

Cinétique des anticorps d'origine maternelle anti-virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 et interférence avec la vaccination chez le poulet de chair

A. ESSALAH-BENNANI¹, S. NASSIK², M. BOUZOUAIA³, O. FASSI FIHRI⁴

(Reçu le 23/03/2021; Accepté le 27/03/2021)

Résumé

La vaccination systématique des reproducteurs contre l'IAFP H9N2 permet la transmission d'une immunité passive à leur descendance. Cependant, les anticorps maternels anti-H9N2 présents chez les jeunes poussins à l'éclosion, leur offrent une certaine protection pendant les premiers jours d'âge et peuvent de même provoquer une interférence avec la vaccination. Le but de cette étude est d'évaluer la cinétique des AOMs en présence et/ou en absence de vaccination. Dans la première partie, nous avons suivi la cinétique des anticorps anti-H9N2 chez des poussins non vaccinés élevés en isolement. Dans la deuxième partie, des lots de poulets de chair vaccinés avec 4 différents vaccins, administrés à 3 différents âges, répartis dans plusieurs régions du Maroc ont fait l'objet d'un suivi sérologique, sur l'ensemble des résultats obtenus, un effet âge de vaccination a été prouvé par analyse statistique ce qui met en cause une interférence entre les vaccins anti-IAFP H9N2 et les anticorps d'origine maternelles.

Mots clés: Influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 (IAFP H9N2), Anticorps d'origine maternelle (AOM), ELISA, IHA, Temps de demi-vie

Kinetics of maternal antibodies against low pathogenic avian influenza virus H9N2 and interference with vaccination in broiler chickens

Abstract

Systematic vaccination of Breeders against AILP H9N2 allows the transmission of passive immunity to their progeniture. However, the maternal anti-H9N2 antibodies present in day old chicks offer them some protection during the first days of age and may interfere with vaccination. The aim of this study is to assess the kinetics of AOMs in the presence and/or in the absence of vaccination. In the first part, we followed the kinetics of anti-H9N2 antibodies in unvaccinated chicks reared in isolation. In the second part, batches of broilers vaccinated with 4 different vaccines, administered at 3 different ages, distributed in several regions of Morocco were the subject of serological monitoring, on all the results obtained, an effect Age of vaccination has been proven by statistical analysis which calls into question the interference between H9N2 anti-IAFP vaccines and maternal antibodies.

Keywords: Low pathogenic avian influenza H9N2 (IAFP H9N2), Maternal antibody, ELISA, HI, Half-life

INTRODUCTION

Les virus H9N2 de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) circule chez plusieurs espèces aviaires en Eurasie et en Afrique, entraînant de grandes pertes économiques dues à une baisse de la production d'œufs ou à une mortalité modérée à élevée. En outre, le virus H9N2 de l'IAFP est connu pour posséder des récepteurs de type humain et une transmissibilité aux mammifères, ce qui soulève des préoccupations concernant l'augmentation du potentiel pandémique. Les virus H9N2 sont endémiques dans les élevages de volailles domestiques au Maroc depuis 2016 et provoquent souvent une mortalité légère à modérée (2 % à 10 % cumulée) avec des signes cliniques apparents caractérisés par des râles, étouffements, toux, et dyspnée. Afin de contrôler les flambées d'IAFP, depuis 2016, l'autorité vétérinaire marocaine a autorisé l'utilisation du vaccin IAFP H9N2 à adjuvant huileux inactivé. Cependant par cette autorisation il devient impossible de différencier sérologiquement des oiseaux naturellement infectés des oiseaux vaccinés en utilisant les tests de diagnostic couramment disponibles.

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

Dans la présente étude, nous avons essayé d'évaluer sérologiquement la prise vaccinale et la comparer avec la cinétique des anticorps maternels dans un premier temps

en absence de vaccination, en présence de la vaccination dans un deuxième temps, dans des contextes différents: plusieurs régions du Maroc, différents vaccins utilisés et différents âges de vaccinations.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

PARTIE 1

Analyse de la cinétique des anticorps maternels contre l'Influenza Aviaire Faiblement Pathogène, depuis l'éclosion jusqu'à fin de bande en absence de vaccination anti-H9N2.

Poussins et logement

20 poussins d'un jour de type chair ont été obtenus auprès d'un couvoir, situé au centre du Maroc, et élevés en isolement à l'Unité de Pathologie Aviaire de l'Institut Agronomique et vétérinaire Hassan II. Ces poussins proviennent de reproducteurs ayant reçu une vaccination contre H9N2. L'eau et l'aliment destiné au poulet de chair étaient accessibles *ad libitum*, la lumière était fournie en continu tout au long de la période d'étude.

Collection des échantillons et analyses sérologiques

Les prélèvements de sang ont été réalisés à J1 et par la suite tous les 7 jours jusqu'à 42 jours d'âge. Les titres d'anticorps maternels anti-H9N2 ont été mesurés à l'aide du test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) suivant

¹ Ceva Santé Animale, Z.I. Oulad Saleh, Bouskoura, Maroc

² Unité de pathologie aviaire, Département de Pathologie et de Santé Publique Vétérinaire, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc

³ Département de management et pathologie aviaire, École Nationale Vétérinaire Sidi Thabet, Tunisie

⁴ Unité de Microbiologie et Maladies Contagieuses, Département de Pathologie et de Santé Publique Vétérinaire Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Maroc

la procédure β (antigène constant et sérum dilué en série) selon le manuel de l'OIE (OIE, 2019). L'antigène standard H9N2 homologue souche marocaine est obtenu auprès du laboratoire de la Division de la Pharmacie et des Intrants Vétérinaires ainsi que le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), deux kits ELISA commerciaux ont été utilisés pour déterminer le titre des AOM contre le virus de l'IAFP H9N2, ID Screen® Influenza H9 Indirect pour la détection des anticorps dirigés contre l'hémagglutinine H9 du virus Influenza A et Id Screen® Influenza A Nucleoprotein Indirect pour la détection spécifique et le dosage des anticorps dirigés contre la nucléoprotéine du virus de l'Influenza A. Ces kits ELISA ont été utilisés selon le protocole recommandé par le fabricant en utilisant un lecteur de microplaques automatisé (ELx800, BIO-TEK Instruments Inc., Winooski, VT). Le titre des anticorps de chaque échantillon a été quantifié à l'aide du logiciel fourni par le fabricant. Le titre moyen géométrique (GMT) pour chaque groupe d'échantillons a également été calculé. Tous les échantillons de sérum ont été lus contre les antisérums témoins positifs et négatifs fournis par le kit, Le sérum est positif si son titre est supérieur à 668 par le kit FLUNPS et supérieur à 732 pour le kit FLUH9S, un titre supérieur à 8000 traduit un passage viral pour les deux kits.

PARTIE 2

L'objectif de cette seconde partie est le suivi de la réponse immunitaire de la vaccination à différents âges contre l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 par les tests ELISA.

Fermes étudiées

L'étude a été réalisée dans 21 élevages de volaille type chair répartis sur six grandes régions du Maroc. Les élevages ont été choisis en fonction de la coopération des éleveurs et de leur disponibilité à recevoir les visites tous les sept jours et à mettre leurs volailles à notre disposition. Cependant, il n'y a pas eu de sélection délibérée pour aucun critère de production ou de santé. Ainsi, bien que ce ne soit pas un échantillon aléatoire, les effectifs ont été considérés comme représentatifs par rapport à la taille des élevages dans chaque région.

Au total plus de 640.000 de poulets ont été concernés par cette étude, la répartition des élevages et des effectifs par région est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1: Répartition géographiques des élevages et des effectifs de l'étude

Régions	Nombre des élevages	Effectif	Pourcentage (%)
Fès-Meknès	1	40 000	6,2
Rabat-Salé-Kénitra	6	279 000	43,6
Marrakech-Tansift-Al Haouz	10	206 000	32,2
Sous-Massa	4	115 000	18,0
Total	21	640 000	100

Vaccins et programme de vaccination

Pour les 21 élevages étudiés, nous avons identifié quatre (4) vaccins utilisés pour la vaccination contre le H9N2 (Tableau 2), et pour chacun d'entre eux, nous avons déter-

miné la souche du virus utilisé par référence aux listes de vaccins H9N2 autorisé au Maroc par l'ONSSA ou bien par communications directes avec les fabricants de vaccins. Ces élevages concernés par l'étude ont été classés en 3 groupes selon l'âge de vaccination (Tableau 3).

Tableau 2: Détails anonymes des vaccins utilisés par les élevages étudiés

Vaccin anonyme	Pays producteur	Sous-type/ Pathogénicité	Souche du vaccin / pays d'origine
A	France	H9N2/IAFP	A/chicken/Iran/Av1221/1998
B	Pays-bas	H9N2/IAFP	Italy
C	Corée du Sud	H9N2/IAFP	A/chicken/Korea/01310/2001
D	États-Unis	H9N2/IAFP	A/Chicken/UAE/415/99

Tableau 3: Répartition des élevages étudiés en fonction du programme de vaccination

Groupes	Age de vaccination	Nombre d'élevages	Type de vaccin	
Groupe 1	Jour 1	15 élevages	13	A
			1	B
			1	C
Groupe 2	Entre J5 et J7	5 élevages	4	C
			1	D
Groupe 3	J14	1 élevage	1	C

Collection des échantillons et analyses sérologiques

Le même planning de prélèvement que l'étude réalisé dans la partie 1 a été adopté, cependant, nous avons eu recours uniquement à l'utilisation des kits ELISA déjà cités, en effet, sur le plan pratique, la technique ELISA offre plusieurs avantages, notamment la rapidité et la facilité de la manipulation. De plus, elle permet de tester simultanément plusieurs échantillons. En revanche, le test d'IHA pourrait poser de nombreux problèmes de fiabilité, la lecture des résultats est soumise à un certain degré de subjectivité. D'autre part, ce test est lié à de nombreux facteurs (nature des hématies, présence ou non d'un prétraitement des sérums, nature de la souche virale, conditions de température, temps d'incubation...) qui peuvent influencer sa sensibilité et spécificité (Sala *et al.*, 2003).

Analyse statistique

Dans cette étude, la demi-vie des anticorps d'origine maternel anti-H9N2 a été calculée de manière similaire à une étude précédente (El-Kady *et al.*, 2007) par simple régression linéaire en utilisant le Programme Microsoft Excel. Pour chaque individu, l'équation de régression linéaire de la relation entre l'âge et le titre des AOMS a été utilisée pour estimer le temps requis pour que le niveau des AOMS diminue de moitié (demi-vie). Pour une même méthode de détection d'anticorps, les différences entre les temps de demi-vie ont été analysées par un test de Student apparié en utilisant le programme SPSS Ver. 4.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Une p-value < 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

RÉSULTATS

PARTIE 1

Tableau 4 résume les titres moyens géométriques des AOM anti-H9N2 à différents âges par le test ELISA en utilisant deux kits de diagnostic (FLUNPS et FLUH9S) et par le test d'inhibition de l'hémagglutination.

Tableau 4: Titres moyens géométriques (GMT) des anticorps d'origine maternelle anti-H9N2

Jours	J1	J7	J14	J21	J28	J35	J42
ELISA/FLUH9S	13038	2467	1121	1092	281	74,3	40,9
ELISA/FLUNPS	13046	2326	903	1010	253	62,4	35,0
IHA (log2)	8,6	7,3	4,6	2,7	1,2	0,2	0,05

Les AOM anti-H9N2 ont montré une diminution progressive du titre et étaient presque épuisés à J28. Ce résultat est valable autant pour le test ELISA que pour le test IHA. La figure 1 montre le profil de dégradation des AOM chez le poulet de chair non vacciné et élevé en isolement.

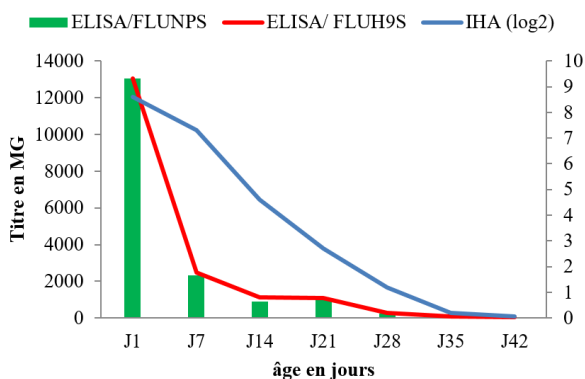


Figure 1: Profil de dégradation des AOM chez le poulet de chair non vacciné

La moyenne des demi-vies de AOMs anti-H9N2 diffère en fonction du test de monitoring utilisé, elle variait de 12,6 jours par ELISA/FLUH9S, 12,7 jours par ELISA/FLUNPS et 17,9 par IHA (Tableau 5). Il existe des différences significatives entre les moyennes de demi-vie de AOM anti-H9N2 ($P < 0,05$).

Tableau 5: les demi-vies et les CV(%)

Test sérologique	Demi-vie (Moyenne +ET)	CV%
ELISA/FLUH9S	12,3±0,6	5,2
ELISA/FLUNPS	12,7±0,7	5,7
IHA (log2)	17,9±1,1	6,2

Les AOM anti-H9N2 ont montré une diminution progressive du titre et étaient presque épuisés à J28 ce qui représente une consommation physiologique par les poulets. Le titre des AOMs transférés passivement aux poussins était élevé à l'éclosion atteignant jusqu'à 1300 par les deux kits FLUH9S et FLUNPS ce qui prouve que les reproducteurs sont immunisés contre cette maladie et ont décliné par la suite, enregistrant un demi-vie de 12,3 j par le test ELISA FLUH9S, 12,7 j par le test ELISA FLUNPS et 17,9j par le test de IHA. Ainsi une cohérence a été notée entre les résultats de la demi-vie entre le FLUH9S et FLUNPS contrairement à l'IHA où le temps de demi-vie est supérieur d'environ cinq jours par rapport à l'ELISA.

PARTIE 2

Élevages vaccinés à J1

Malgré la vaccination à J1 les anticorps anti-H9N2 ont subi une dégradation progressive avec l'âge des poulets. Certains lots de cette population, ont montré une augmentation exponentielle des titres sérologiques en fin de bande ce qui laisse supposer un passage virale sur les sites en question. Les résultats des tests sérologiques pour chaque lot vaccinés à J1 sont illustrés dans la figure 2.

Élevages vaccinés entre J5 et J7

Concernant les cinq lots vaccinés entre J5 et J7, les titres d'anticorps anti-H9N2 ont continué à diminuer jusqu'à la fin de bande où un début d'augmentation des titres a été enregistré, ce qui laisse supposer un début de la réaction vaccinale,

Les résultats sérologiques obtenus pour chaque lot vaccinés entre J5 et J7 sont illustrés dans la figure 3.

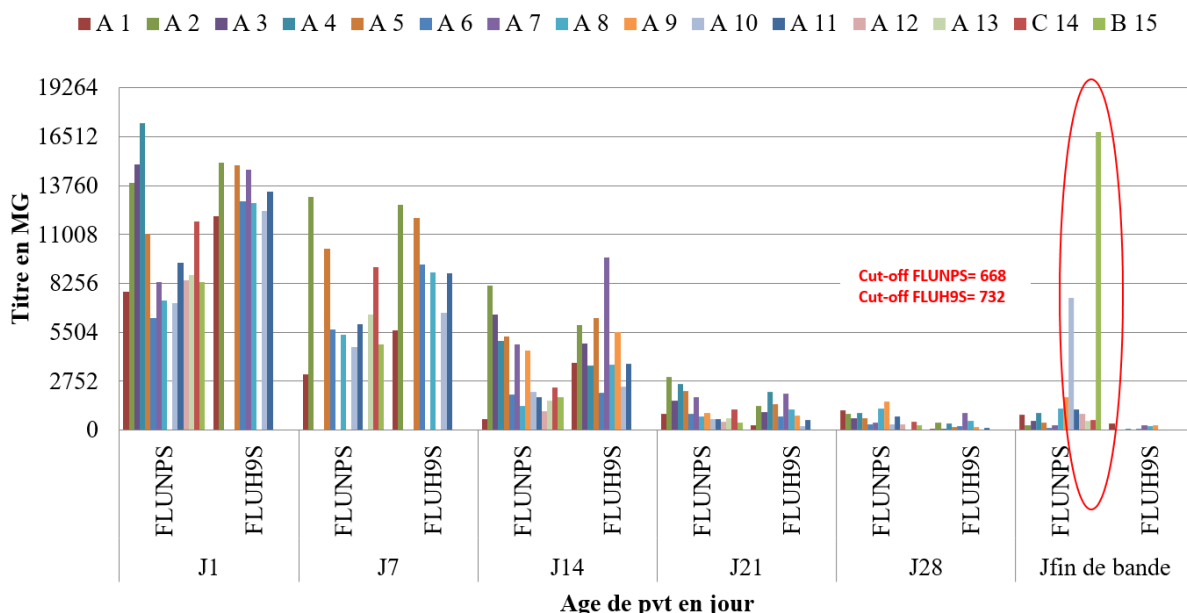


Figure 2 : Cinétique des titres d'anticorps anti-H9N2 dans les élevages vaccinés à J1

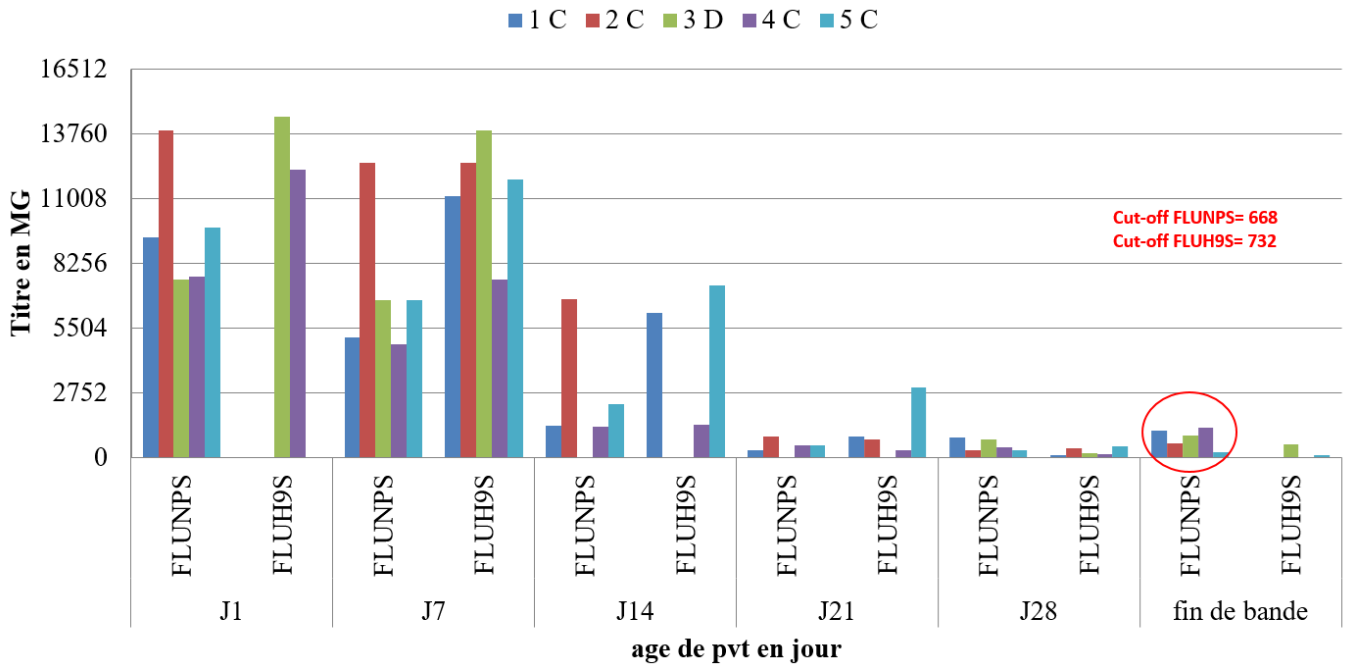


Figure 3: Cinétique de dégradation des anticorps dans les élevages vaccinés entre J5 et J7

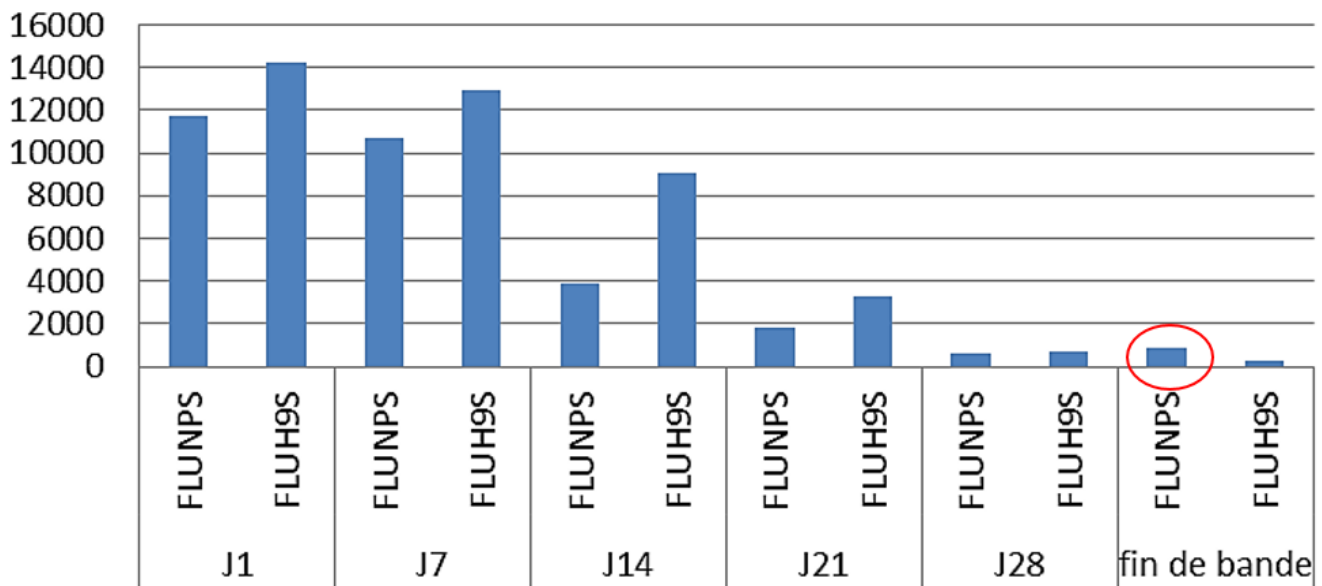


Figure 4: TGM des anticorps anti-H9N2 dans les élevages vaccinés à J14

Élevages vaccinés entre J14

La courbe des titres des anticorps anti-H9N2 chez les poulets vaccinés à 14 jours a montré un début de séroconversion à la fin de bande.

Les résultats sérologiques obtenus pour les lots vaccinés à J14 sont illustrés dans la figure 4.

Le tableau 6 présente les moyennes des demi-vies des anticorps anti-H9N2 des différents groupes étudiés

L'ensemble de ces résultats ont montré que la demi-vie des anticorps anti-H9N2 chez les lots vaccinés est légèrement plus longue que la demi-vie des lots non-vaccinés qui était de 12,3j par le test ELISA FLUH9S, 12,7j par le test ELISA FLUNPS. En ce qui concerne les lots vaccinés à différents âges, la moyenne demi-vie est plus longue chez les lots vaccinés à J14 par rapport aux lots vaccinés à J1 et ceux vaccinés entre J5 et J7.

Tableau 6: La demi-vie (moyenne ± ET) des anticorps anti-H9N2 chez les groupes étudiés

Groupe	Moyenne des demi-vies des anticorps anti-H9N2			
	Poussins non vaccinés	Lots vaccinés à J1	Lots vaccinés entre J5 et J7	Lots vaccinés à J14
FLUNPS	12,3±0,6	14,8± 1,7	14,1±1,5	15,2±0
FLUH9S	12,7±0,7	13,5±1,5	14,7±1,5	17,1±0

DISCUSSION

Notre étude a été consacrée à analyser dans un premier temps la cinétique des anticorps maternels anti-H9N2 chez le poulet de chair non vaccinés, ensuite d'évaluer la réponse sérologique chez le poulet de chair face à différents type de vaccin et différents âges de vaccination appliqués dans les conditions de terrain en la comparant à la cinétique des AOM anti-H9N2 chez le poulet de chair en absence de vaccination.

Nos résultats ont montré que les AOMs transférés passivement aux poussins ont été élevés à l'éclosion ce qui prouve que les reproducteurs sont immunisés contre cette maladie et ont décliné par la suite et se sont presque épuisés à l'âge de 28 jours, enregistrant des demi-vies de 12,3 j par le test ELISA FLUH9S, 12,7 j par le test ELISA FLUNPS et 17,9 j par le test de IHA.

En effet, la décroissance des AOM anti H9N2 a été révélée par plusieurs auteurs, cependant des divergences dans les demi-vies ont été évoquées dans le taux de décroissance des AOM anti-H9N2. Gharaibeh et al., (2013) ont signalé un épuisement total des AOM anti-H9N2 au 20^{ème} jour et une demi-vie de 4.2 jours bien même qu'avec le test ELISA. Les variations de demi-vie des AOMs peuvent provenir de facteurs liés tout d'abord au programme de vaccinations appliqués chez les reproducteur, l'âge des reproducteurs d'où proviennent les poussins analysés, le statut sanitaire de ces derniers (présence ou absence de passage viral durant la période d'élevage et de production), la génétique des poulets, et les types des tests sérologiques utilisés dans chaque étude.

Dans le contexte vaccinal, et dans des différentes régions du territoire marocain, la cinétique des anticorps anti-H9N2 chez les lots vaccinés à différents âges pourrait montrer des différences, en effet, la présente étude a révélé que les anticorps anti-H9N2 régressent après la vaccination suivant l'âge et suit ainsi une tendance semblable à celle de la cinétique des anticorps en absence de vaccination. Cependant, en comparant les temps de demi-vie des anticorps anti-H9N2 chez les lots vaccinés et les lots non vaccinés, une augmentation légère du temps de demi-vie chez les lots vaccinés a été enregistrée ce qui laisse supposer un effet vaccination (tout type de vaccin utilisé) sur la cinétique des anticorps anti-H9N2.

L'effet vaccination manifesté par l'amélioration des durées de demi vie calculé chez les lots vaccinés à J14, pourrait être expliqué par le début de la déclinaison des AOMs à cet âge, ainsi le virus atténué vaccinal serait instauré chez des individus ayant moins d'AOMs. Dans ces conditions, la réponse immunitaire serait probablement meilleure et permettant un meilleur relargage du vaccin.

CONCLUSION

Ainsi, nous pouvons conclure que l'induction des anticorps anti-H9N2 par la vaccination a été nettement inhibée par les AOMs, malgré le prolongement de la durée de demi-vie qui a été démontré.

Afin de mieux élucider l'effet de la vaccination anti-influenza aviaire H9N2 en poulet de chair, d'autres études de terrain comparatives doivent être menées, tout en considérant plusieurs facteurs, notamment, le contexte épidémiologique, l'âge de la vaccination, type de vaccin utilisé.

RÉFÉRENCES

- Fellahi S., Nassik S., Ducatez M., Guérin J. L. (2017). Epidemiological and virological data on emergence of H9N2 avian influenza virus in Morocco 12^{èmes} Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras (JRA-JRPFG 2017), 5 & 6 avril 2017, Tours, France:178-182.
- El-Houadfi M., Fellahi S., Nassik S., Guérin J. L., Ducatez M. (2016). First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. *Virology Journal*, 13:140.
- Boumart Z., Bamouh Z., Jazouli M., Zecchin B., Fusaro A., Salviato A., Monne I., Omari Tadlaoui K., El Harrak M. (2019). Pathogenicity and Full Genome Sequencing of the Avian Influenza H9N2 Moroccan Isolate 2016. *Avian Diseases*, 63: 24-30.
- OIE (2019). Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres. Chapitre2-3-4. Disponible sur: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf.
- Zarkov S. (2006). Comparison of haemagglutination inhibition (HI), immunodiffusion (ID) and ELISA tests for detecting anti avian influenza antibodies in chicken after inoculations with inactivated antigen I. *Revue Méd. Vét.*, 157: 336-340.
- Beck J.R., Swayne D.E. (1997). Evaluation of ELISA for avian influenza serologic and diagnostic programs: comparison with agar gel precipitin and hemagglutination inhibition tests. Fourth International Symposium on Avian Influenza, USA: 297-303.
- Gharaibeh S., Mahmoud, K. (2013). Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poultry Science*, 92: 2333-2336.
- Lamichhane C.M., L.Kirkegaard L. (1997). Comparison of serological methods for the detection of antibodies to Avian Influenza Virus in chicken sera. Fourth International Symposium on Avian Influenza, USA: 366-372.
- Sala G., Cordioli P., Moreno-Martin A., Tolles M., Brocchi E., Piccirillo A. and Lavazza A. (2003). ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera. *Avian Diseases*, 47: 1057-1059.
- Meulemans G., Carlier M.C, Gonze M. and Petit P. (1987). Comparison of hemagglutination-inhibition, agar gel precipitin, and enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibodies against influenza viruses in chickens. *Avian Diseases*, 31: 560-563.
- Zhou E.M., Chan M., Heckert R. A., Riva J. and Cantin M.F. (1998). Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. *Avian Diseases*, 42: 517-522.
- El-Kady M. F., Dahshan A. M. , Madbouly H. M. (2007). Studies on infectious bursal disease maternal immunity decay curve in native and Lohmann chicken breeds. *Bs. Vet. Med. J.*, 5th scientific conference: 34-40.