferruginea*), des *Ardeidae*, des *Scolopacidae*, des *Gruidae*....

Dans la catégorie des oiseaux marins sont inclus les oiseaux des ordres suivants : *Charadriiformes* (spécialement *Larus ridibundus*, *Larus melanocephalus*), les *Sternidae*, entre autres *Sterna sandvicensis*, *Pelecaniformes* et *Procellariiformes*.

Enfin, dans la catégorie des autres oiseaux sont inclus les oiseaux de la famille des *Accipitridae*, outre les *Passeriformes* et *Galliformes*.

Le mode de réseau utilisé pour l'obtention de ces échantillons est la surveillance active et passive ainsi que les sentinelles.

Tableau 2

Espèces d'oiseaux aquatiques prioritaires pour la surveillance de l'influenza aviaire

Nom scientifique	Nom vulgaire
<i>Anser albifrons</i>	Oie rieuse
<i>Anser fabalis</i>	Oie des moissons
<i>Anas platyrhynchos</i>	Canard colvert
<i>Anas strepera</i>	Canard chipeau
<i>Anas acuta</i>	Canard pilet
<i>Anas clypeata</i>	Canard souchet
<i>Anas penelope</i>	Canard siffleur
<i>Anas crecca</i>	Sarcelle d'hiver
<i>Anas querquedula</i>	Sarcelle d'été
<i>Aythya ferina</i>	Fuligule milouin
<i>Aythya fuligula</i>	Fuligule morillon

Réseau actif : à partir des oiseaux capturés ou tués à la chasse dans les zones humides (figure 1) et durant deux périodes annuelles, l'une à la fin du printemps ou au début de l'été, et l'autre en l'hiver.

Réseau passif : à partir des échantillons d'oiseaux malades ou morts avec suspicion clinique d'IA, reçus au cours de l'année et provenant de n'importe quel point de la communauté.

Sentinelles : à partir d'oiseaux localisés dans des zones à risque et en contact avec d'autres oiseaux sauvages.

Le type d'échantillons analysés consiste en deux écouvillons pharyngés et cloacaux (ou fientes fraîches) de chaque animal.

Pour chacun des oiseaux échantillonnés, nous avons enregistré systématiquement le type de surveillance, la municipalité, le type d'échantillon, les dates de la prise et de l'envoi, la personne contact, l'espèce, le lieu géographique, l'anneau (dans le cas où il y en

aurait un), les coordonnées UTM, la suspicion et finalement le résultat de la RT-PCR.

3. PROTOCOLE DE LABORATOIRE

Les échantillons ont été testés par RT-PCR pour la présence du génome du virus de la grippe aviaire [Agüero *et al.*, 2007 ; Spackman *et al.*, 2002].

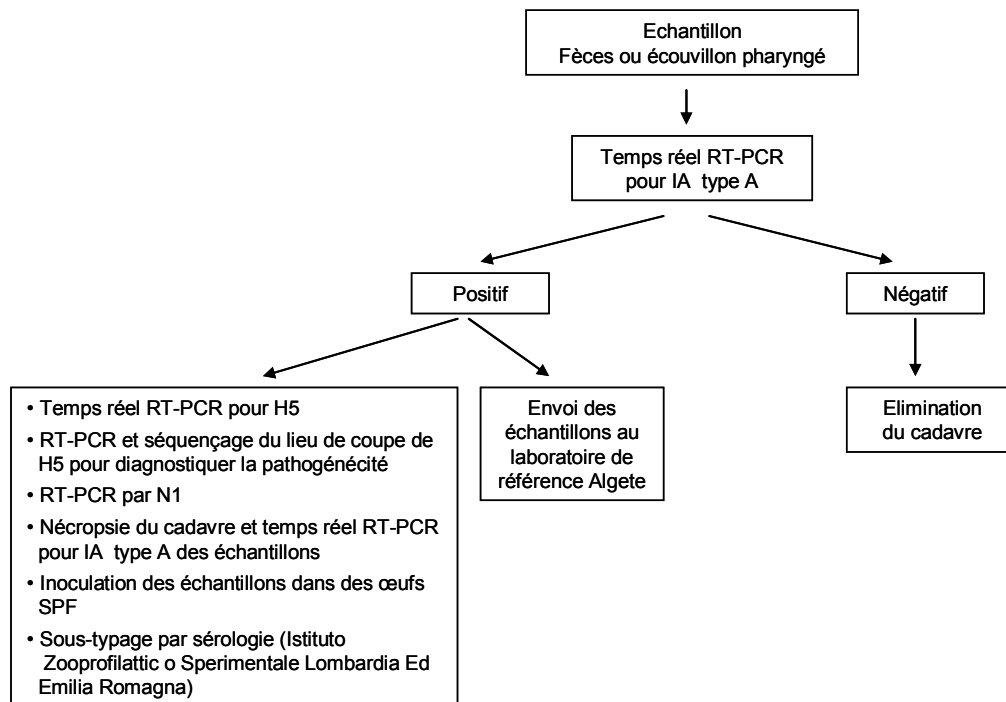
En cas de réponse positive à la RT-PCR générique, nous avons écarté la présence de H5 et N1 par des techniques de RT-PCR spécifiques et nous avons répété les tests sur différents échantillons de tissus à partir du cadavre. Enfin, nous avons essayé d'obtenir la répllication des échantillons positifs dans les œufs embryonnés SFP et l'identification du sous-type moyennant la technique d'inhibition de l'hémagglutination et de la neuroaminidase selon les méthodes adoptées par l'OIE (figure 3). Tous les résultats positifs obtenus dans notre laboratoire ont été confirmés par le laboratoire officiel de référence de l'Etat.

III - ANALYSE DES DONNEES

A la fin de 2006, le nombre d'oiseaux collectés a été de 778. Par surveillance active, nous avons obtenu 300 échantillons, 293 ont été obtenus par surveillance passive et 185 par des oiseaux sentinelles. Les échantillons

provenaient d'oiseaux de 75 espèces différentes, essentiellement *Ansériformes* et *Charadriiformes*, de 49 municipalités différentes de Catalogne et, pour la plupart, de zones considérées à risque.

Figure 3
Protocole du diagnostic de laboratoire



Le tableau 3 présente le nombre d'individus échantillonnés par surveillance active et passive selon l'espèce et le pourcentage que ce nombre représente sur le total des échantillons recueillis (les sentinelles ne sont pas incluses dans ce tableau).

Le recueil des échantillons est effectué pendant toute l'année, la surveillance active se concentrant principalement à la fin du printemps et en hiver, surtout pendant les mois de juin, octobre, novembre et décembre (figure 4)

Parmi les échantillons analysés en 2006, neuf ont fourni des résultats positifs chez *Anas platyrhynchos*, 44 n'ont pas pu être exploités et 540 ont donné des résultats négatifs.

Les neuf animaux ayant fourni des résultats positifs étaient tous infectés par des virus d'IA de faible pathogénicité. La plupart correspondaient à des échantillons par surveillance active (6), alors que seulement trois positifs correspondent à la surveillance passive. Les 185 échantillons de sentinelles ont fourni des résultats négatifs.

D'autre part, nous avons observé que la circulation virale détectée coïncide avec les mois où il y a une forte pression

d'échantillonnage et que se produisent alors les principales migrations de printemps et d'automne (juillet, septembre et octobre).

Des neuf échantillons positifs, quatre ont pu être répliqués dans des œufs embryonnés et nous en avons déterminé le sous-type en collaboration avec l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia, Italie. Les résultats obtenus ont été les sous-types H4N6, H3N8 et H6N8. Le tableau 4 montre les caractéristiques de la date, la zone à risque et la souche détectée.

En ce qui concerne la distribution géographique des individus échantillonnés (figure 5) nous observons que la plus grande partie des échantillons proviennent des principales zones sensibles et que les principales souches positives sont localisées également dans ces zones.

En conclusion, on peut dire que des virus IA faiblement pathogènes ont circulé chez des oiseaux migrateurs en Espagne (Catalogne) et que les souches faiblement pathogènes (H6, H4 et H3) en Catalogne sont semblables à la plupart des souches virales communes décrites en Europe et au Canada.

Tableau 3
Espèces d'oiseaux échantillonnés aussi bien par surveillance active que passive

Espèce	Active	Passive	Total	% du total
Oiseaux aquatiques				
<i>Anas platyrhynchos</i>	76	131	207	34,9
<i>Anas crecca</i>	28	3	31	5,2
<i>Fulica atra</i>	14	5	19	3,2
<i>Netta rufina</i>	9	7	16	2,7
<i>Anser anser</i>	3	7	10	1,7
<i>Gallinula chloropus</i>		10	10	1,7
<i>Ardea cinerea</i>		7	7	1,2
<i>Cygnus olor</i>		6	6	1,0
<i>Egretta garzetta</i>		6	6	1,0
<i>Anas acuta</i>	5		5	0,8
<i>Anas clypeata</i>	4	1	5	0,8
<i>Aythya ferina</i>	3	2	5	0,8
<i>Aythya fuligula</i>	3	2	5	0,8
<i>Autres espèces (20)</i>	7	22	29	4,9
Oiseaux marins				
<i>Larus michaellis</i>	55	15	70	11,8
<i>Phoenicopterus ruber</i>	53	1	54	9,1
<i>Larus audouinii</i>	27	1	28	4,7
<i>Larus ridibundus</i>	5	4	9	1,5
<i>Phalacrocorax carbo</i>		9	9	1,5
<i>Larus ridibundus</i>	1	3	4	0,7
<i>Larus argentatus</i>	4		4	0,7
<i>Larus cachinnans</i>		4	4	0,7
<i>Autres espèces (11)</i>	3	11	14	2,4
Autres oiseaux				
<i>Passer sp</i>		7	7	1,2
<i>Pica pica</i>		6	6	1,0
<i>Autres espèces (14)</i>		23	23	3,9

Figure 4

Suivi mensuel du nombre d'oiseaux échantillonnés par mois au cours de l'année 2006

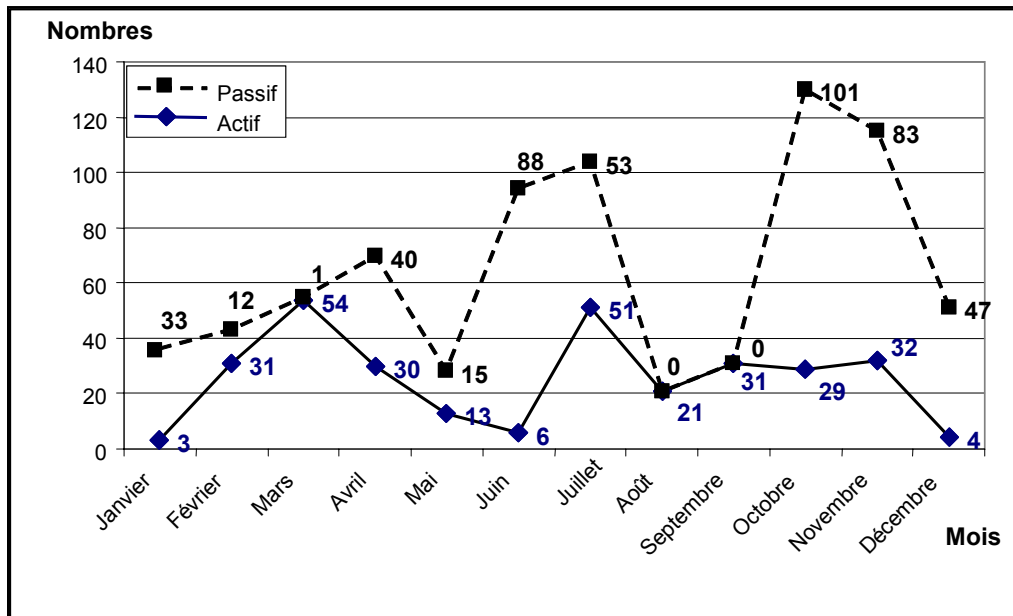
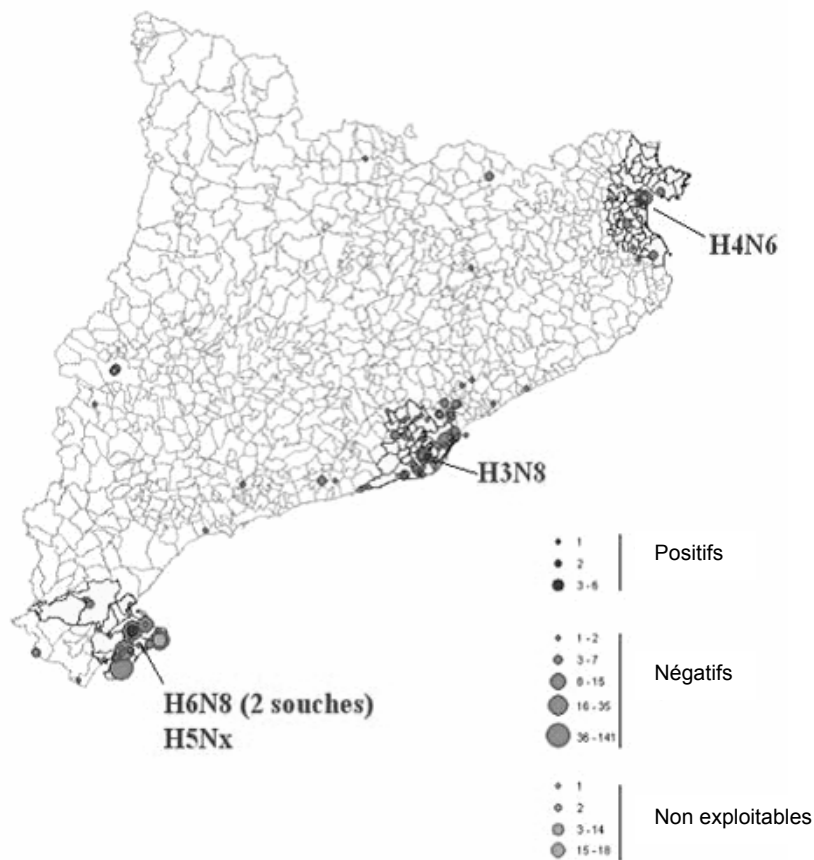


Tableau 4

Résultats positifs du sous-typage

Date	Réseau	Echantillon	Répliqués en oeufs	Sous-type
25/07/2006	Passif	Fèces	Oui	H4N6
03/09/2006	Passif	Ecouvillon pharyngé	Oui	H3N8
03/09/2006	Passif	Ecouvillon pharyngé	Non	Non déterminé
07/10/2006	Passif	Fèces	Non	Non déterminé
07/10/2006	Actif	Fèces	Non	H5 non N1- LPAI H
07/10/2006	Actif	Fèces	Oui	H6N8
07/10/2006	Actif	Fèces	Oui	H6N8
07/10/2006	Actif	Fèces	Non	Non déterminé
07/10/2006	Actif	Fèces	Non	Non déterminé

Figure 5
Distribution géographique des individus échantillonnés et résultats



BIBLIOGRAPHIE

Agüero M., San Miguel E., Sánchez A., Gómez-Tejedor C., Jiménez-Clavero M.A. - A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 2007, **51** (1 Suppl): 235-41.

Busquets N., Serrano E., Abat F.X., Alba A., Núñez J.I., Majó N. - Detección de virus de influenza de baja patogenicidad en aves salvajes en Cataluña. XLIV Symposium AECA/WPSA, Valencia. 24-26 oct 2007.

Gutiérrez R. (ed) - Cens internacional d'ocells aquàtics i marins hivernants a Catalunya de gener de 2005. Departament de Medi

Ambient i Habitatge. Generalitat de Catalunya, <http://www.gencat.net/mediamb/rndelta/censcat05.pdf>

Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T., Suarez D.L. - Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 3256-60.

MAPYA, 2006, Plan de Vigilancia de la influenza aviar en aves silvestres en España, 2006, http://www.mapa.es/ganaderia/pags/influenza_aviar/aves_silvestres.pdf