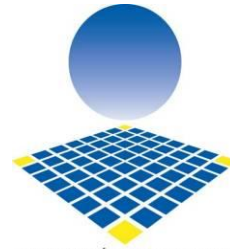




ENVT
23 Chemin des Capelles
BP 87614
31076 Toulouse Cedex 3



CIRAD
Unité de Service Enseignement
et Formation en Elevage
Campus de Baillarguet
TA A-71 / B
34 398 MONTPELLIER Cedex 5



UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
Université Montpellier II
Faculté des Sciences
Place Eugène Bataillon
34 095 MONTPELLIER Cedex 5

MASTER 2EME ANNEE
MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT-BGAE
SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES
ET PARASITAIRES
PARCOURS SANTE ANIMALE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE
DANS LES PAYS DU SUD (SAEPS)

RAPPORT DE STAGE

SURVEILLANCE VIROLOGIQUE DE
L'INFLUENZA PORCIN DANS LES ZONES A
RISQUE DE FOYER H5N1 HAUTEMENT
PATHOGENE DANS LE NORD-VIETNAM

Présenté par

Eugénie Baudon

Réalisé sous la direction de : Dr. François Roger

Organisme et pays : CIRAD Vietnam

Période du stage : du 07 mars au 20 juillet 2009

Date de soutenance : 17 septembre 2009

Année universitaire 2008-2009

MASTER 2EME ANNEE
MENTION SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT-BGAE
SPECIALITE BIODIVERSITE DES INTERACTIONS MICROBIENNES
ET PARASITAIRES
PARCOURS SANTE ANIMALE ET EPIDEMIOSURVEILLANCE
DANS LES PAYS DU SUD (SAEPS)

RAPPORT DE STAGE

SURVEILLANCE VIROLOGIQUE DE
L'INFLUENZA PORCIN DANS LES ZONES A
RISQUE DE FOYER H5N1 HAUTEMENT
PATHOGENE DANS LE NORD-VIETNAM

Présenté par
Eugénie Baudon

Réalisé sous la direction de : Dr. François Roger

Organisme et pays : CIRAD Vietnam

Période du stage : du 07 mars au 20 juillet 2009

Date de soutenance : 17 septembre 2009

Année universitaire 2008-2009

RESUME ET MOTS-CLES

RESUME

L'émergence du virus influenza H1N1 pandémique d'origine porcine en 2009 montre l'importance de la surveillance des virus influenza porcins. La situation au Vietnam est favorable au réassortiment de souches virales humaines, porcines et aviaires chez le porc du fait du grand nombre des petits élevages multi-espèces avec un faible niveau de biosécurité. Afin d'étudier la transmission interspécifique porc-volaille, deux enquêtes ont été mises en place :

- une enquête transversale avec sondage aléatoire pour estimer la viroprévalence de l'influenza porcine et identifier les facteurs de risque,
- une enquête de surveillance des maladies respiratoires porcines pour isoler du virus.

Au total, 604 porcs et 475 volailles ont été prélevés. Des écouvillons porcins ont été testés avec un test de détection rapide d'antigène, puis par RRT-PCR, et des écouvillons aviaires par RRT-PCR uniquement. Tous les tests ont été négatifs. Au total, 93 élevages ont été enquêtés, dont 28 avec des symptômes respiratoires chez les porcs. La viroprévalence maximale estimée pour l'échantillon, sur WinEpiscope®, est de 4% pour les élevages de l'enquête transversale avec un degré de confiance de 95%, et de 10% dans les élevages avec symptômes. La place des maladies respiratoires porcines dans les élevages a été évaluée grâce aux questionnaires.

Cette étude a permis d'identifier les limites des enquêtes transversales et de surveillance des virus influenza porcins. Des propositions ont été émises concernant les protocoles de surveillance des maladies respiratoires porcines, d'études en abattoir, et d'études cinétiques ciblées.

MOTS CLES : virus influenza, porc, volaille, Vietnam, surveillance, prévalence, facteurs de risque, transmission interspécifique.

ABSTRACT AND KEYWORDS

ABSTRACT

The emergence of the influenza H1N1 pandemic virus with a porcine origin in 2009 shows the importance of swine influenza virus surveillance programs. The situation in Vietnam is conducive to the reassortment of human, swine and avian virus strains in pigs because of the large number of multi-species small farms with low biosafety level. To study the pig-poultry interspecies transmission, two surveys were carried out:

- a transverse survey with random sampling to estimate the swine influenza viroprevalence and to identify risk factors,
- a survey based on surveillance of porcine respiratory diseases to isolate the virus.

In total, 604 pigs and 475 poultry were sampled. Porcine swabs were tested with a rapid influenza antigen detection test, then with RRT-PCR, and avian swabs by RRT-PCR only. All tests were negative. In total, 93 farms were investigated, of which 28 with respiratory symptoms in pigs. The maximum possible viroprevalence estimated for the sample, with WinEpiscope®, is 4 % for transverse survey farms with a level of confidence of 95 %, and 10 % in farms with symptoms. The importance of porcine respiratory diseases in farms was determined through the use of questionnaire analysis.

This study enables the identification of the limits of transverse and surveillance surveys for swine influenza viruses. Suggestions were formulated concerning protocols for porcine respiratory disease surveillance, slaughterhouse surveys, and targeted kinetic studies.

KEY WORDS : influenza virus, pig, poultry, Vietnam, surveillance, prevalence, risk factor, interspecies transmission.

SOMMAIRE

RESUME ET MOTS-CLES	1
ABSTRACT AND KEYWORDS	1
SOMMAIRE.....	2
LISTE DES TABLEAUX	4
LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES ANNEXES	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
REMERCIEMENTS.....	6
Introduction	7
<u>I. Filières porcine et avicole au Vietnam et contexte Influenza</u>	8
<u>I.1. Présentation de la production porcine et avicole au Vietnam</u>	8
I.1.1. Présentation générale du Vietnam	8
I.1.2. Les productions porcine et avicole au Vietnam	8
a) Place des cheptels porcins et aviaires au Vietnam.....	8
b) Les systèmes de production porcine et avicole	8
<u>I.2. Influenza A aviaire et porcine : caractéristiques virales et contexte en Asie du Sud-Est</u>	9
I.2.1. Caractéristiques virologiques	9
a) Structure du virus.....	9
b) Des virus très évolutifs	10
I.2.2. Contexte épidémiologique et écologie des virus influenza A	10
a) Les sous-types porcins et aviaires en Asie du Sud-Est.....	10
b) Cas de transmission de l'influenza A entre les porcs, les volailles, et l'Homme.....	12
I.2.3. Aspects cliniques et excrétion des virus influenza A	13
a) Chez les porcs	13
b) Chez les volailles	13
<u>I.3. Objectifs</u>	14
I.3.1. Objectifs de la thèse de C. Trévenec	14
I.3.2. Objectifs de l'étude virologique	14
<u>II. Matériel et méthode</u>	15
<u>II.1. Zone d'étude</u>	15
<u>II.2. Choix de la période d'étude</u>	16
<u>II.3. Echantillonnage</u>	16
II.3.1. Etude de viroprévalence	16
a) Population cible et population source.....	16
b) Taille d'échantillon.....	17
c) Tirage au sort	18
II.3.2. Etude basée sur la surveillance des maladies respiratoires porcines.....	18
a) Zone d'étude ciblée et population.....	18
b) Définition de cas.....	19
c) Déclaration des cas	19
d) Taille de l'échantillon.....	20
<u>II.4. Elaboration du questionnaire</u>	20
<u>II.5. Prélèvements et collecte d'informations sur le terrain</u>	20
II.5.1. Etude de viroprévalence	20
II.5.2. Etude basée sur la surveillance des maladies respiratoires porcines.....	21
<u>II.6. Diagnostic et analyses en laboratoire</u>	22
II.6.1. Diagnostic clinique dans les fermes avec symptômes respiratoires.....	22
II.6.2. Diagnostic avec le test Flu Detect Synbiotics® dans les fermes avec symptômes	22
II.6.3. Diagnostic de laboratoire	22

a) NIVR et essai inter laboratoire	22
b) Extraction d'ARN et RRT-PCR sur les écouvillons de porcs et de volailles.....	23
c) Culture et isolement viral par inoculation sur œufs embryonnés	23
d) Sous-typage par inhibition d'hémagglutination	24
e) Analyse sérologique pour les fermes avec symptômes	24
<u>II.7. Résultats attendus</u>	24
III. Résultats	25
<u>III.1. Nombre de fermes et de prélèvements</u>	25
<u>III.2. Résultats des analyses de laboratoire</u>	26
III.2.1. Résultats des tests rapides sur le terrain pour l'étude de surveillance	26
III.2.2. Résultats des RRT-PCR.....	26
III.2.3. Résultats sérologiques pour les fermes avec symptômes	26
<u>III.3. Analyse statistique concernant la viroprévalence</u>	27
<u>III.4. Epidémiologie des syndromes grippaux</u>	28
III.4.1. Place et gestion des maladies respiratoires dans les élevages enquêtés	28
III.4.2. Commémoratifs des maladies respiratoires dans les élevages de porcs avec symptômes	29
IV. Discussion	31
<u>IV.1. Les biais de l'étude</u>	31
IV.1.1. Biais de sélection	31
IV.1.2. Biais d'observation	31
<u>IV.2. Hypothèses concernant les résultats négatifs</u>	32
IV.2.1. Echantillonnage et période de l'étude	32
IV.2.2. Réalisation et analyse des prélèvements.....	33
IV.2.3. Place de l'influenza porcine dans le complexe des maladies respiratoires porcines.....	34
<u>IV.3. Propositions pour les études ultérieures</u>	34
IV.3.1. Recommandations de la FAO concernant le virus Pandemic H1N1/2009.....	34
IV.3.2. La surveillance avec définition de cas des maladies respiratoires porcines	35
a) Comment inciter les éleveurs et les vétérinaires à déclarer les cas ?.....	35
b) Comment établir une définition du cas suspect adaptée ?.....	36
IV.3.3. Etudes en abattoir	36
IV.3.4. Etude de cinétique	37
IV.3.5. Choix des méthodes d'analyse en laboratoire	37
Conclusion	40
BIBLIOGRAPHIE	41
ANNEXES	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Cheptel porcin et types de production au Vietnam.....	9
Tableau 2 : Sous-types d'influenza A infectant les porcs de manière endémique dans le monde	10
Tableau 3 : Revue non exhaustive des cas de transmission de virus influenza aviaire aux porcs.....	12
Tableau 4 : Nombre d'écouvillons réalisés et analysés	25
Tableau 5 : Nombre de prises de sang réalisées, analysées en ELISA A	25
Tableau 6 : Résultats ELISA A pour les élevages avec symptômes	27
Tableau 7 : Confrontation protocoles versus objectifs	39

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du virus influenza A	9
Figure 2 : Répartition temporelle des foyers d'IAHP au Vietnam de janvier 2004 à Février 2006	11
Figure 3 : Evolution de l'infection au SIV	13
Figure 4 : Carte du Nord-Vietnam : localisation des provinces de Ha Tay et Bac Giang	15
Figure 5 : Résultats RRT-PCR négatifs	26
Figure 6 : Estimation de la viroprévalence maximale	27
Figure 7 : Calcul du degré de confiance en fonction de la prévalence	28

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Effectifs du cheptel vietnamien, en milliers de têtes.....	45
ANNEXE 2 : Aperçu non exhaustif des différents sous-types isolés en Asie et aux Etats-Unis	46
ANNEXE 3 : Districts et communes de la zone d'étude - Ha Tay et Bac Giang.....	47
ANNEXE 4 : Fiche distribuée aux Vétérinaires	48
ANNEXE 5 : Fiche distribuée aux éleveurs de porcs.....	48
ANNEXE 6 : Questionnaire	49
ANNEXE 7 : Composition du milieu de transport pour écouvillons	59
ANNEXE 8 : Protocoles d'extraction d'ARN et de RRT-PCR.....	60
ANNEXE 9 : Déclaration de maladies contagieuses à manifestations respiratoires dans l'année.....	63
ANNEXE 10 : Morbidité et Létalité chez les porcs dans l'année	64
ANNEXE 11 : Période des maladies respiratoires porcines.....	65
ANNEXE 12 : Vaccinations des porcs pratiquées dans les élevages	65
ANNEXE 13 : Morbidité et Létalité chez les volailles dans l'année	66
ANNEXE 14 : Période des syndromes grippaux chez les volailles	67
ANNEXE 15 : Vaccinations Influenza et maladie de Newcastle pratiquées chez les volailles	68
ANNEXE 16 : Symptômes déclarés vs observés pour les fermes avec symptômes	68
ANNEXE 17 : Maladies citées dans les fermes avec symptômes	69
ANNEXE 18 : Délai entre l'apparition des symptômes et les prélèvements	69

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide Ribonucléique

CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

Ct : Cycle threshold

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FAO : Food and Agriculture Organization

GPS : Global Positioning System

GSO : General Statistics Office Of Vietnam

HA : Hémagglutinine

IAFP : Influenza Aviaire Faiblement Pathogène

IAHP : Influenza Aviaire Hautement Pathogène

M1, M2 : Protéines Matricielles 1 et 2

NA : Neuraminidase

NIVR : National Institute of Veterinary Research

NP : Protéines Nucléiques

NS1, NS2 : Protéines Non Structurales 1 et 2

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

PB1, PB2, PA : Protéines polymérasés

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCV : Porcine CircoVirus

PRRSV : Porcine Reproductive and Respiratory syndrome Virus

RRT-PCR : Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

SIV : Swine Influenza Virus

WHO : World Health Organization

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Docteur François Roger,

De l'unité AGIRs du CIRAD,

Pour l'encadrement de notre travail et ses conseils avisés,

Et qui avec disponibilité et bienveillance nous a permis de mener à bien ce stage.

Sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jean-Luc Guérin,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Qui nous a fait l'honneur d'encadrer notre travail.

Sincères remerciements.

A Mademoiselle Carlène Trévenec,

De l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, PhD en accueil à l'unité AGIRs du CIRAD,

Que nous remercions vivement pour son accueil, sa disponibilité, et ses bons conseils.

Sincère reconnaissance.

A Madame Stéphanie Desvaux,

De l'unité AGIRs du CIRAD,

Pour son aide et ses précieux conseils.

Sincères remerciements.

A l'équipe de l'Université d'Agriculture de Hanoï,

A Monsieur le Docteur Vu Dinh Ton,

Directeur du Centre d'Etude Interdisciplinaire du Développement Durable,

Vice doyen de l'Université d'Agriculture de Hanoï,

Pour l'encadrement de notre travail, et pour ses conseils avisés.

Sincères remerciements.

A Monsieur Nguyen Cong Oanh,

Pour son aide précieuse dans la réalisation de notre travail, et pour sa bonne humeur.

Sincères remerciements.

A l'équipe du National Institute of Veterinary Research,

A Monsieur le Docteur Nguyen Tien Dung,

Directeur du département de virologie au NIVR,

A Madame Ho Thu Huong,

A Madame Nguyen Thuy Duyen,

A Monsieur Dao Duy Tung,

Chercheurs au NIVR,

Pour leur aide, leurs conseils et leur accueil.

Sincères remerciements.

Aux équipes des services vétérinaires des provinces de Ha Tay et Bac Giang,

Pour leur précieuse collaboration, et les journées de terrain passées dans la bonne humeur.

Sincères remerciements.

A tous les enseignants du Master, du CIRAD, de l'ENVT, et de l'Université Montpellier 2,

Pour leur formation, et leur aide lors de notre stage.

A Marion Petit Sinturel et tous les amis rencontrés au Vietnam,

Pour leur disponibilité et leur enthousiasme dans la découverte de ce merveilleux pays.

Introduction

L'influenza est une maladie infectieuse virale d'importance mondiale, et dont les caractéristiques virales, avec une évolution continue du virus, sont responsables d'épidémies annuelles et de pandémies occasionnelles chez l'Homme. Les virus influenza A se retrouvent dans diverses espèces, à savoir l'Homme, les porcs, les chevaux, les mammifères marins, et différentes espèces d'oiseaux. Le contexte actuel avec la pandémie à virus H1N1 et le risque pandémique avec l'Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) H5N1 est particulièrement préoccupant. Les porcs sont des hôtes importants dans l'écologie des virus influenza A car ils sont réceptifs à l'infection par les virus influenza A aviaires et humains, ils permettent leur réplication. Ils sont donc des hôtes potentiels pour le réassortiment des virus influenza A d'origines aviaire et humaine. De plus, les porcs sont souvent en contact étroit avec l'Homme et les volailles. Cela peut mener à de nouvelles souches de virus, dont certaines pourraient être transmissibles à d'autres espèces dont l'Homme (Webster *et al.*, 1992).

Le contexte en Asie du Sud-Est est particulièrement favorable à ce réassortiment, notamment au Vietnam où les fermes familiales multi-espèces, principalement porcs et volailles, sont nombreuses. Le niveau de biosécurité est généralement très faible dans ce type d'exploitation, avec des bâtiments ouverts ou inexistant, il y a donc un contact étroit entre ces deux espèces. Ces conditions expliquent en partie l'endémisation de l'influenza aviaire au Vietnam.

L'étude menée lors du stage avait pour but d'étudier, par enquête virologique, la circulation de virus influenza A chez les porcs et les volailles dans ces systèmes d'élevage, d'estimer une viroprévalence, d'identifier des facteurs de risque de cette circulation, et par la suite, en-dehors du cadre du stage, de caractériser des souches de virus influenza porcine (Swine Influenza Virus, SIV) afin d'identifier d'éventuelles transmissions interspécifiques. La zone d'étude se situait dans deux provinces, une dans le delta du Fleuve Rouge et une dans la région Nord-Est du Vietnam. Le stage s'est inséré dans le projet de thèse (2007-2010) de Carlène Trévennec, qui s'intitule « Analyse et modélisation du risque de transmission du virus influenza de type A entre les filières avicoles et porcines au Vietnam », rattaché au projet GRIPAVI du CIRAD (Ecologie et épidémiologie de la grippe aviaire dans les pays du Sud), projet FSP (Fonds de Solidarité Prioritaire) financé par le Ministère des Affaires Etrangères. Le projet de thèse global se déroule en plusieurs étapes avec : des enquêtes sérologiques et virologiques, une appréciation du risque de transmission du virus influenza aux porcs, et une étude sur les conséquences et sur la gestion du risque.

Lors du stage, je suis donc intervenue sur la première partie du projet de thèse concernant les enquêtes sérologiques et virologiques. Deux études ont été menées en parallèle, l'étude virologique, exposée dans ce rapport, et l'étude sérologique correspondant au stage de Marion Petit Sinturel. Les deux enquêtes ont été réalisées de manière conjointe lors des sorties sur le terrain, les deux protocoles ont donc dû être harmonisés. Ces études ont associé la collecte d'échantillons (sérums, écouvillons), et le recueil d'informations générales sur les élevages visités.

Tout d'abord le point va être fait sur les filières porcines et avicoles au Vietnam, ainsi que sur le contexte influenza A en Asie du Sud-Est. Ensuite, le déroulement de l'étude virologique sera décrit. Enfin, les résultats seront exposés, une discussion sera effectuée, et des recommandations apportées pour la suite du projet.

I. Filières porcine et avicole au Vietnam et contexte Influenza

I.1. Présentation de la production porcine et avicole au Vietnam

I.1.1. Présentation générale du Vietnam

La République Socialiste du Vietnam est située au cœur de l'Asie du Sud-Est, elle a une population de 85,2 millions d'habitants, et une superficie de 331 212 km² (GSO, 2009 (1)). La population rurale représente 73% de la population totale (GSO, 2009 (2)), et 75% des terres sont utilisées pour l'agriculture (GSO, 2009 (3)). D'un point de vue administratif, le Vietnam a pour capitale Hanoï, et il est composé de 64 provinces, comprenant 594 districts, dont 549 ruraux et 45 urbains, eux-mêmes subdivisés en 9 109 communes (GSO, 2009 (4)).

Notre étude s'est déroulée au Nord-Vietnam, dans les régions du delta du Fleuve Rouge et du Nord-Est, respectivement dans les provinces de Ha Tay et de Bac Giang. Par la suite les raisons de ce choix seront expliquées.

I.1.2. Les productions porcine et avicole au Vietnam

a) Place des cheptels porcin et aviaire au Vietnam

Le cheptel total vietnamien a connu une croissance de 11,6% en 2005, cela est dû à l'augmentation des productions de porcs et de bœufs, et à la stabilisation du nombre de volailles après la baisse de production de 2004 due aux épizooties d'IAHP (GSO, 2009 (5)) (Annexe 1). Le porc a de manière générale une place prépondérante dans la production de viande au Vietnam ; en 2005, il représentait 81% de la production totale, alors que la part de viande de volaille est de 11,5%, et celle de bœuf, buffle et autre de 7,5% (Nguyen Thi Huong and Wayde, 2006).

Les productions de volailles et de porcs sont principalement réparties dans les deltas du Fleuve Rouge et du Mékong, et dans la région du Nord-Est. Les régions du Nord-Est et du delta du Fleuve Rouge sont les plus peuplées du Vietnam en populations porcine et aviaire, il en est de même pour les provinces de Ha Tay et Bac Giang au niveau régional (GSO, 2009 (6), 2009 (7)).

b) Les systèmes de production porcine et avicole

Il existe plusieurs types de production porcine au Vietnam (Tableau 1). Les élevages familiaux, de 1 à 10 cochons, sont les plus répandus, ils représentent 80% du cheptel national. Une ferme est considérée comme commerciale à partir de 20 truies ou de 100 porcs à l'engrais. Dans notre étude, ont été enquêtés les élevages familiaux et ceux de petite taille (de 30 à 100 porcs à l'engrais). A eux deux ils représentent 90% du cheptel national. Les races porcines qui y sont élevées peuvent être des races locales, exotiques, ou des porcs issus de croisement. Il est à noter qu'au Vietnam presque toute la production de porc est destinée à la consommation locale, seuls 1 à 2% sont pour l'exportation.

Holding type	Herd size	Trends	% of national herd	Number of pigs (million)	Breeds
Smallholder or backyard	1–10 pigs	Modest increase	80%	15.1	North: mostly local South: mostly cross with exotic
Small-medium	5–20 sows, or 30–100 fattening	Significant growth	10%	1.88	Cross and exotic
Medium	20–500 sows, or 100–4000 fattening	Rapid growth	5%	0.94	Exotic
Large	>500 sows, or >4000 fattening	Modest increase	5%	0.94	Exotic

Tableau 1 : Cheptel porcin et types de production au Vietnam (La Van Kinh, 2002)

La population de volailles au Vietnam est composée principalement de poulets, canards, et canards de barbarie. Environ 50% des volailles sont élevées en fermes familiales, jusqu'à 200 oiseaux, 25 à 30% sont des fermes commerciales de 200 à 2000 oiseaux, et 18 à 20% sont des fermes industrielles de 2000 à 100000 oiseaux (Nguyen Thi Huong and Wayde, 2006).

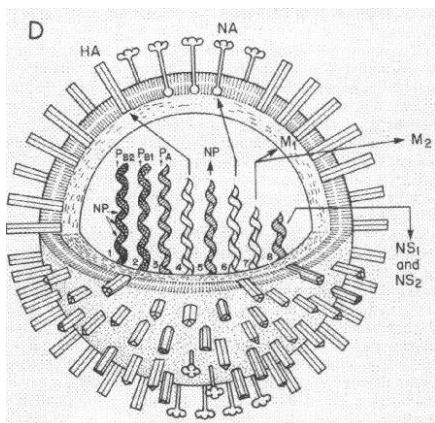
Ainsi l'élevage familial a une place très importante dans les filières porcine et avicole au Vietnam, en effet la plupart des familles en milieu rural possèdent quelques poulets ou canards, et quelques porcs dans leur arrière-cour.

I.2. Influenza A aviaire et porcin : caractéristiques virales et contexte en Asie du Sud-Est

I.2.1. Caractéristiques virologiques

a) Structure du virus

Les virus influenza A font partie de la famille des *Orthomyxoviridae*. Il existe d'autres types de virus influenza, mais chez les porcs et les volailles on ne trouve que le type A. Ce sont des virus enveloppés d'une bicouche lipidique dérivée de l'hôte dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales que sont les hémagglutinines (HA), les neuraminidases (NA) et les protéines matricielles M2. Ce sont les protéines HA et NA qui caractérisent le sous-type viral, elles ont une importance capitale dans l'infection et l'immunité de l'hôte. Au centre se trouvent les nucléocapsides du génome viral. Le génome des virus influenza A est composé de huit segments uniques d'ARN négatif simple brin (Webster *et al.*, 1992) (Figure1).



Légende :

HA = Hémagglutinines
 NA = Neuraminidases
 M1, M2 = Protéines Matricielles
 NP = Protéines Nucléiques
 PB1, PB2, PA = Protéines Polymérisantes
 NS1, NS2 = Protéines Non Structurales

Figure 1 : Structure du virus influenza A (Webster *et al.*, 1992)

b) Des virus très évolutifs

Les virus à ARN sont beaucoup plus sujets aux mutations en comparaison aux virus à ADN du fait des erreurs de réplication des ARN polymérases, il s'agit de la dérive antigénique. De plus, pour l'influenza A, l'ARN est segmenté ; lors de l'assemblage du virion dans la cellule hôte, l'incorporation des segments d'ARN se fait en partie de façon aléatoire. Cela permettrait la formation de virus avec une nouvelle combinaison génétique, soit un réassortiment génétique, dans le cas de cellules infectées simultanément avec deux différents virus. On parle de saut antigénique. Ces changements génétiques et antigéniques sont les facteurs les plus importants ayant un impact sur l'épidémiologie de l'influenza A dans le monde (Webster *et al.*, 1992).

I.2.2. Contexte épidémiologique et écologie des virus influenza A

a) Les sous-types porcins et aviaires en Asie du Sud-Est

Seize différentes hémagglutinines (H1-H16) et neuf neuraminidases (N1-N9) sont connues pour les virus influenza A (Fouchier *et al.*, 2005). Chez les oiseaux d'eau sauvages se retrouvent tous les sous-types existants, ils sont donc des réservoirs vis-à-vis des oiseaux domestiques et des mammifères (Olsen *et al.*, 2006).

Virus Influenza Porcins

Les porcs sont les réservoirs principaux de virus influenza H1N1 et H3N2 qui sont en général endémiques dans les populations porcines mondiales, et responsables de l'une des maladies respiratoires les plus fréquentes. Ces sous-types regroupent le virus classique porcine H1N1, le « avian-like » H1N1, et les « avian-like » et « human-like » porcins H3N2 (« -like » faisant référence à l'hôte précédent). Des virus H1N2 ont été isolés, dérivés du virus classique porcine H1N1 et du virus « human-like » porcine H3N2 au Japon, et dérivés des virus humains et « human-like » porcins en Grande Bretagne (Tableau 2).

Subtype	Location	Comments
H1N1	North America	'Classical' virus, first isolated in 1930 in North America
	Europe	
	Asia	
	South America	
	Europe	
H3N2	Asia	'Human-like' virus, first isolated in 1970 in Asia
	Europe	
	North America	
H3N2	South America	'Avian-like' virus, first isolated in 1978
	Africa	
	Asia	
	Asia	
H1N2	Asia	Classical/'human-like' reassortant in Japan
	Europe	Human/'human-like' reassortant in Great Britain

Tableau 2 : Sous-types d'influenza A infectant les porcs de manière endémique dans le monde (Brown, 2000)

D'autres sous-types viraux ont pu être isolés chez les porcs lors de nombreuses études virologiques (Annexe 2), notamment en Asie et aux Etats-Unis, soient des virus H3N1, H9N2, et H5N1 (Guan et al., 1996; Peiris et al., 2001; Choi et al., 2002; Thawatsupha and Waicharoen, 2003; Choi et al., 2004; Li et al., 2004; Choi et al., 2005; Yu et al., 2007; Chutinimitkul et al., 2008; Cong et al., 2008; Nakhathai et al., 2008; Shieh et al., 2008; Yu et al., 2008). Une étude sérologique a mis en évidence l'infection de porcs par un autre sous-type que ceux énoncés précédemment, un virus aviaire H4 en Chine (Ninomiya *et al.*, 2002), et une étude virologique un sous-type H4N6 au Canada (Karasin *et al.*, 2000).

Virus Influenza chez les Volailles (poulets et canards)

Les souches virales ont été classées en fonction de leur pathogénicité en virus hautement pathogène (Influenza Aviaire Hautement Pathogène, IAHP) ou en virus faiblement pathogène (Influenza Aviaire Faiblement Pathogène, IAFP) chez les volailles domestiques. Les virus IAHP sont uniquement de sous-types H5 et H7, et les virus IAFP peuvent être de différents sous-types d'hémagglutinine dont les H5 et H7 faiblement pathogènes (Webster *et al.*, 1992). Les différents virus IAHP isolés depuis 1959 sont des sous-types H5N1, H5N2, H5N8, H5N9, H7N3, H7N4, et H7N7 (Alexander, 2000). Concernant les virus IAFP chez les poulets et les canards domestiques, les sous-types répertoriés, en particulier en Asie, sont les H9N2, H9N3 (Alexander, 2000), H5N2 (Shieh *et al.*, 2008), H4 (Karasin *et al.*, 2000) et H6 (Chin *et al.*, 2002).

Concernant l'IAHP H5N1, elle est isolée pour la première fois en 1996 sur une oie dans la province de Guangdong en Chine. En 1997 des foyers sont rapportés sur des volailles à Hong Kong, et les premiers cas humains (18 dont 6 décès) y sont déclarés. Au Vietnam, 111 cas humains ont été rapportés jusqu'à ce jour, dont 56 décès, c'est le deuxième pays le plus touché après l'Indonésie (WHO, 2009 (1)). Concernant les volailles au Vietnam, l'épizootie d'IAHP H5N1 a eu trois vagues distinctes, la première début 2004, la deuxième fin 2004 et début 2005, et la troisième fin 2005 (Figure 2). Le début des deux premières vagues précède la fête du Têt de un à un mois et demi, reflétant probablement l'augmentation de production et de mouvements de volailles avant les fêtes. La troisième vague, plus faible, est arrivée plus tôt que les précédentes vagues dans l'année, et a eu lieu presque uniquement dans le Nord.

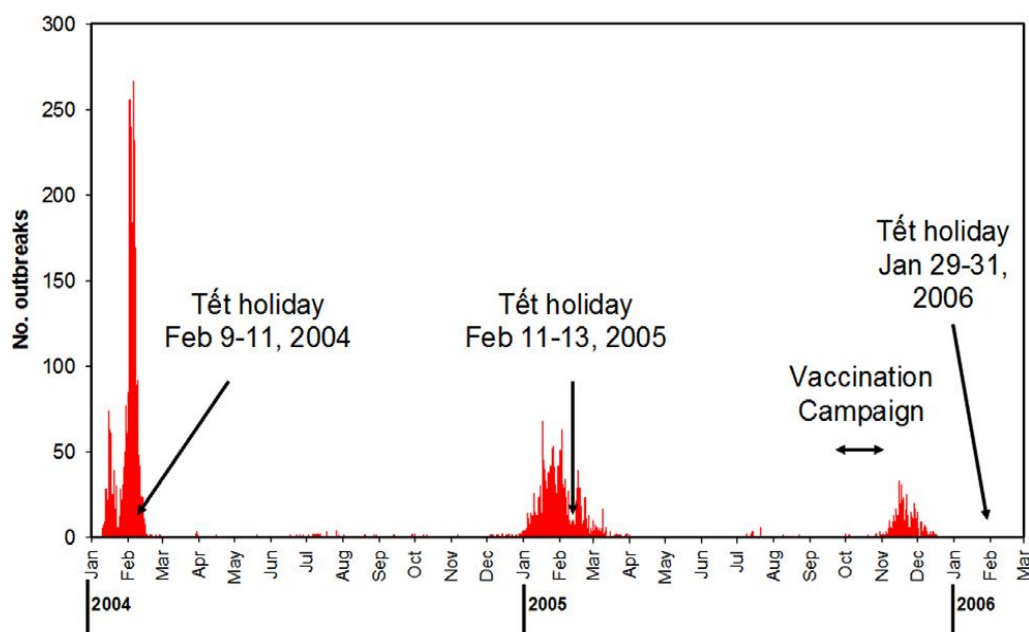


Figure 2 : Répartition temporelle des foyers d'IAHP au Vietnam de janvier 2004 à février 2006 (Pfeiffer *et al.*, 2007)

b) Cas de transmission de l'influenza A entre les porcs, les volailles, et l'Homme

Le porc a toujours été un candidat pour le rôle d'hôte intermédiaire pour le réassortiment de virus influenza A d'origine aviaire et humaine puisqu'il est le seul mammifère domestiqué qui est élevé en abondance et qui permet une réplication productive de virus influenza aviaires et humains. Ce concept est renforcé par la détection de virus humain et aviaire réassortis chez des porcs Européens avec preuve de transmission à la population humaine par la suite. Mais l'adaptation d'un virus nouvellement transmis au porc peut prendre plusieurs années ; le H3N2 humain et le H1N1 aviaire ont été détectés chez les porcs il y a plusieurs années avant qu'ils acquièrent la capacité à se répandre rapidement et à être associés aux épizooties porcines (Brown, 2000).

De nombreuses études ont mis en évidence des cas de transmission interspécifique entre les espèces humaines, porcines et aviaires, plusieurs sens de transmission sont identifiés, soient des souches aviaires ou humaines vers le porc, et des souches aviaires ou porcines vers l'Homme. Le Tableau 3 illustre des transmissions de virus influenza aviaires aux porcs.

<i>Origine</i>	<i>Référence</i>
H1N1 Wild ducks	(Pensaert <i>et al.</i> , 1981; Scholtissek <i>et al.</i> , 1983; Schultz <i>et al.</i> , 1991)
H3 Duck	(Kida <i>et al.</i> , 1988)
H1N1 Eurasian strain	(Guan <i>et al.</i> , 1996)
H9N2 Asian recent strain	(Peiris <i>et al.</i> , 2001; Cong <i>et al.</i> , 2008)
H3N2 Reassortant Human * Classical swine H1N1	(Zhou <i>et al.</i> , 1999)
H4N6 American avian sublineage	(Karasin <i>et al.</i> , 2000)
H5N1	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
H2N3 Wild birds	(Ma <i>et al.</i> , 2007)
H5N1 Duck	(Zhu <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 3 : Revue non exhaustive des cas de transmission de virus influenza aviaire aux porcs

Il est intéressant d'étudier les transmissions interspécifiques ainsi que les co-circulations de plusieurs sous-types chez le porc, afin d'avoir une idée des réassortiments qui pourraient se produire. De nombreux cas de réassortiments viraux sont répertoriés, avec par exemple les virus H1N2 chez le porc, déjà évoqué, avec les réassortants classical/« human-like » et human/« human-like ». Aussi, des virus triple-réassortants humain, aviaire, et porcine sont connus, ils circulent parmi les porcs aux Etats-Unis depuis 1999 et causent des infections humaines sporadiques. L'actualité, avec la souche Pandemic H1N1/2009, montre l'importance des recherches sur ce sujet. Il s'agit d'un virus issu d'un réassortiment génétique de quatre souches virales incluant : un segment génétique humain, des segments aviaires et porcins d'Amérique du Nord, et des segments porcins « avian-like » eurasiatiques. Il y a donc des transmissions virales entre les espèces à l'échelle planétaire (FAO, 2009; WHO, 2009 (2)).

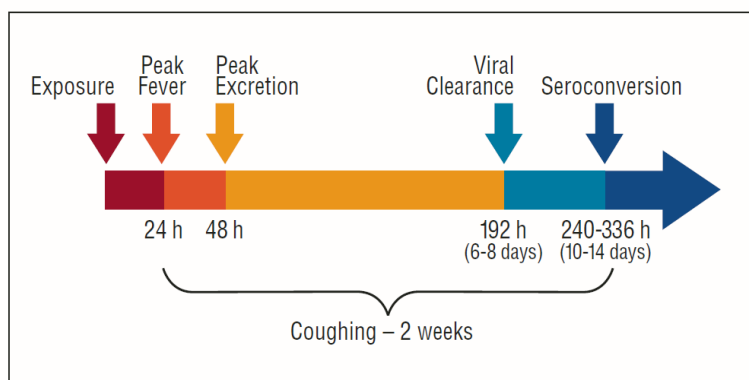
Il est important de poursuivre et de développer les activités de recherche sur l'influenza porcine et aviaire. Dans notre étude, les virus recherchés ont été ceux à hémagglutinines H1, H3, H5, H7, et H9, qui sont les plus représentés chez les porcs et/ou chez les volailles comme décrit précédemment.

I.2.3. Aspects cliniques et excrétion des virus influenza A

a) Chez les porcs

Les signes cliniques classiques lors d'épidémie d'influenza sont une fièvre élevée, un abattement, une perte d'appétit, une dyspnée, de la toux. La morbidité peut atteindre les 100%, mais la mortalité ne dépasse en général pas les 1%. Cependant, des infections subcliniques sont aussi très fréquentes (Van Reeth, 2007). Des symptômes comme des éternuements et du jetage sont aussi classiques, et la température est généralement élevée avec 40,5 °C et au-delà (Olsen et al., 1999; Swenson, 1999).

La période d'excrétion est variable selon les auteurs, de 4 à 7 jours post-infection (Kida *et al.*, 1994; Barigazzi *et al.*, 2003) ou de 3 à 5 jours post-infection, avec une forte hyperthermie corrélée à l'isolement viral (Sanchez *et al.*, 2008). Pour parvenir à un isolement viral, il est important de prendre en compte ces aspects cliniques afin d'augmenter les chances de se trouver dans la période d'excrétion virale qui est courte. Cependant prélever des porcs avec symptômes n'est pas une garantie d'isoler le virus. En effet, comme le montre la Figure 3, le pic d'excrétion se situe proche du pic de fièvre, à 2 jours post-infection, et la toux peut durer jusqu'à 2 semaines, au-delà de la fin de la période d'excrétion. Il faudrait donc intervenir très tôt dans l'apparition des signes cliniques pour avoir une excrétion la plus importante possible, et ne pas passer à côté de la période.



Timeline courtesy of Marie Gramer, DVM, PhD candidate, University of Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory.

Figure 3 : Evolution de l'infection au SIV (Novartis, 2006)

b) Chez les volailles

Les caractéristiques des infections à virus influenza A chez les volailles sont très variables en fonction de la souche virale et de l'espèce hôte. D'un point de vue clinique, l'IAHP a une mortalité très élevée du fait d'une infection systémique, contrairement à l'IAFP qui est responsable d'une infection asymptomatique ou avec peu de signes cliniques. Il est à noter cependant que de manière générale les poulets ont une importante sensibilité clinique à l'infection par un virus influenza, alors que les canards sont souvent infectés de manière inapparente (Van Reeth, 2007). Sur des animaux asymptomatiques, les virus isolés sont principalement des virus IAFP, il est très difficile d'isoler des virus IAHP en dépistage systématique, du fait du haut taux de mortalité.

Pour l'IAHP et l'IAFP, l'excrétion virale peut avoir lieu dès le premier ou le second jour après infection dans les fèces et les sécrétions respiratoires (Spickler *et al.*, 2008). La période d'excrétion virale est différente selon les souches virales et selon l'espèce. A titre d'exemple, Hulse-Post *et al.* montrent une durée d'excrétion de différentes souches de H5N1 variant de 7 à 17 jours chez les canards colverts (Hulse-Post *et al.*, 2005). Van Der Goot *et al.* mettent en évidence une durée d'excrétion trachéale et cloacale maximale de 20 jours chez des poulets sur une souche H7N7 (Van Der Goot *et al.*, 2005).

I.3. Objectifs

I.3.1. Objectifs de la thèse de C. Trévenec

Le stage s'insérant dans le projet de thèse de Carlène Trévenec, il est intéressant d'en préciser les objectifs. L'objectif global est de répondre à la question suivante : quel est le risque qu'un porc soit infecté par le virus de l'influenza aviaire au Vietnam ?

Les objectifs détaillés sont :

- d'étudier la séroprévalence en influenza A et quels sont les sous-types qui circulent,
- de déterminer si ces virus influenza A circulent à la fois chez les porcs et les volailles dans les élevages mixtes, et de déterminer quels sont les principaux facteurs de risque de co-circulation du virus dans les deux espèces,
- d'estimer le risque de transmission interspécifique porcs et volailles du virus influenza,
- de déterminer quelles peuvent être les conséquences de cette transmission, et de proposer une stratégie de contrôle et de prévention.

Pour cela, plusieurs études sont donc réalisées. Dans le cadre de mon stage et de celui de Marion Petit Sinturel, nous avons travaillé sur les deux premiers objectifs, et avons donc réalisé respectivement une enquête virologique et une enquête sérologique.

I.3.2. Objectifs de l'étude virologique

L'étude virologique a été scindée en deux parties. La première partie consistait en une étude transversale de viroprévalence, et la seconde partie en une étude virologique de surveillance basée sur un échantillon de convenance (sondage non aléatoire) réalisé à partir d'élevages rapportant des cas suspects de virus influenza porcine. L'objectif final était d'identifier les souches de virus qui circulent chez les porcs et les volailles, cela étant une première étape dans la mise en évidence d'une éventuelle circulation virale entre les espèces. Pour des raisons de logistique et de temps, dans le cadre de mon stage, les analyses de laboratoire se sont limitées au typage de l'influenza A, et sous-typage des hémagglutinines H1, H3, H5, H7, H9. En cas d'échantillons positifs, le séquençage sera réalisé par la suite, en-dehors du cadre du stage. Cependant vu la grande spécificité des sous-types pour leur hôte, le sous-typage peut parfois fournir une information sur une transmission interspécifique potentielle, par exemple si on retrouve un virus H5 chez le porc, car c'est un sous-type généralement aviaire.

L'objectif de l'étude de viroprévalence dans le cadre du stage était de faire une estimation de la viroprévalence de SIV de type A dans les élevages des zones à risque de foyer influenza H5N1, d'identifier les sous-types porcins et aviaires y circulant, et d'étudier certains facteurs de risque potentiels, notamment si les élevages mixtes porcs-volailles constituent un facteur de risque concernant l'infection par un virus influenza de type A chez les porcs.

L'étude dite de surveillance avait pour but d'augmenter les chances d'isolement de virus influenza, et devait permettre l'identification des sous-types porcins et aviaires, ainsi que l'analyse éventuelle de facteurs de risque, en prenant des précautions supplémentaires sur l'interprétation, celle-ci n'étant pas basée sur un échantillonnage aléatoire.

II. Matériel et méthode

II.1. Zone d'étude

L'observatoire GRIPAVI du CIRAD au Vietnam est basé au Nord-Vietnam, sur deux régions agro-écologiques : le delta du Fleuve Rouge et la région du Nord-Est. On peut signaler que deux autres projets internationaux aux objectifs proches sont réalisés dans le delta du Mékong. De manière générale, la zone d'étude a été choisie afin d'augmenter les chances de mise en évidence de cas de transmission interspécifique. Il est à noter que la zone d'étude de la thèse de Carlène Trévenec et celle de la thèse de Stéphanie Desvaux sur les déterminants de l'IAHP H5N1 sont les mêmes pour des raisons de facilité de gestion administrative, et surtout d'utilisation des résultats dans le cadre du projet global GRIPAVI. L'étude a lieu dans les provinces d'Ha Tay et de Bac Giang (Desvaux, 2008) (Figure 4).



Figure 4 : Carte du Nord-Vietnam : localisation des provinces de Ha Tay et Bac Giang
(Ambassade-France, 2009)

Plusieurs critères ont donc été pris en compte pour ce choix. Des contacts fréquents et rapprochés, ainsi qu'une pression infectieuse importante sont des conditions favorables à la transmission interspécifique. On s'est donc en particulier intéressé aux zones à risque de foyer d'IAHP H5N1, qui sont les seuls foyers déclarés. Mais la circulation virale de H5N1 ne nous permet pas d'extrapoler sur la circulation d'autres sous-types. Les deux provinces où le virus a circulé à plusieurs reprises lors des vagues précédentes ont donc été sélectionnées. D'autres critères ont été pris en compte : la possibilité d'étudier le risque d'introduction via la Chine, et les zones de production qui concentrent un nombre important d'élevages avicoles à cycle long, pouvant servir de réservoir au virus dans un contexte de vaccination.

Les deux provinces retenues ont donc été Ha Tay (2 communes) et Bac Giang (7 communes), les zones à risque d'IAHP H5N1 ayant été définies par enquêtes rétrospectives sur les déclarations de foyers des années précédentes dans la région du Delta du Fleuve Rouge. D'un point de vue épidémiologique, ces deux provinces sont donc intéressantes. En effet, à Ha Tay, aucun foyer de IAHP H5N1 n'a été diagnostiqué depuis 2004, mais le virus circulerait à bas bruit avec une gestion locale des suspicions cliniques. Il y aurait un fort intérêt économique à cacher les suspicions car ce sont des villages de couvoirs, qui approvisionnent tout le delta. A Bac Giang, des foyers ont été déclarés en

2005 et 2007. L'intérêt de ce choix réside aussi au niveau des filières porcines et avicoles : Ha Tay est la principale province élevant des volailles reproductrices, elle alimente en jeunes volailles une grande partie du Nord-Vietnam ; à Bac Giang la plupart des systèmes de production sont de type familial traditionnel et semi-commercial, et de plus un transport illégal de volailles provenant de Chine est probable (Desvaux, 2008).

Les deux communes de Ha Tay sont : Huang Long et Hong Thai, et les sept communes de Bac Giang sont : Chau Minh, Tan My, Yen Lu, Dong Phuc, Dong Viet, Nghia Trung, et Hoang Ninh (Annexe 3).

II.2. Choix de la période d'étude

De nombreuses études ont déjà été menées, et ont mis en évidence des périodes de l'année où le virus était plus facilement isolé. Par exemple, les taux d'isolement viral atteignent leur maximum entre la fin de l'automne et le début de l'hiver aux Etats-Unis (Olsen *et al.*, 2000). En Chine, les sous-types H1 et H3 de SIV ont été isolés à la fin de l'été et au début de l'automne, et de fin automne au début de l'hiver (Li *et al.*, 2003). A Taïwan, en 2004, deux saisons ont été identifiées : fin de l'hiver (de janvier à mars), été et début de l'automne (avril à octobre) (Li *et al.*, 2003; Shieh *et al.*, 2008).

La période d'étude a donc été choisie en fonction de ces critères épidémiologiques, mais aussi des disponibilités pour le stage. La période préalablement choisie était celle de février à mars, ce qui correspond à la fin de la saison froide au Vietnam. Cependant, plusieurs aléas de terrain ont retardé le début des prélèvements, comme notamment la négociation avec les services vétérinaires des provinces concernant la possibilité de prélever et la rémunération pour les différents services. Finalement, les sorties sur le terrain ont été réalisées du 19 mars au 05 mai.

II.3. Echantillonnage

II.3.1. Etude de viroprévalence

a) Population cible et population source

On a cherché principalement à réaliser une enquête de prévalence de l'influenza porcin inter-troupeau. Pour cela, l'unité épidémiologique choisie a été l'élevage de porcs. Un sondage aléatoire a été réalisé pour garantir la représentativité de l'échantillon. Préalablement il a fallu déterminer le nombre d'élevages à prélever, ainsi que le nombre d'animaux par élevage, pour obtenir une estimation précise de la prévalence. Pour cela, la population cible des troupeaux et intra-troupeau a été décrite. De manière générale, il s'agissait des élevages de porcs des 9 communes des provinces de Ha Tay et Bac Giang citées précédemment, durant la période de fin mars à début mai 2009. A l'échelle du troupeau, les élevages de porcs de plus de 2 mois, constitués d'au moins un porc, ont été sélectionnés, et précisément les élevages de petite et moyenne taille, dont le niveau de biosécurité est faible. Comme déjà évoqué précédemment, dans la zone 90% des élevages sont de petite taille avec 1 à 2 truies reproductrices et/ou 1 à 10 porcs à l'engrais par an, ou de taille moyenne avec de 5 à 20 truies reproductrices et/ou de 30 à 100 porcs à l'engrais par an (La Van Kinh, 2002). Au niveau intra-troupeau, les truies et les porcs à l'engrais ont été dissociés car ils sont différents d'un point de vue immunitaire. Les truies ont une immunité plus longue, et les jeunes porcs sont plus sensibles avec une période de forte prévalence entre 3 et 25 semaines (6 mois) (Sanchez *et al.*, 2008). Cependant l'étude virologique a été réalisée conjointement avec l'étude sérologique, et il a fallu harmoniser les protocoles de prélèvements sur le terrain pour des raisons pratiques de coût et de main d'œuvre. Pour les analyses sérologiques, il a été décidé que seuls les porcs de plus de 2 mois allaient être prélevés. En effet, dès 6 semaines, il y a disparition des anticorps colostraux dans le sang des jeunes porcs dont les mères n'ont pas été vaccinées, ce qui est le cas au Vietnam (Thacker and Janke, 2008), les éleveurs ne sachant pas toujours l'âge exact de leurs porcs, l'âge limite a été fixé à 2 mois.

Les volailles présentes dans les élevages de porcs sélectionnés faisaient aussi partie de l'étude, à savoir les poulets, les canards, et les canards de barbarie. Un critère de taille a été pris en compte du fait de la possibilité de réaliser des prélèvements sanguins et des écouvillons, ce critère était évalué par les vétérinaires de l'équipe de prélèvements.

La population source considérée concernait les élevages de porcs des listes fournies par les services vétérinaires des communes et/ou des provinces de Ha Tay et de Bac Giang. Ces listes ont été principalement établies à partir des vaccinations effectuées dans ces élevages. Donc on peut s'attendre à un certain écart entre le nombre d'élevages réels et le nombre d'élevages recensés par les services vétérinaires.

b) Taille d'échantillon

Les services vétérinaires des provinces de Ha Tay et Bac Giang ont donc été contactés pour fournir ces listes d'élevages, afin d'avoir une estimation du nombre d'élevages. Pour le calcul de la taille d'échantillon, plusieurs variables ont été définies :

N : le nombre d'élevages dans la zone, il a été dans un premier temps déterminé arbitrairement, puis affiné à partir des renseignements des services vétérinaires.

p : la viroprévalence inter-troupeau estimée de l'influenza A porcine. Les taux d'isolement de virus influenza sont faibles en dépistage systématique. La bibliographie (Annexe 2) ne fournit que des prévalences individuelles, avec un taux d'isolement en moyenne inférieur à 3%. Aucune donnée inter-élevage ne permet de définir avec certitude la valeur de la prévalence attendue inter-élevage. On a donc choisi une prévalence attendue faible. Afin de rester compatible avec l'enquête de séroprévalence, et pour limiter le coût, la prévalence choisie était de 5%, sachant que la viroprévalence est certainement inférieure à cette valeur. La taille d'échantillon calculée était supérieure à celle que nous aurions obtenue avec une prévalence attendue de 3%. Pour une prévalence attendue donnée, l'augmentation de la taille d'échantillon permet d'augmenter la précision de l'estimation.

α : le risque d'erreur.

n : le nombre d'élevage à prélever.

Pour le calcul sur Winepiscope[®], les valeurs utilisées sont : N=10000, valeur établie à l'aide des services vétérinaires, p=5%, et α =5%. Le nombre d'élevages minimum à prélever était de 73 pour estimer la prévalence inter-troupeau. Le nombre d'élevages retenu était de n= 75.

FreeCalc[®] a été utilisé pour calculer le nombre de porcs à prélever dans les élevages. Le logiciel calcule la taille d'échantillon pour détecter la maladie au sein d'un troupeau, il a l'avantage de prendre en compte la sensibilité et la spécificité du test de laboratoire contrairement à Winepiscope[®]. On prend donc les variables :

Nt : l'effectif des élevages de porcs, la plupart des élevages sont de petite taille dans la zone, on a donc considéré que l'effectif moyen était de l'ordre d'une dizaine de porcs.

pt : la prévalence intra-troupeau.

L'influenza porcine est une maladie très contagieuse. En élevage industriel, il convient d'utiliser une séroprévalence attendue de 20-30% chez les porcs en finition de 22-24 semaines. Mais, elle peut varier entre 10% et 80% (Jung *et al.*, 2007; Poljak *et al.*, 2008). Compte tenu des conditions d'élevage et de l'absence d'étude similaire au Vietnam, la valeur retenue pour le calcul était de 25%. En phase clinique, une étude montre que le taux d'isolement en intra-élevage est de l'ordre de 10% (Sanchez *et al.*, 2008). Or en dépistage systématique, la viroprévalence intra-élevage attendue est plus faible du fait de la fenêtre d'excrétion qui est courte. Cependant, comme expliqué ci-dessus pour la prévalence inter-troupeau, si on surestime la prévalence attendue, le nombre de porc à prélever reste adapté.

Se : la sensibilité du test, et Sp : la spécificité du test.

On a donc estimé à 10 le nombre de porcs gras entre 2 et 6 mois à prélever par élevage, ainsi que 2 truies (minimum $\pi = 25\%$, Se = 90%, Sp = 100%, Nt = 20).

Le nombre de volailles à prélever dépend du type de production. La taille d'échantillon est définie avec FreeCalc® (minimum pi = 25%, Se = 90%, Sp = 100%). On a retenu un nombre de 15 volailles à prélever par élevage.

c) Tirage au sort

Les nombres d'élevages et d'animaux à prélever ont donc été déterminés. Il a fallu ensuite sélectionner les élevages de manière aléatoire sur les 9 communes étudiées, un tirage au sort a été effectué. Les services vétérinaires des districts devaient fournir une liste détaillée des élevages dans chaque commune. Pour les deux communes de la province de Ha Tay, et pour la commune de Nghia Trung à Bac Giang, une liste complète des éleveurs a été donnée. Les autres communes n'ont pas fourni de liste détaillée, mais uniquement le nombre d'élevages de porcs par commune. Tout d'abord, une liste générale a été faite, avec le nombre d'élevages dans chaque commune. Avec le logiciel Survey Toolbox®, 75 élevages ont été tirés au sort pour savoir combien d'élevages dans chaque commune devaient être prélevés.

Ensuite, le procédé a été différent pour le tirage au sort des fermes des communes avec liste complète et pour celui dans les communes sans liste. Dans le premier cas, un tirage au sort des numéros d'élevage a été effectué sur Survey Toolbox®, et nous nous sommes reportés à la liste qui avait été préalablement numérotée.

Dans le second cas, un tirage au sort de coordonnées géographiques a été réalisé (Cameron, 1997). Pour cela, à l'aide du logiciel ArcGis 3.2®, les quatre coordonnées géographiques des extrémités de chaque commune, au nord, sud, est et ouest, ont été déterminées, inscrivant ainsi les communes dans un rectangle. A partir du logiciel Survey Toolbox®, en utilisant ces coordonnées spatiales, des points GPS (Global Positioning System) ont été tirés au sort dans chaque commune, le nombre de points GPS par commune ayant été déterminé préalablement. Dans les cas où les points GPS se situaient en dehors de la commune, dans le rectangle de sélection, un nouveau tirage au sort a été effectué. Sur le terrain, ont donc été utilisés un GPS et une carte de la commune avec les points pour avoir une idée générale de leur localisation. Les élevages les plus proches des points tirés au sort ont été enquêtés.

Dans les deux cas, avec et sans liste complète, certains élevages tirés au sort n'ont pu être conservés dans l'échantillon pour plusieurs raisons : refus de l'éleveur, absence de porcs, l'éleveur ayant tout vendu récemment, etc. Il a donc été choisi de prendre l'élevage le plus proche de celui d'origine, cette méthode conservant le caractère aléatoire de l'échantillonnage.

II.3.2. Etude basée sur la surveillance des maladies respiratoires porcines

a) Zone d'étude ciblée et population

Concernant cette étude, la zone d'étude a été plus restreinte, il n'y a pas eu de tirage au sort des élevages puisqu'ils ont été choisis en fonction de la définition de cas qui sera expliquée par la suite. Les communes de Bac Giang ont été sélectionnées, car il s'agissait de la zone avec le plus d'élevages. Par la suite, la méthode mise en place pour obtenir des déclarations et l'application sur le terrain sera expliquée.

La population cible concernait les mêmes élevages à Bac Giang que dans l'étude de viroprévalence. Concrètement des élevages constitués d'au moins un porc (porcelet, porc en croissance ou porc à l'engrais) ont été enquêtés, et dans lesquels des porcs présentaient des symptômes grippaux (voir la définition de cas). Concernant les volailles des élevages de porcs sélectionnés, nous avons travaillé sur les mêmes bases que pour l'étude de viroprévalence, à savoir les poulets, canards, et canards de barbarie.

b) Définition de cas

Etablir une définition de cas implique de réfléchir aux conséquences des choix effectués. En effet, si elle est trop restrictive il peut y avoir un nombre insuffisant de déclarations, et au contraire si elle ne l'est pas assez, on peut s'attendre à avoir des sur-déclarations. L'étude s'est déroulée sur une courte période, de fin mars à début mai, et ont été menés en parallèle les prélèvements de l'étude de viroprévalence, la mise en place de la surveillance avec prise de contact avec les vétérinaires locaux et les éleveurs, et les prélèvements de cette étude. Pour cela, un problème de sous-déclaration était possible, et donc il a été nécessaire d'établir une définition de cas large pour avoir un maximum de déclarations. Plusieurs points ont été définis :

- Type d'élevage : élevages de petite à moyenne taille (comme défini précédemment pour l'étude de viroprévalence).
- Signes cliniques : le critère d'alerte se base sur un syndrome respiratoire associé à un fort abattement et une hyperthermie (voir I.2.3. Aspects cliniques).
- Age : les truies sont en général immunisées et manifestent peu de signes cliniques. On s'est donc intéressé aux porcelets, porcs en croissance, et porcs à l'engrais (jusqu'à 6 mois) (Sanchez *et al.*, 2008).

La définition de cas retenue a donc été la suivante : les élevages de petite ou moyenne taille, avec un syndrome respiratoire chez plusieurs porcs de moins de 6 mois, soit de la toux et/ou une dyspnée et/ou du jetage, associé à un fort abattement et/ou une forte hyperthermie. Cette définition était à adapter selon les résultats sur le terrain.

c) Déclaration des cas

Il a fallu réfléchir au meilleur moyen d'informer les acteurs de terrain et de les inciter à déclarer des cas suspects d'influenza. Il a fallu cibler quels acteurs informer, par quel moyen, et déterminer quelle offre pouvait être faite en échange de déclarations.

Les acteurs ciblés ont été les vétérinaires de commune et les éleveurs eux-mêmes. En effet, les vétérinaires de commune ont été identifiés comme les mieux placés. Tout d'abord, ils sont en contact direct avec les éleveurs, contrairement aux vétérinaires de province ou de district, et ce sont eux qui sont appelés par les éleveurs en cas de maladie et qui interviennent. Ensuite, dans les 7 communes à Bac Giang, nous avons travaillé directement avec 7 vétérinaires de commune, un nombre raisonnable. Enfin, lors des enquêtes de prévalence, nous avons été amenés à travailler aussi avec eux, ils nous accompagnaient dans les fermes pour nous présenter, et nous aidaient à réaliser les prélèvements. Ils pouvaient donc faire le lien entre les éleveurs et nous-mêmes pour la déclaration de cas. L'information devait aussi être diffusée directement au plus grand nombre d'éleveurs.

La méthode choisie a été de distribuer des fiches d'information, deux fiches ont été faites, une adaptée aux vétérinaires, et une aux éleveurs (Annexes 4 et 5). Ces fiches étant traduites en vietnamien, elles devaient être simples et concises. Sur ces fiches se trouvaient : un titre, une explication de la définition de cas, l'offre faite en échange d'une déclaration, l'explication de ce qui allait être effectué dans l'élevage, le numéro à joindre, et une brève explication du contexte dans lequel se plaçait l'étude.

L'offre à faire aux éleveurs pour les inciter à déclarer les cas a longuement été réfléchi. Plusieurs idées ont été évoquées, à savoir leur offrir une rémunération pour un appel avec confirmation des symptômes lors de la visite ou leur offrir d'effectuer le diagnostic de la maladie respiratoire. Sur des enquêtes effectuées précédemment par le CIRAD au Vietnam, il est apparu que les éleveurs étaient intéressés par les résultats des analyses concernant la grippe porcine. Donc après discussion avec nos collègues vietnamiens, il a semblé intéressant de proposer un diagnostic de la maladie respiratoire aux éleveurs, en réalisant des analyses sérologiques sur les principaux agents des maladies respiratoires porcines : *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hypopneumoniae*, *Streptococcus suis*, et PRRsV (Porcine Reproductive and Respiratory syndrome Virus). Le choix de ces analyses concernant la méthode employée a été fait après discussion avec des vétérinaires cliniciens français, les scientifiques

du National Institute of Veterinary Research (NIVR) et de la faculté vétérinaire de Hanoï. Ces analyses représentaient un coût supplémentaire, mais avaient un intérêt particulier pour les éleveurs et d'un point de vue scientifique. Une adaptation au cas par cas a été cependant envisagée, à savoir rémunérer les éleveurs lorsqu'ils n'étaient pas intéressés par un diagnostic.

d) Taille de l'échantillon

Le nombre de fermes prélevées allait être fonction du nombre de cas déclarés. Afin d'avoir toutes les chances de détecter du virus, pour l'échantillonnage intra-élevage des porcs et des volailles, il a été décidé de prélever tous les porcs de l'élevage, et 15 volailles.

II.4. Elaboration du questionnaire

Différents types d'informations devaient être collectées en vue d'une analyse des facteurs de risque qui sera réalisée dans sa globalité pour la thèse de Carlène Trévenec. La circulation virale dans un élevage peut avoir plusieurs origines, il a fallu identifier les pratiques d'élevage à risque correspondantes, pour obtenir plusieurs renseignements concernant :

- l'introduction directe du virus par les animaux infectés: les achats de porcs et de volailles, les emprunts d'un verrat pour la reproduction etc.
- l'introduction du virus par voie indirecte : le niveau de biosécurité des élevages comme l'échange et la désinfection de matériel, la circulation de personnes (collecteurs...), les pratiques d'élevages etc.
- la résurgence de la maladie : l'historique sanitaire des élevages, la fréquence des nettoyages et désinfections etc.

En résumé, ce questionnaire (Annexe 6) avait pour but de renseigner sur la structure de l'exploitation, les types de productions porcine et avicole de l'élevage, les mouvements d'animaux, les bâtiments, l'alimentation, les maladies, l'hygiène, afin d'avoir des informations sur la biosécurité. Pour avoir des informations précises et exactes, il comportait beaucoup de questions fermées, il a été réalisé par un interprète scientifique, et a été testé sur le terrain. Une analyse d'un ou deux facteurs de risque était envisagée selon les résultats des analyses virologiques, comme le facteur absence/présence de volailles dans l'élevage.

II.5. Prélèvements et collecte d'informations sur le terrain

II.5.1. Etude de viroprévalence

Lors des sorties de terrain, la collecte d'informations à l'aide du questionnaire, et les prélèvements ont été effectués. Le questionnaire a été réalisé par M Nguyen Cong Oanh et Mme Ho Thu Huong (NIVR). Les prélèvements ont été réalisés par les services vétérinaires, quatre vétérinaires étaient présents, pour les porcs, ils travaillaient par deux, une personne tenant le porc à l'aide du lasso, et l'autre effectuant les prélèvements, pour les volailles ils travaillaient seuls, assurant la contention et les prélèvements.

Des prises de sang ont été réalisées pour l'étude de séroprévalence (Marion Petit Sinturel), et des écouvillons pour l'étude de viroprévalence.

Des écouvillons nasaux ont été effectués chez les porcs et les truies, et des écouvillons cloacaux sur les volailles. L'utilisation d'écouvillons cloacaux est fréquente (Munster *et al.*, 2007), et c'est la méthode la plus adaptée chez les canards sauvages pour la détection des virus IAFP (Ellström *et al.*, 2008) en vue de réaliser une Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RRT-PCR), méthode d'analyse qui sera décrite par la suite.

La technique de « pool » a été utilisée pour les porcs et les volailles, c'est-à-dire que plusieurs écouvillons ont été regroupés dans un même tube avec milieu de transport, afin de diminuer le coût du prélèvement et les coûts d'analyse. Les écouvillons des truies n'ont pas été mis en pool car seulement une ou deux truies par élevage ont été prélevées. Uniquement les écouvillons d'un même élevage et d'une même espèce ont été mis en pool. La technique du pool sur le terrain est une pratique souvent utilisée, mais chez les porcs aucune étude ne prouve qu'elle est adaptée, elle pourrait réduire le niveau de détection des virus. Concernant les volailles, la technique de pool est reconnue comme étant fiable (Munster *et al.*, 2007). Par précaution, chez les porcs, un double écouvillonnage nasal a été effectué, 1 écouvillon était mis en pool de 5, l'autre était conservé individuellement. Les analyses allaient porter sur les pools, mais en cas de résultats négatifs, les écouvillons individuels pouvaient être analysés.

Lors de la réalisation des prélèvements, un écouvillon a été utilisé dans chaque orifice nasal en essayant d'éviter au maximum la souillure par la nourriture, les déjections, le sang. Puis les écouvillons ont été placés dans des tubes avec milieu de transport PBS (Phosphate Buffered Saline) et antibiotiques (Annexe 7). Le milieu était préparé au plus tard 48h avant, et conservé au laboratoire au réfrigérateur (4°C). Lors des sorties sur le terrain les tubes et écouvillons réalisés étaient conservés dans une glacière. Il est recommandé de conserver les écouvillons et le milieu de transport à une température maximale de 4°C lors des sorties. Dans les 12h, les tubes avec les écouvillons ont été placés dans un congélateur à -20°C au laboratoire.

Pour assurer la traçabilité des prélèvements, ceux-ci étaient identifiés par un code spécifique pour chaque animal prélevé ; ce code, par exemple « 1-2-P-5 », renseignait sur la commune « 1 », l'élevage « 2 », l'espèce ou la catégorie de l'animal prélevé « P » (porcelet, porc à l'engrais, truie, poulet, canard, canard de barbarie), et le numéro de l'animal « 5 ».

II.5.2. Etude basée sur la surveillance des maladies respiratoires porcines

Pour tous les élevages de la surveillance et de l'enquête de viroprévalence avec symptômes correspondant à la définition de cas, le protocole était le suivant.

Concernant les écouvillons sur porcs, truies, et volailles, la même méthode que pour l'étude de viroprévalence a été appliquée. Des prises de sang ont aussi été réalisées sur les mêmes animaux, porcs et volailles, dans les fermes ne rentrant pas dans l'étude de séroprévalence, pour effectuer le diagnostic des autres agents pathogènes déjà énoncés. Ces prélèvements sanguins devaient permettre aussi d'avoir des renseignements sur la circulation d'influenza de type A, des différents sous types dans les élevages, et peut-être d'en retirer des informations sur les délais de séroconversion.

Les porcs de moins de 2 mois n'ont pas subi de prélèvements sanguins à cause de la présence des anticorps maternels. Les porcs ont été prélevés à la veine jugulaire, et les volailles au niveau de la veine alaire. Un écouvillon nasal supplémentaire sur les porcs, truies et porcelets prélevés a été réalisé dans le but d'effectuer un test rapide, le test Flu Detect Synbiotics® qui est un kit de détection rapide d'antigène pour l'influenza de type A. Le principe de ce test sera détaillé dans la partie sur le diagnostic.

Comme déjà vu, l'excrétion virale semble corrélée avec une hyperthermie importante. La température de chaque porc prélevé a donc été prise, ce critère rentrant en compte dans le diagnostic clinique de la maladie, on a considéré qu'il y avait hyperthermie au-delà de 40°C. Il allait aussi être intéressant de mettre en relation les résultats des tests Flu Detect Synbiotics® avec la présence d'une hyperthermie.

Concernant le questionnaire, une partie était ajoutée dans le cas d'élevages avec symptômes. Il s'agissait de l'anamnèse et des commémoratifs, permettant de connaître la catégorie d'âge concernée, le nombre de malades et de morts, les symptômes observés etc. Ces informations ont été renseignées par dires d'éleveur et par observations lors des prélèvements.

La conservation des écouvillons a été identique à celle dans l'enquête de prévalence. Sur le terrain, la conservation des échantillons sanguins a été la même que pour les écouvillons ; au

laboratoire, ils ont été conservés au réfrigérateur (4°C), et dans les 7 jours ils ont été centrifugés, avec remise des sérums à 4°C. Concernant le codage, il a été le même qu'expliqué précédemment.

II.6. Diagnostic et analyses en laboratoire

II.6.1. Diagnostic clinique dans les fermes avec symptômes respiratoires

Aucun examen clinique approfondi des porcs sur le terrain n'a été réalisé. Mais pour effectuer un diagnostic clinique, les commémoratifs recueillis auprès des éleveurs ont été utilisés, ainsi que l'observation des porcs pour voir s'ils présentaient des symptômes de toux, jetage, dyspnée, abattement, ou autres, et s'ils avaient une hyperthermie avec la prise de la température. La confirmation d'une suspicion clinique nécessite toujours un examen en laboratoire.

II.6.2. Diagnostic avec le test Flu Detect Synbiotics® dans les fermes avec symptômes

Sur le terrain, on a utilisé le test Flu Detect Synbiotics® sur les porcs, porcelets, et truies. Ce kit est un test d'immunomigration rapide de détection qualitative du virus de l'influenza type A dans des échantillons trachéaux ou cloacaux d'oiseaux symptomatiques. Il détecte les 16 sous types de virus influenza type A. Ce test n'est pas validé chez les porcs, mais l'antigène détecté est commun à tous les virus influenza de type A, d'où la possibilité d'utiliser ce test aussi dans cette espèce. Son utilisation repose sur une collaboration avec Synbiotics®. Une étude a montré l'excellente sensibilité de ce test sur les porcs (Sanchez *et al.*, 2008).

Le test utilise deux anticorps spécifiques des virus influenza type A. Un anticorps anti-influenza A lié à un antigène influenza A présent dans l'échantillon forme un complexe qui migre le long du test et est capturé sur une ligne de réaction sensibilisée par le second anticorps. L'accumulation du complexe provoque la formation d'une bande rose nettement visible. La présence d'une bande de contrôle, localisée au-dessous de la ligne de réaction, permet d'assurer que le test a été réalisé correctement.

II.6.3. Diagnostic de laboratoire

a) NIVR et essai inter laboratoire

Dans le cadre du projet GRIPAVI du CIRAD, une visite au NIVR a été effectuée dans le but d'évaluer l'organisation du laboratoire, la traçabilité et leur compétence dans le domaine du diagnostic moléculaire des virus influenza aviaires. Les protocoles d'extraction d'ARN et de RRT-PCR étant les mêmes pour les volailles et les porcs, les résultats de cette évaluation sont intéressants concernant nos analyses chez les volailles mais aussi chez les porcs. Le protocole utilisé a été vérifié. L'impression générale a été que l'équipe de virologie est bien formée sur les différentes procédures de diagnostic et est bien renseignée sur les limites et inconvénients de ces procédures. La traçabilité dans le laboratoire semble satisfaisante. De manière générale, les résultats du test de compétence inter laboratoire montrent que le NIVR est un bon partenaire dans le cadre du projet (Albina, 2008).

b) Extraction d'ARN et RRT-PCR sur les écouvillons de porcs et de volailles

Au laboratoire les tubes avec écouvillons ont été conservés à une température de -20°C en attendant le début des analyses. Le milieu de transport de chaque prélèvement a été ensuite transféré dans des tubes Eppendorf® qui ont alors été conservés à -80°C. Le NIVR a utilisé son propre système de codage des échantillons. Par souci de traçabilité, le nouveau et l'ancien codes ont été notés sur les tubes Eppendorf®. Pour les analyses qui ont suivi le nouveau code a été utilisé.

Les analyses ont débuté par l'extraction de l'ARN viral des échantillons, les virus influenza étant des virus à ARN segmenté. Il s'agit d'une technique de purification des échantillons biologiques pour l'isolement de l'ARN, en vue de son utilisation pour la rétro transcription et la réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). Pour cela, le kit utilisé a été le Qiagen RNeasy Mini Kit® (Annexe 8).

Le NIVR utilise la RT-PCR en temps réel (RRT-PCR) pour le gène de la matrice M. Elle permet une détection spécifique et sensible des virus influenza A, mais le laboratoire n'a pas été en mesure de nous fournir la sensibilité et la spécificité de ses analyses. Le kit utilisé est le Qiagen One-step RT-PCR Kit®. La PCR est une méthode *in vitro* qui permet une amplification spécifique et exponentielle d'une courte séquence d'ADN, permettant donc de détecter de très faibles quantités d'ADN. Les virus influenza étant des virus à ARN segmenté, avant la réalisation de la PCR proprement dite, il faut faire une rétro transcription afin de convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). La RRT-PCR est basée sur la mesure en continu de son produit, on peut suivre la cinétique complète de la PCR. L'intérêt principal de cette méthode par rapport à une RT-PCR conventionnelle est qu'elle permet une quantification absolue de la quantité initiale de l'ARN cible. Concrètement il s'agit de réactions enzymatiques, on a réalisé une RT-PCR en une étape, on a donc mélangé les réactifs de RT et de PCR dans le même tube. L'échantillon obtenu après extraction d'ARN est donc mis en contact avec les enzymes de type transcriptase inverse pour la réaction de rétro transcription. On utilise pour la PCR des amorces spécifiques pour l'initiation de la réaction enzymatique, ce sont des oligonucléotides de synthèse complémentaires aux brins d'ADNc. Elles vont donc s'y fixer, et grâce à la Taq ADN polymérase il y aura synthèse de nouveaux brins d'ADN. L'activité enzymatique et l'hybridation/déshybridation sont contrôlées grâce à des transitions de température qui sont répétées de manière cyclique afin de permettre les réactions en chaîne. Grâce à l'analyseur de RRT-PCR Biorad IQ 25, la quantité d'ADN total est donc mesurée à chaque cycle d'amplification grâce à un marqueur fluorescent. La quantification se fait en passant par une valeur mathématique en nombre de cycle (Ct). Au final, une courbe de la réaction est obtenue, permettant de déterminer la quantité d'ADN initiale, et donc la quantité d'ARN initiale (Hunt, 2006).

Tous les pools de porcs et de volailles ont ainsi été analysés par RRT-PCR. Seuls les pools positifs devaient être utilisés pour l'isolement viral afin d'identifier par test d'inhibition de l'hémagglutination les sous-types d'influenza A présents.

c) Culture et isolement viral par inoculation sur œufs embryonnés

Les virus influenza infectent des cellules eucaryotes, ils peuvent être cultivés sur culture cellulaire ou sur œufs embryonnés, afin de permettre l'isolement viral. Au NIVR, la technique utilisée est l'isolement et la culture virale par inoculation sur œufs embryonnés. Une partie du milieu de transport ayant contenu les écouvillons est inoculée dans la cavité allantoïdienne d'œufs embryonnés (de 9 à 11 jours d'âge) de volailles. Les œufs sont incubés à 35-37°C pendant 4 à 7 jours (volailles), 3 à 4 jours (porcs). Ensuite il y a collecte des liquides amniotiques et allantoïdiens, après centrifugation, on récupère le surnageant pour l'analyser (OIE, 2005).

d) Sous-typage par inhibition d'hémagglutination

Pour le sous-typage du virus, le test d'inhibition de l'hémagglutination est utilisé, il permet de détecter la quantité d'antigènes spécifiques. Le laboratoire doit avoir des antisérums monospécifiques pour chaque antigène des hémagglutinines recherchées. Dans notre cas, la recherche devait concerner les hémagglutinines H1, H3, H5, H7, H9. Lors du test, une quantité donnée d'anticorps pour les antigènes recherchés est mélangée avec une quantité donnée d'hématies couvertes avec l'antigène. On ajoute ensuite l'échantillon à tester à des dilutions différentes. Si l'échantillon contient l'antigène recherché, cet antigène soluble va être en compétition avec les antigènes sur les hématies vis-à-vis des anticorps, dans ce cas l'hémagglutination sera inhibée. Les virus détectés devaient être séquencés.

e) Analyse sérologique pour les fermes avec symptômes

Les prélèvements sanguins effectués dans les fermes avec symptômes tels que définis dans la définition de cas ont été analysés par sérologie. La recherche d'anticorps influenza A s'est faite grâce à un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Le kit utilisé était le test ELISA FluAc A Idvet®. La sensibilité du test est de 90%, et la spécificité de 100%. Dans les puits des plaques ELISA se trouve l'antigène A des virus influenza. On a testé le sérum de chaque échantillon de sang collecté. Si des anticorps pour les antigènes A sont présents dans le sérum, un complexe anticorps-antigène se forme, masquant l'antigène A. Un conjugué d'anti-antigène A peroxydase est ajouté dans les puits. Il fixe les antigènes A libres, formant un complexe antigène-conjugué-peroxydase. Au final, la coloration résultante, après lavage et ajout d'une solution fournie, dépend de la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon de sérum testé. La densité optique est mesurée pour avoir le résultat final.

II.7. Résultats attendus

Les résultats attendus des différentes analyses en laboratoire étaient :

- La viroprévalence inter et intra élevages de l'influenza A porcin dans les communes de l'étude.
- L'isolement et la caractérisation des sous-types d'influenza A porcin et aviaire.

Une analyse de facteurs de risque avec ces résultats de laboratoire et le traitement des questionnaires devaient être réalisés. Si les résultats de laboratoire le permettaient, le facteur de risque principalement étudié dans le cadre de ce stage allait être l'effet présence ou absence de volailles dans les élevages de porcs sur la prévalence de l'influenza A porcin.

III. Résultats

III.1. Nombre de fermes et de prélèvements

Nous avons prélevé 76 fermes pour l'enquête de prévalence, dont 67 avec volailles, et 17 fermes pour l'enquête avec définition de cas, dite de surveillance, dont 13 avec volailles, soit un total de 93 élevages de porcs, dont 80 avec des volailles. Le nombre de prélèvements pour la virologie est détaillé dans le Tableau 4, ce qui fait un total de 604 porcs et truies (voir I-Truies et I-Porcs) et 475 volailles (126 pools). Le nombre de prises de sang réalisées est détaillé dans le Tableau 5.

Dans les élevages avec symptômes, au nombre de 28 (17 fermes issues de la surveillance, et 11 de l'enquête de prévalence), nous avons dû revoir le fait de prélever tous les porcs de l'élevage malade, car les éleveurs ont souvent été réticents aux prélèvements lorsque leurs porcs étaient malades. Les valeurs calculées pour l'étude de viroprévalence ont finalement été gardées, à savoir 10 porcs, 2 truies, et 15 volailles par élevage. Il est à noter que dans ces élevages, des écouvillons sur porcelets ont pu être réalisés, de la même façon que pour les écouvillons nasaux sur porcs, à savoir un écouvillon individuel et un en pool de 5.

De manière générale, nous n'avons pas été autorisés à prélever les truies en gestation, ce qui a limité fortement le nombre de truies prélevées.

Nous avons analysé au NIVR les pools porcs et volailles, et les écouvillons individuels des truies concernant l'enquête de prévalence et l'enquête de surveillance (Tableau 4). Les écouvillons individuels de porcs ont été conservés pour des analyses PCR ultérieures dans un laboratoire différent à définir.

Les prises de sang ont toutes été analysées par ELISA A au NIVR. Dans le cadre de la surveillance, aucun éleveur n'a souhaité faire des analyses sur les autres maladies respiratoires comme nous le proposons, ils ont préféré être rémunérés pour leur participation. Les résultats sérologiques de l'enquête de séroprévalence sont traités dans le cadre du stage de Marion Petit Sinturel.

P = pool I = individuel	Nombre de prélèvements - Enquête prévalence	Nombre de Prélèvements - Surveillance	Totaux	Nombre de PCR réalisées	Nombre de Flu Detect
P- Porcs	118	28	146	146	0
I- Truies	11	2	13	13	13
P- Poulets	88	19	107	107	0
P- Canards	11	0	11	11	0
P- Canards de Barbarie	8	0	8	8	0
I- Porcs	473	118	591	0	220
Totaux	709	167	876	285	233

Tableau 4 : Nombre d'écouvillons réalisés et analysés

	Nombre de prises de sang Enquête de prévalence	Nombre de prises de sang Surveillance	Totaux
Porcs	502	107	609
Volailles	409	70	479

Tableau 5 : Nombre de prises de sang réalisées, analysées en ELISA A

III.2. Résultats des analyses de laboratoire

III.2.1. Résultats des tests rapides sur le terrain pour l'étude de surveillance

Les tests Flu Detect® ont donc été réalisés sur les animaux de race porcine prélevés dans les élevages avec symptômes. Aucun test ne s'est révélé positif. Deux hypothèses sont donc possibles, à savoir qu'aucun porc n'était atteint d'influenza porcine de type A lors des visites ou que dans le cadre de notre étude les tests ne sont pas fiables. On tentera d'apporter une explication dans la partie discussion. Les résultats RRT-PCR des pools correspondant sont également négatifs.

III.2.2. Résultats des RRT-PCR

Tous les échantillons en pool testés ont été négatifs. Les résultats négatifs types donnés par l'analyseur sont comme sur la Figure 5. Chaque courbe représente un échantillon. En abscisse, on trouve le nombre de cycles de PCR, et en ordonnées la mesure de fluorescence qui est fonction de la quantité d'ADN. La droite parallèle à l'axe des abscisses correspond au seuil de détection. La courbe qui traverse ce seuil est le contrôle positif. La valeur en X de l'intersection de cette courbe et du seuil de détection est généralement nommée en Ct (Cycle Threshold pour cycle du seuil), il s'agit du nombre de cycles effectués au moment du dépassement du seuil de détection. Les Ct sont des valeurs inversement proportionnelles à la quantité d'ADN initial, l'incertitude sur la mesure est minimisée au maximum (5%). Ici on voit donc que tous les échantillons sont négatifs car toutes les courbes restent en dessous du seuil de positivité.

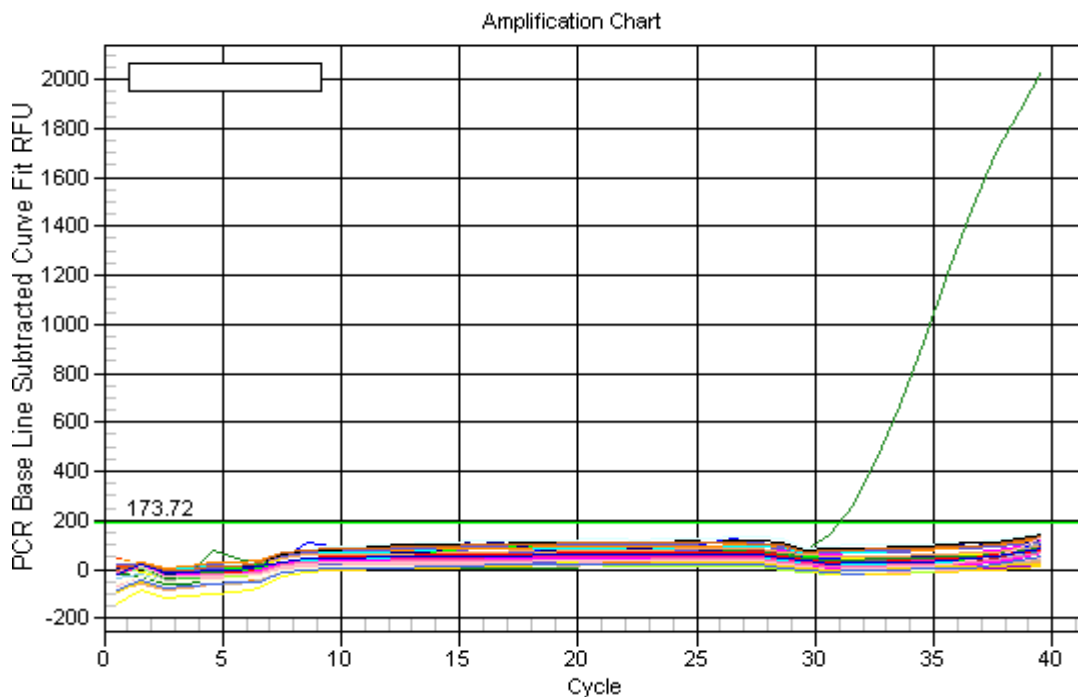


Figure 5 : Résultats RRT-PCR négatifs

III.2.3. Résultats sérologiques pour les fermes avec symptômes

Dans les 28 fermes avec symptômes chez les porcs, seules 18 ont des volailles. Les résultats ELISA A pour les porcs et les volailles de ces 28 élevages sont résumés dans le Tableau 6. Tous les résultats pour ces élevages sont positifs ou négatifs, il n'y a pas de douteux. On a une séroprévalence de 18% pour les porcs, et de 50% chez les volailles. Il est à noter que dans 5 de ces 9 élevages, les volailles ont été vaccinées contre le virus H5N1, dont 3 en janvier 2009, un en octobre 2008, et un en

janvier 2008. Mais la positivité à l'ELISA ne nous donne pas de renseignement sur le sous-type viral ayant circulé. Il faudrait faire des analyses supplémentaires, et dans le cas de tests positifs en H5, il faudrait se pencher sur la durée de l'immunité vaccinale. Donc à ce stade on ne peut rien conclure concernant les volailles vaccinées et la relation avec la séropositivité. Dans les fermes sans symptôme chez les porcs, la séroprévalence pour les porcs est de 17%, et pour les volailles elle est de 39%.

Nombre d'élevages	ELISA A Elevages Porc	ELISA A Elevages Volaille
2	Positifs	Positifs
3	Positifs	2 Elevages Négatifs 1 Elevage sans volaille
7	Négatifs	Positifs
16	Négatifs	7 Elevages Négatifs 9 Elevages sans volaille
Total élevages : 28	Positifs porc : 5 Négatifs : 23	Positifs volaille : 9 Négatifs : 9

Tableau 6 : Résultats ELISA A pour les élevages avec symptômes

III.3. Analyse statistique concernant la viroprévalence

Une analyse des facteurs de risque ne peut pas être menée à cause des résultats négatifs à l'analyse virologique. On peut estimer une viroprévalence maximale concernant l'étude de viroprévalence, avec un degré de confiance de 95%, étant donné que l'échantillon de 76 élevages ne présente que des résultats négatifs virologiquement. Le calcul s'effectue sur WinEpiscope®. Avec l'échantillon disponible, il est peu probable de pouvoir détecter une prévalence inférieure à 4% (Figure 6).

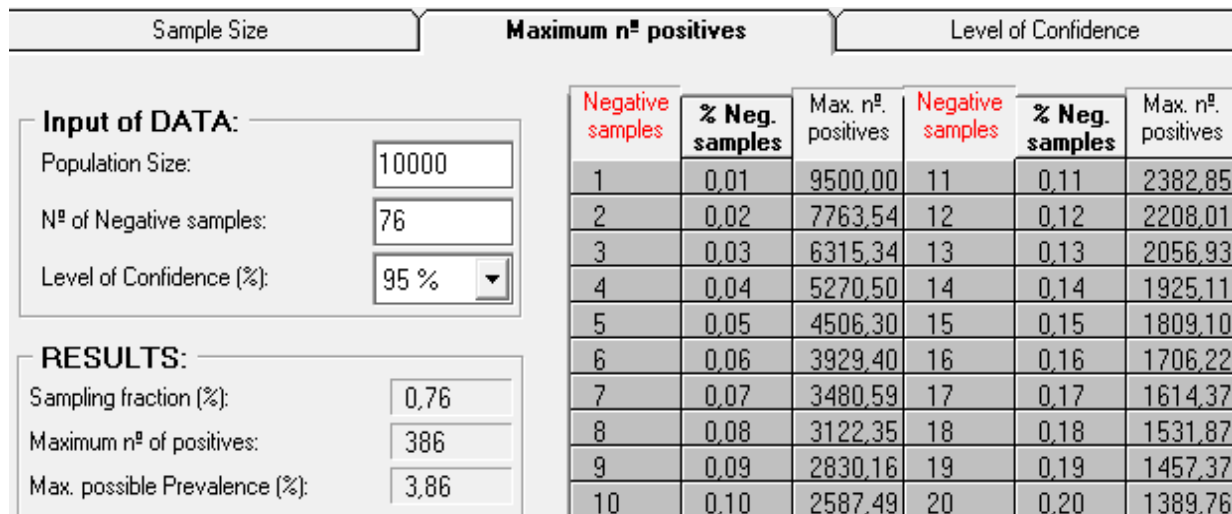


Figure 6 : Estimation de la viroprévalence maximale

On peut aussi effectuer le calcul pour les 28 fermes avec symptômes par rapport à la population totale avec le même degré de confiance. La viroprévalence maximale pour les élevages avec un syndrome grippal n'est que de 10%, d'où la nécessité de tester les autres agents pathogènes qui peuvent être responsables de ces symptômes.

On peut observer à partir du calcul effectué sur WinEpiscope® (Figure 7) que pour des prévalences inférieures à 4%, le degré de confiance devient inférieur à 95%. Pour de telles prévalences, la probabilité de diagnostiquer au moins un animal positif est inférieure à 95%. Cela peut donner un élément de réponse au fait que nous n'ayons eu que des résultats négatifs dans notre étude, la

probabilité de détection d'au moins un cas est faible pour des viroprévalences inférieures à 4%, cependant WinEpiscope® fournit des chiffres très théoriques.

Sample Size		Maximum n° positives			Level of Confidence		
Input of DATA:							
Population Size:	10000	% Prevale	N° Diseased	Confiden Level	% Prevale	N° Diseased	Confiden Level
Sample Size (to be) used:	76	1	100,00	53,55	11	1100,00	100,00
Prevalence (estimated) (%):	3,86	2	200,00	78,59	12	1200,00	100,00
RESULTS:							
Level of Confidence (%):	95,04	3	300,00	90,21	13	1300,00	100,00
If you take 76 samples out of a population of 10000 animals and the estimated prevalence is 3,86%, then the probability of diagnosing at least one animal as (truly) positive is 95,04%.		4	400,00	95,56	14	1400,00	100,00
		5	500,00	98,00	15	1500,00	100,00
		6	600,00	99,11	16	1600,00	100,00
		7	700,00	99,61	17	1700,00	100,00
		8	800,00	99,83	18	1800,00	100,00
		9	900,00	99,92	19	1900,00	100,00
		10	1000,00	99,97	20	2000,00	100,00

Figure 7 : Calcul du degré de confiance en fonction de la prévalence

III.4. Epidémiologie des syndromes grippaux

A partir des questionnaires effectués dans l'ensemble des élevages et des commémoratifs renseignés dans les fermes avec symptômes, il est possible d'exposer les résultats concernant les syndromes grippaux. On pourra voir aussi si les élevages enquêtés dans le cadre de la surveillance correspondaient bien à la définition de cas énoncée.

III.4.1. Place et gestion des maladies respiratoires dans les élevages enquêtés

Parmi les 93 élevages enquêtés, 54 ont déclaré avoir eu des porcs atteints d'une ou de deux maladies contagieuses avec symptômes respiratoires dans l'année, la mycoplasmosse a été citée 33 fois, contre 19 fois pour le PRRsV, et 8 fois pour la pasteurellose. Cependant le diagnostic a été effectué par l'éleveur dans 9 élevages, et par les services vétérinaires cliniquement dans 45 élevages, aucune confirmation par analyse en laboratoire n'a été effectuée pour ces fermes (Annexe 9). De manière générale, 73% des éleveurs disent faire appel au vétérinaire lors de maladie, 14% font le diagnostic eux-mêmes, 13% des éleveurs n'ont pas répondu à cette question.

Les éleveurs ont donné le pourcentage de morbidité et de létalité dans l'année dans leur troupeau de porcs (Annexe 10). La morbidité est inférieure ou égale à 20% dans la moitié des élevages avec symptômes respiratoires dans l'année, et 27% des élevages atteints ont une morbidité de 100%. Il y a eu de la mortalité dans 7 élevages atteints, dont 3 avec 100% de létalité.

La période de l'année citée comme étant propice aux maladies respiratoires chez les porcs débute en novembre ou décembre et se termine en avril, avec un pic en février (Annexe 11). La période de notre étude était donc située en fin de saison propice à ces maladies.

Concernant la vaccination, 62 élevages vaccinent contre la pasteurellose, aucun contre le SIV, le PRRsV ou la mycoplasmosse (Annexe 12). Les vaccins sont en général pratiqués chez les jeunes porcs, on ne possède pas d'information plus précise. On remarque que 44 élevages ayant vacciné contre la pasteurellose ont présenté des symptômes dans l'année ou lors de la visite, contre 18 élevages vaccinés qui n'ont pas eu de maladies respiratoires. On peut donc supposer que les éleveurs ayant des maladies respiratoires ont recours plus systématiquement à la vaccination. Cependant, une autre maladie que la pasteurellose est sûrement à l'origine des symptômes respiratoires puisque les élevages vaccinant restent fortement touchés.

En conclusion, l'influenza porcine n'est pas une maladie respiratoire qui semble bien connue des éleveurs, il semble qu'ils ne la jugent pas comme étant responsable des symptômes respiratoires dans leur élevage.

Concernant les volailles, des questions sur les symptômes évoquant l'influenza aviaire ont été posées, à savoir si l'éleveur a observé une mortalité brutale, une baisse de consommation, une baisse de production, de la diarrhée, et/ou des troubles nerveux. Dans les 80 élevages avec volailles, aucun éleveur n'a déclaré avoir des volailles malades le jour de la visite. Dans l'année, 38 éleveurs ont observé de tels symptômes, près de la moitié ont estimé une morbidité inférieure ou égale à 25%, 32% des éleveurs ont évoqué une morbidité entre 30 et 50%, et dans 21% des cas la morbidité était très élevée, supérieure ou égale à 60% (Annexe 13). Parmi tous ces élevages avec symptômes, 30 d'entre eux ont rencontré de la mortalité, 60% ont déclaré avoir une létalité de 90 à 100%. Les maladies rencontrées ne semblent pas très contagieuses, mais ont un taux de létalité assez important de manière générale. Cependant il est difficile d'interpréter ces résultats concernant l'agent pathogène en cause. Car en effet, pour l'IAHP, les canards sont moins sensibles que les poulets, il faudrait donc avoir des informations précises sur l'espèce touchée. Or 20% des élevages ont plusieurs espèces de volailles, et dans le questionnaire nous n'avons pas précisé l'espèce touchée.

La période principalement citée comme étant propice au syndrome grippal chez les volailles s'étend de décembre à avril (Annexe 14). Dans ce cas aussi, l'étude menée se situe en fin de période.

Concernant la vaccination contre les pestes aviaires (la maladie de Newcastle et l'influenza A), la moitié des élevages n'utilisent aucune vaccination, et 20% d'entre eux ont utilisé les deux vaccins. 47% des élevages utilisent un vaccin contre l'influenza A de sous-type H5, et 23% contre la maladie de Newcastle. La vaccination contre l'influenza A a été réalisée dans 92% des cas en 2008 ou en 2009 (Annexe 15). On observe que plus de la moitié des élevages ayant vacciné contre l'influenza A ont présenté des symptômes dans l'année, et plus de la moitié de ceux n'ayant pas vacciné n'ont pas présenté de symptômes. Nous ne possédons pas d'information précise sur le moment d'apparition des symptômes par rapport à la vaccination. Comme pour les porcs, on peut penser que les élevages rencontrant un syndrome grippal sont plus amenés à effectuer une vaccination. Mais si la vaccination est antérieure aux symptômes, l'influenza A de sous-type H5 n'est pas la maladie responsable.

III.4.2. Commémoratifs des maladies respiratoires dans les élevages de porcs avec symptômes

Pour l'enquête de surveillance, du fait de la courte période dont nous disposons et du manque d'observations précises des symptômes par les éleveurs, il a fallu élargir la définition de cas pour avoir un maximum de déclarations. Ainsi les élevages avec fièvre et abattement uniquement, et ceux avec des symptômes respiratoires sans fièvre remarquée ont été enquêtés. Les éleveurs déclarant avoir eu des symptômes la semaine précédant l'enquête sont aussi rentrés dans l'étude.

En effet, dans 61% des cas uniquement, d'après les déclarations des éleveurs, les symptômes observés correspondaient exactement à la définition du cas suspect à savoir l'observation de symptômes respiratoires et de fièvre ou d'abattement (Annexe 16). Cependant le critère fièvre notamment est important car assez discriminant, il est rarement présent lors d'une infection seule à *Mycoplasma hypopneumoniae* (Thacker *et al.*, 2001), et est généralement corrélé avec une excrétion forte lors de l'infection au SIV. Dans les 28 élevages avec symptômes enquêtés, nous avons pris la température des porcs. Dans 21 fermes, les éleveurs ont déclaré avoir remarqué de la fièvre chez leurs porcs, mais ils n'ont pas pris la température, une hyperthermie a été observée dans 17 élevages. Donc les autres 11 élevages ne présentaient pas de fièvre lors des prélèvements. Les informations concernant les symptômes effectivement observés, autres que l'hyperthermie, ne sont pas pertinentes car un examen clinique complet n'a pas été réalisé, et le temps passé sur l'élevage a été relativement court ; à titre indicatif elles sont résumées dans l'Annexe 16.

D'autres renseignements ont été demandés concernant les catégories d'animaux touchés par la maladie, et le nombre de porcs morts, ils sont résumés dans l'annexe 17. Les catégories les plus concernées sont les porcs à l'engrais, puis les truies, et enfin les porcelets. Dans 61% des cas, seuls les porcs à l'engrais ont été touchés, et dans 36% des cas plusieurs catégories ont manifesté des symptômes. Enfin, dans 61% des élevages, il n'y a pas eu de mortalité, et dans les autres elle a généralement été faible. Plus de la moitié des éleveurs avaient une idée sur l'agent pathogène en cause, ils ont cité la mycoplasmosse et le PRRsV.

Une donnée importante doit être exposée, à savoir le délai entre l'apparition des symptômes et les prélèvements (Annexe 18), du fait de l'excrétion courte (quelques jours) lors d'infection par un SIV. En effet, dans seulement 41% des élevages les premiers symptômes sont apparus au plus tard la semaine précédent les prélèvements. Dans les cas extrêmes, ils sont apparus plus d'un mois avant. Les éleveurs ont en effet déclaré dans 81% des cas que les symptômes observés sont apparus de manière progressive.

Tous ces éléments sont donc intéressants, ils pourront servir à expliquer notamment les résultats virologiques négatifs dans la discussion.

IV. Discussion

IV.1. Les biais de l'étude

Une étude peut comporter plusieurs biais, les biais de sélection, les biais d'observation, et les biais de confusion. Les biais de sélection résultent de la façon dont l'échantillon est choisi au sein de la population, ils peuvent conduire à ce que les sujets effectivement observés lors de l'enquête ne constituent pas un groupe représentatif des populations étudiées. Les biais d'observation ou de mesure résultent d'erreurs de mesure ou de mauvaise interprétation de cette mesure. Les biais de confusion sont liés à l'influence de tiers facteurs, appelés facteurs de confusion, sur les associations étudiées. Dans notre étude, les biais principaux sont des biais de sélection et d'observation, on ne peut pas étudier des biais de confusion n'ayant pas de résultat positif aux analyses RRT-PCR et donc n'ayant pas d'analyse statistique de facteurs de risque.

IV.1.1. Biais de sélection

Le principal biais de sélection concerne l'établissement des listes d'élevages par les services vétérinaires des communes et des provinces sur lesquelles nous sommes basés pour effectuer le tirage au sort. En effet, ils ont utilisé les listes de vaccination, or les élevages vaccinant ont sans doute des caractéristiques différentes (taille, type de production, niveau technique et de biosécurité...), et la vaccination implique une circulation du personnel vaccinant dans ces élevages, pouvant être un facteur de risque.

Un autre biais s'explique par le fait que les listes fournies contenaient des informations différentes et plus ou moins complètes selon les communes. A Ha Tay, il s'agissait de listes détaillées des élevages, alors qu'à Bac Giang seul un nombre d'élevages de porcs et/ou de truies par commune a été donné, d'où l'utilisation d'une méthode d'échantillonnage différente selon la province. Du fait de la disparité de ces listes, les élevages de truies (sans porc gras) ont été inclus dans la population source, cependant de façon concrète ces derniers n'ont pas été enquêtés.

Enfin, lors de la réalisation des prélèvements dans les élevages, nous n'avons pas été autorisés à prélever les truies gestantes, le protocole de départ concernant les truies n'a donc pas été respecté. De même pour les volailles, des difficultés se sont présentées car elles étaient souvent en liberté, donc, dans certains cas, les prélèvements des 15 volailles requises n'ont pas pu être effectués.

IV.1.2. Biais d'observation

De manière générale, comme les entretiens se déroulaient en vietnamien, nous n'avons pas pu y participer pleinement, et de ce fait les réponses ont été soumises au jugement de l'interprète. Pour limiter ce biais un interprète scientifique avait été choisi, et le questionnaire avait été testé sur le terrain.

Cependant le recours à un autre interprète scientifique a été nécessaire, pour une dizaine d'élevages, or il n'avait pas testé préalablement le questionnaire. Les informations recueillies ont donc été de moins bonnes qualités et soumises à une interprétation peut-être plus subjective de ce second interviewer.

Les éleveurs n'ont pas toujours pu fournir des renseignements précis. Notamment l'observation des symptômes respiratoires et/ou de fièvre dans l'année ou le jour de la visite est une information assez subjective de la part des éleveurs car par exemple ceux-ci ne prennent jamais la température des animaux. Dans les élevages avec symptômes, nous avons pu parfois observer nous-mêmes des symptômes le jour de la visite, mais parfois ça n'a pas été le cas. De même, certains éleveurs ne se souvenaient pas de certaines informations, comme par exemple les dates de vaccination des animaux, parfois ils étaient incapables de faire une estimation du nombre de porcs qu'ils avaient dans l'année, des proportions des types d'aliment qu'ils ont donné etc. Tout cela a

compliqué le travail de l'interprète qui a dû parfois renseigner certaines parties du questionnaire avec une appréciation plus personnelle. Cependant, des discussions avec l'interprète sur les questionnaires réalisés ont permis d'avoir une idée claire des problèmes qui se sont posés.

Cette étude a donc comporté plusieurs biais qui ont été identifiés et limités. Certains biais n'ont pu être évités du fait de l'organisation des différentes structures et de notre travail, et de l'accès aux informations, comme les listes d'élevage, au Vietnam.

IV.2. Hypothèses concernant les résultats négatifs

Les analyses en laboratoire des prélèvements virologiques n'ont donné que des résultats négatifs, plusieurs éléments d'explication vont être apportés. Trois principaux points peuvent être développés à savoir l'échantillonnage et la période de l'étude, la réalisation et l'analyse des prélèvements, et la place de l'influenza porcine dans le complexe des maladies respiratoires porcines.

IV.2.1. Echantillonnage et période de l'étude

Pour l'enquête de viroprévalence, la taille de l'échantillon a été choisie par rapport à l'étude de séroprévalence. Il a été vu que, pour le calcul de la taille d'échantillon sur Winepiscopes®, la séroprévalence attendue est supérieure à la viroprévalence attendue. Dans ce cas, la taille de l'échantillon calculée reste parfaitement adéquate pour une estimation de viroprévalence. Cependant, pour la détection d'au moins un cas de SIV, la taille d'échantillon calculée est insuffisante si on utilise une prévalence attendue trop supérieure à la réalité. Or en vue des résultats de l'étude, nous avons calculé que la prévalence maximale possible de la population est de l'ordre de 4%, or une prévalence attendue de 5% a été utilisée pour le calcul. On peut par exemple calculer sur Winepiscopes® la taille de l'échantillon pour la détection d'au moins un cas dans une population avec une prévalence de 3%, elle est de 98 élevages, contre 75 prélevés dans notre enquête par sondage aléatoire. Cela a pu donc diminuer les chances de détection de SIV. Au niveau intra-élevage, on peut apporter la même explication puisque la prévalence attendue utilisée pour le calcul est supérieure à la viroprévalence attendue dans les élevages. Cependant, pour l'étude il a fallu trouver un consensus entre besoins scientifiques et coût des analyses.

De manière générale dans la bibliographie (Annexe 2), le taux d'isolement de SIV en dépistage systématique et même dans les fermes avec des symptômes respiratoires reste faible. En effet, cela est principalement dû à la fenêtre d'excrétion qui est courte (voir I.2.3. Aspects cliniques et excrétion des virus influenza A). De ce fait, on pourrait expliquer que même les élevages avec symptômes qui ont été prélevés n'aient pas présenté de cas d'influenza porcine. Les résultats ont aussi montré que pour plus de la moitié des élevages avec symptômes prélevés, le délai entre l'apparition des premiers symptômes et la réalisation des prélèvements était supérieur à une semaine. De plus, la fièvre est normalement corrélée avec une forte excrétion virale, or dans 40% des fermes aucun porc prélevé n'était en hyperthermie. Concernant les volailles, aucune ne présentait de symptômes d'influenza A lors des prélèvements. Il est donc fortement possible pour les porcs et les volailles que les prélèvements aient été effectués en dehors de la période d'excrétion virale. Il faudrait établir un système de surveillance plus performant, et notamment permettant une détection plus précoce des cas suspects.

Enfin, un autre facteur a certainement joué un rôle important. Comme déjà évoqué, la période de l'étude était initialement prévue de février à mars, mais finalement l'enquête a été réalisée de mi-mars à début mai. Dans l'analyse des résultats, les périodes des maladies respiratoires des porcs et des volailles ont été déterminées d'après dires d'éleveurs. Ces informations peuvent être utilisées à titre indicatif, elles font appel à la mémoire des éleveurs. La période identifiée pour les porcs et les volailles est de décembre à avril, avec un pic en février pour les porcs et en janvier pour les volailles. Les mois les moins cités sont ceux de mai à octobre pour les porcs, et de mai à août pour les volailles. Ainsi, la

période de notre étude représente la fin de la période des maladies respiratoires, diminuant encore nos chances de détection de cas d'infection par un virus influenza.

IV.2.2. Réalisation et analyse des prélèvements

Sur le terrain, pour les porcs, les écouvillons utilisés étaient relativement courts, et l'écouvillonnage était effectué après la prise de sang et donc assez rapidement. Ainsi peut-être la technique d'écouvillonnage n'était pas parfaitement adaptée pour avoir des chances maximales de détection virale. Le fait qu'aucun Flu Detect® n'ait été positif peut s'expliquer en partie par le fait que l'écouvillon était réalisé après passage des deux écouvillons pour l'analyse RRT-PCR, cela peut avoir diminué la charge virale de l'échantillon. Cependant ces tests Flu Detect® n'ont pas été validés chez les porcs, même s'ils détectent des antigènes viraux communs aux virus influenza de type A, et qu'une étude (Sanchez *et al.*, 2008) a montré qu'ils étaient adaptés.

Concernant les écouvillons effectués sur les volailles, l'OIE recommande normalement d'effectuer un écouvillon cloacal et un écouvillon trachéal dans le cas des gripes aviaires. Or par souci pratique et de coût, seul un écouvillonnage cloacal a été réalisé. Plusieurs études montrent que, selon les souches virales, l'isolement se fait plutôt sur des écouvillons cloacaux ou plutôt sur des écouvillons trachéaux. En effet, selon les virus influenza, le temps et la localisation dans l'organisme de l'excrétion virale diffèrent (Chen *et al.*, 2004; Van Der Goot *et al.*, 2005; Spickler *et al.*, 2008). Effectuer un double écouvillonnage aurait donc augmenté les probabilités d'isolement viral chez les volailles.

Comme déjà évoqué, l'utilisation de pools chez les porcs n'a pas été validée, il s'agit d'une utilisation empirique. Chez les volailles, elle semble cependant tout à fait appropriée, et couramment utilisée (Munster *et al.*, 2007). Néanmoins, de manière générale, elle pourrait réduire le niveau de détection du virus. Ainsi pour les porcs, nous avons effectué un double écouvillonnage nasal, un écouvillon individuel étant conservé en plus, cela permettra d'effectuer des analyses ultérieures.

Les températures de conservation peuvent aussi être mises en cause. Cependant, les milieux de transport ont été conservés au froid sur le terrain, et les écouvillons aussitôt effectués ont été replacés dans la glacière. La température n'a pas été mesurée au cours de la journée, mais toutes les précautions ont été prises pour la maintenir proche des 4°C, et les prélèvements ont été placés le soir même à -20°C. Ils ont été placés quelques semaines plus tard à -70°C. En effet, il est conseillé de garder les échantillons à -70°C pour de longues périodes. Cependant, ils peuvent normalement être maintenus pendant des semaines voire des mois à -20°C. Les températures de conservation ne semblent pas être une explication majeure des résultats négatifs.

Des substances inhibitrices, comme des agents blanchissants utilisés dans la fabrication des écouvillons, et la dégradation de l'ARN avant la RRT-PCR peuvent être mises en cause. L'ARN est relativement instable et les enzymes de dégradation de l'ARN sont ubiquistes (Spackman *et al.*, 2002).

Ces trois derniers facteurs explicatifs, à savoir la pratique du pool, les températures de conservation, et les substances inhibitrices, auraient pu être éliminés par l'utilisation de témoin positif dans l'étude. On aurait pu utiliser le même matériel, et mettre un écouvillon avec de l'ARN viral avec quatre écouvillons stériles en pool de cinq, et les conserver avec les autres échantillons. L'analyse de ces témoins aurait pu mettre en évidence si ces techniques sont appropriées. Cependant pour cela, il aurait fallu avoir et manipuler de l'ARN viral.

IV.2.3. Place de l'influenza porcine dans le complexe des maladies respiratoires porcines

On peut essayer d'apporter une explication supplémentaire des résultats négatifs dans le cas de l'étude basée sur la surveillance, outre la fenêtre d'excrétion courte et la période des prélèvements. Les porcs prélevés avaient des symptômes rentrant dans la définition de cas. Mais cette définition de cas est large, il est très difficile d'en avoir une discriminante du fait de l'absence de signe clinique pathognomonique de l'influenza. En effet, l'influenza porcine appartient au complexe des maladies respiratoires porcines, de nombreux agents pathogènes peuvent en effet être à l'origine de symptômes respiratoires et/ou de fièvre et d'abattement.

Plusieurs études décrivent les différents pathogènes rencontrés. Une étude en Thaïlande (Nakharuthai *et al.*, 2008) sur des porcelets suggère que le SIV n'est pas le pathogène majeur dans le complexe des maladies respiratoires porcines dans ce pays. Dans une étude aux Etats-Unis sur des porcs avec pneumonie (Janke, 2003), le SIV a été détecté dans 20,8% des cas, contre 39,3% pour le PRRsV et 27,6% pour *Pasteurella multocida* ; viennent ensuite d'autres agents pathogènes. Dans 61,8% des cas de SIV, il n'y a pas d'association avec le PRRsV, le Circovirus Porcin (PCV) ou *Mycoplasma hypopneumoniae*. Ces études montrent donc que le SIV est rarement le pathogène majeur dans le complexe des maladies respiratoires porcines dans différents pays. On ne peut cependant pas utiliser directement ces résultats car la situation dans le Nord-Vietnam peut être différente.

Néanmoins, dans notre étude, les éleveurs interrogés n'ont jamais déclaré que leur troupeau ait été atteint par le SIV dans l'année, mais cette donnée n'est pas vraiment utilisable car aucune analyse en laboratoire n'a été réalisée. L'influenza porcine ne semble pas être une maladie dont se préoccupent les éleveurs et les services vétérinaires. Il serait intéressant de mener des études au Vietnam pour avoir des informations sur les différents agents pathogènes responsables des maladies respiratoires dans le cadre d'une surveillance syndromique.

IV.3. Propositions pour les études ultérieures

IV.3.1. Recommandations de la FAO concernant le virus Pandemic H1N1/2009

Dans le contexte de pandémie à H1N1, il est important de développer un programme général de surveillance des virus influenza chez le porc. Cela implique la mise en place d'une surveillance passive avec déclaration des cas, ainsi que l'élaboration et la coordination des protocoles de recherche, tout cela ayant pour but de répondre aux questions suivantes, telles que citées par la FAO :

- (A) Les porcs sont-ils la source de l'exposition humaine ?
- (B) Peut-on démontrer l'absence du virus Pandemic H1N1/2009 chez le porc ?
- (C) La souche pandémique est-elle détectée et collectée chez la population porcine ?

Pour chacune d'elle, la FAO émet des recommandations en termes de protocole. Pour (A), elle conseille d'effectuer des études épidémiologiques à partir des cas humains d'influenza Pandemic H1N1/2009 en se renseignant sur le(s) contact(s) potentiel(s) des personnes avec des troupeaux porcins, afin de rechercher la présence éventuelle de porcs infectés. Pour (B), des enquêtes par sondage aléatoire sont recommandées à l'échelle d'une zone ou d'un pays. Elles doivent être adaptées pour détecter une prévalence d'au moins 1% avec un degré de confiance de 99%. Enfin pour (C), une stratégie générale de surveillance est recommandée dans les élevages et abattoirs. Pour les fermes, une surveillance basée sur une définition de cas est à envisager, et en abattoir une observation des syndromes grippaux et des lésions devrait être effectuée (FAO, 2009).

L'étude réalisée dans le cadre du stage a permis d'identifier certaines difficultés pratiques dans la réalisation d'enquêtes épidémiologiques et virologiques, ainsi il est possible d'émettre certaines propositions pour des études ultérieures sur les SIV en général. Dans tous les cas, il est nécessaire de

prendre en compte les recommandations de la FAO dans le contexte pandémique H1N1. Le Tableau 7 (p. 38 et 39) présente un résumé sur les différents protocoles et objectifs cités.

IV.3.2. La surveillance avec définition de cas des maladies respiratoires porcines

La forte saisonnalité de l'influenza A et les périodes d'excrétion courtes impliquent la nécessité de cibler les périodes propices à la maladie dans l'année et de détecter précocement les cas de SIV. Cependant du fait de l'apparition de la souche Pandemic H1N1/2009, la surveillance des SIV porcins est fortement recommandée tout au long de l'année, en particulier concernant les élevages porcins familiaux.

Dans notre étude, nous avons tenté de mettre en place sur une courte période de temps un système de déclaration des cas de maladies respiratoires porcines. Quelques réflexions peuvent être faites concernant la mise en place d'une surveillance syndromique dans ce contexte particulier.

a) Comment inciter les éleveurs et les vétérinaires à déclarer les cas ?

Pour informer les différents acteurs, des tracts avaient été distribués aux éleveurs directement ou via les services vétérinaires, et aux vétérinaires de communes. Un diagnostic des maladies respiratoires avaient été proposé aux éleveurs en échange de leur participation, et une rémunération à la journée aux vétérinaires. Cependant, la déclaration des cas n'a été effectuée que par les vétérinaires des communes qui, du fait de leurs activités, avaient connaissance de cas dans des élevages. Presque aucun éleveur n'a contacté les vétérinaires du fait de la distribution des tracts. Cela peut s'expliquer par le fait que la mise en place d'un tel réseau nécessite beaucoup plus de temps afin de bien renseigner les acteurs, et de les impliquer.

De plus, aucun éleveur n'a souhaité effectuer le diagnostic de la maladie, ils ont préféré une rémunération. En effet, après discussion avec les collègues vietnamiens, il s'est avéré que, de manière générale, les éleveurs vendent les porcs malades aux collecteurs afin de minimiser les pertes économiques. Ainsi ils font rarement appel aux vétérinaires pour des soins, et cela explique leur manque d'intérêt pour déclarer des cas et pour effectuer un diagnostic.

Ainsi, plusieurs observations peuvent être faites. Le fait que les porcs malades soient mis sur le marché pour la consommation est un problème qui doit être résolu par les services vétérinaires. A notre échelle, lors de la mise en place d'une surveillance, il est apparu que les vétérinaires communaux étaient les meilleurs interlocuteurs. En effet, il s'agit à la fois de partenaires scientifiques et de personnes en contact direct avec les éleveurs. Dans notre étude, ils ont fourni tous les cas sur une courte période de temps. Après discussion, il s'avère qu'ils savent quand il y a des épisodes de maladies respiratoires sur leur commune. Une rémunération à la journée pour leur travail de recherche des élevages déclarant des maladies semble adaptée. Pour éviter une sur-déclaration, plusieurs recommandations peuvent être faites. Tout d'abord, en-dehors du contexte pandémique H1N1, il est intéressant de cibler les périodes dans l'année des maladies respiratoires pour alléger la surveillance tout en maintenant le réseau mis en place en restant en contact avec les vétérinaires. Ensuite, il est recommandé de proposer une rémunération pour un service globale de recherche de cas, et non une rémunération par élevage identifié. Enfin, une vérification de la présence des symptômes de la définition du cas suspect doit être effectuée lors de la réalisation des prélèvements. Une rémunération des éleveurs doit être préservée.

Le retour des résultats d'analyse doit évidemment être fait. Les éleveurs et bien sûr les services vétérinaires sont très demandeurs concernant le retour de l'information.

b) Comment établir une définition du cas suspect adaptée ?

Comme déjà évoqué, il est difficile d'établir une définition du cas suspect assez spécifique : l'influenza porcine présente des signes cliniques peu caractéristiques de la maladie, et le SIV peut être associé à d'autres agents pathogènes comme notamment le PRRsV, le PCV, *Mycoplasma hypopneumoniae*, *Pasteurella multocida* et *Streptococcus suis* (Janke, 2003). La définition de cas peut parfois manquer aussi de sensibilité, lors d'infections inapparentes à certains SIV.

Celle utilisée dans notre étude pour les petits élevages semble adaptée. Pour qu'elle soit plus spécifique, outre les symptômes respiratoires, les critères fièvre, abattement, et anorexie sont importants. En particulier, il s'agit de symptômes rarement présents lors d'une infection seule à *Mycoplasma hypopneumoniae* (Thacker *et al.*, 2001). Une hyperthermie doit être présente lors de la réalisation des prélèvements. On peut noter que dans les fermes avec symptômes enquêtées, les catégories les plus concernées par la définition de cas sont les porcs à l'engrais, mais on ne peut pas en déduire qu'il s'agit d'un SIV plutôt que d'une autre maladie. Pour les élevages de grande taille, un critère de la définition de cas est à modifier, à savoir le nombre de porcs malades. Ce critère était d'au moins 2 porcs pour les petits producteurs ; pour les autres, la FAO recommande qu'au moins 10% des animaux présents dans l'unité choisie (bande, élevage...) présentent des symptômes sur une période d'une semaine (FAO, 2009).

Cependant, du fait des co-infections, les signes cliniques s'étalent sur une période qui peut être plus longue, ils ne révèlent pas directement une infection par le SIV, et on ne peut donc pas forcément connaître avec précision le moment de l'infection, et donc de l'excrétion qui est courte. Il faut donc identifier précocement les troupeaux atteints et les suivre sur plusieurs jours avec des prélèvements répétés. De plus, l'analyse des prélèvements pour les autres agents pathogènes fournirait des données intéressantes pour connaître les agents pathogènes majeurs et les associations dans le complexe respiratoire porcine au Vietnam.

La surveillance des maladies respiratoires porcines est donc longue et difficile à mettre en place. Elle peut engendrer un coût important si on entreprend l'analyse des prélèvements pour les autres maladies respiratoires. Pour cela, il faut avoir une définition de cas la plus spécifique possible, et répéter les prélèvements pour augmenter les chances d'isolement viral. Effectuer l'analyse des prélèvements pour les autres maladies respiratoires serait intéressant à la fois scientifiquement et pour les éleveurs et les services vétérinaires, cela permettrait d'entretenir des liens plus étroits de collaboration dans le cadre d'une surveillance.

IV.3.3. Etudes en abattoir

En abattoir, il est possible de mettre en place des enquêtes virologiques et une surveillance des SIV. De nombreuses études virologiques y ont été réalisées en Asie du Sud-Est. Deux études en Chine ont eu des taux d'isolement de plus de 16%, deux autres des taux de plus de 3%, et six autres en Chine et à Taïwan des taux inférieurs à 1% (Annexe 2). Les résultats sont donc assez variables, mais dans tous les cas des souches de SIV ont pu être isolées.

Ainsi, il serait intéressant de faire une étude dans le Nord-Vietnam pour isoler des souches virales. La réalisation de prélèvements sur une année est particulièrement intéressante puisqu'elle augmente les chances d'isolement, et qu'elle permettrait d'établir un profil saisonnier précis de l'influenza porcine. Cependant une telle étude est très coûteuse en matériel et en main d'œuvre. Elle peut donc être envisagée sur quelques mois. Il est alors nécessaire de déterminer les périodes où il y a le plus de cas de maladies respiratoires porcines. Mais nous ne disposons que de peu d'informations sur ce sujet dans la zone. Il est donc important de recouper plusieurs sources d'informations comme les publications scientifiques, les dires d'éleveurs, et les observations des services vétérinaires. La période qui semble la plus adaptée s'étale de la fin de l'automne au début ou à la fin de l'hiver (voir II.2.Choix de la période d'étude). Une enquête auprès des services vétérinaires des provinces, des districts et des communes pourraient peut-être fournir des renseignements plus précis pour la zone d'étude.

Cependant, dans le contexte pandémique actuel, une surveillance continue en abattoir, contrairement à des enquêtes ponctuelles, est intéressante à mettre en place, la vigilance des techniciens est importante. Une double surveillance est alors possible à la fois clinique et lésionnelle.

De manière générale, différents prélèvements pourront être réalisés, des prises de sang pour des analyses sérologiques, des écouvillons nasaux et trachéaux ainsi que des prélèvements de poumons, particulièrement lors de lésions, pour des analyses virologiques. Le stress à l'abattoir peut de plus favoriser l'excrétion virale, augmentant les chances d'isolement. Il sera nécessaire de remonter aux élevages d'origine lors de cas d'infection au H1N1 pandémique, et dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques pour réaliser un questionnaire auprès des éleveurs en vue d'une étude de facteurs de risque. Cependant la traçabilité en abattoir n'est pas toujours réalisable dans un grand nombre de structures, et notamment au Vietnam.

IV.3.4. Etude de cinétique

Une étude de cinétique, visant à isoler du SIV, peut aussi être envisagée. Il faut se baser sur l'enquête sérologique qui aura permis d'identifier des facteurs de risque, ainsi il est possible de cibler les élevages à risque et d'augmenter les chances d'isolement viral. Pour cela, en période de maladies respiratoires porcines, des prélèvements pourront être effectués une à deux fois par semaine sur des animaux dans ces fermes. Ces élevages pourront aussi servir de sentinelles dans le cadre d'un programme de surveillance. De plus, une telle étude peut être envisagée pour effectuer un suivi de cohortes afin de mesurer l'incidence de l'influenza porcin.

IV.3.5. Choix des méthodes d'analyse en laboratoire

Dans tous les cas, les analyses en laboratoire des prélèvements virologiques peuvent être réalisées avec différentes méthodes. La RRT-PCR est une méthode particulièrement adaptée, et elle est rapide et relativement peu coûteuse en première intention par rapport aux autres méthodes d'analyse virologique. Cependant la plupart des études citées dans l'annexe 2 ont utilisé l'isolement viral sur œufs embryonnés ou sur cellules avant réalisation de PCR. Une étude montre qu'il est intéressant d'associer ces différentes méthodes aussi souvent que possible pour optimiser la détection de SIV (Barigazzi et al., 2003). Le développement d'une RT-PCR Multiplex semble particulièrement intéressant (Chang *et al.*, 2008) ; elle permet de tester après isolement viral de nombreux sous-types, soient 12 hémagglutinines (H1-H12) et les 9 neuraminidases qui sont communément isolées pour des virus aviaires, porcins et humains. Cela est particulièrement intéressant dans le contexte pandémique actuel. Les sous-types H1N1 identifiés devront être analysés par séquençage moléculaire par un laboratoire de référence, tel que recommandé par la FAO (FAO, 2009). De manière générale pour les virus influenza, il y a à disposition de nombreuses méthodes d'analyse, la principale limite est évidemment le coût.

Objectif Protocole	Alerte précoce, Pandemic H1N1/2009	Epidémiologie moléculaire, Isolement, Identification des souches	Viroprévalence/ Séroprévalence Facteurs de risque
Enquête transversale	+ <i>Enquête ponctuelle, restreinte dans le temps, et au niveau de la population.</i>	+ Isolement de souches possible. <i>Faible taux d'isolement sur des animaux asymptomatiques, Nécessité d'une grande taille d'échantillon, Cibler la saison.</i>	+++ Echantillonnage aléatoire, représentativité de la population. Information sur l'absence/présence de la souche Pandemic H1N1/2009 dans la zone, Recueil d'informations sur les pratiques d'élevage et la biosécurité. <i>Coûteux, Enquête ponctuelle donc influence saisonnière notamment, Faible taux d'isolement sur des animaux asymptomatiques.</i>
Etude en abattoir	++ Etude à grande échelle, Double surveillance clinique et lésionnelle, Prélèvements de lésions sur carcasses. <i>Logistique lourde (abattages de nuit, nombreux petits abattoirs), Animaux malades non déclarés et cachés aux Services Vétérinaires, Parfois difficile de remonter jusqu'aux élevages.</i>	++ Etude à grande échelle, Prélèvements de lésions sur carcasses, Le stress favorise l'excrétion. <i>Coûteux, car nécessité d'une grande taille d'échantillon, Faible taux d'isolement sur des animaux asymptomatiques.</i>	++ Echantillonnage aléatoire possible. <i>Gros abattoirs peu représentatifs et minoritaires, Logistique lourde (abattages de nuit, nombreux petits abattoirs), Parfois difficile de remonter jusqu'aux élevages.</i>

Etude de cinétique ciblée	<p>+++</p> <p>Elevages sentinelles</p> <p><i>Echantillon réduit de la population.</i></p>	<p>+++</p> <p>Augmente chances d'isolement viral car prélèvements fréquents et réguliers pendant la période d'influenza. Implication des éleveurs permet une meilleure surveillance clinique</p> <p><i>Avoir bien identifié les facteurs de risque et la saisonnalité pour cibler les élevages et la période.</i></p>	<p>+++</p> <p>Suivi de cohortes offre la possibilité de mesure d'incidence et études analytiques.</p>
Surveillance avec définition de cas – syndrome respiratoire chez les porcs	<p>+++</p> <p>Système parfaitement adapté, détection précoce, sur une zone éventuellement importante.</p> <p><i>Long à mettre en place, difficile à maintenir, Implication des éleveurs et vétérinaires locaux nécessaire, Définition de cas peu spécifique et/ou peu sensible.</i></p>	<p>+++</p> <p>Probabilité d'isolement supérieure sur animaux malades.</p> <p><i>Long à mettre en place, Les éleveurs et les vétérinaires doivent être très réactifs. Le virus influenza n'est pas l'agent majoritaire responsable des syndromes respiratoires : nombreux autres pathogènes en cause.</i></p>	<p>++</p> <p>Possibilité d'estimer la représentativité de l'échantillon a posteriori éventuellement.</p> <p><i>Pas d'échantillonnage aléatoire, manque d'exactitude.</i></p>

Tableau 7 : Confrontation protocoles versus objectifs

Légende : **Avantages**
Inconvénients et limites

+ pas ou peu adapté
++ assez adapté, selon certaines modalités
+++ très adapté

Conclusion

Les analyses virologiques des échantillons effectués lors des enquêtes de viroprévalence et de surveillance n'ont fourni aucun résultat positif pour les virus influenza porcins et aviaires. Une étude sur les facteurs de risque n'a donc pas pu être menée. La viroprévalence maximale de SIV dans la population porcine des communes enquêtées des provinces de Ha Tay et Bac Giang est estimée aux alentours de 4%. L'utilisation des statistiques bayésiennes serait plus pertinente dans ce contexte, où la prévalence de la maladie est très faible, pour pouvoir évaluer les risques de ne pas détecter du SIV qui circulerait pourtant dans les élevages.

Les questionnaires réalisés ont confirmé qu'il existe une forte saisonnalité pour les maladies respiratoires chez les porcs et les volailles, et qu'il est important de prendre en compte ce facteur lors de la réalisation d'enquêtes virologiques. Pour les éleveurs, les SIV ne sont pas considérés comme étant des agents pathogènes responsables des maladies respiratoires porcines. Cependant, des analyses en laboratoire ne sont jamais réalisées, le diagnostic est clinique et effectué par l'éleveur ou les services vétérinaires.

Des propositions ont été faites concernant la mise en place d'une surveillance syndromique des maladies respiratoires porcines, notamment sur le fait de développer la collaboration avec les vétérinaires communaux. Afin d'isoler du SIV, une enquête en abattoir ou une étude cinétique avec réalisation de prélèvements sur des élevages à risque pendant les périodes des maladies respiratoires semblent particulièrement adaptées. Cependant la surveillance des SIV tout au long de l'année est très importante du fait notamment de l'apparition de la souche Pandemic H1N1/2009 chez l'Homme ; elle devrait être réalisée auprès des élevages et des abattoirs.

L'étude virologique réalisée a ainsi montré la difficulté d'isoler des souches de SIV, et a permis de faire plusieurs recommandations pour les enquêtes futures.

BIBLIOGRAPHIE

- Albina, E., 2008. Laboratory visit in the framework of the FSP "GRIPAVI" granted by the French Ministry of Foreign Affairs. In: CIRAD (Ed.), p. 12.
- Alexander, D.J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74, 3-13.
- Ambassade-France, 2009. Carte des provinces du Vietnam. [On line]. [2009/08/05]. <URL : http://www.ambafrance-vn.org/IMG/pdf/CARTE_DES_PROVINCES_DU_VIETNAM.pdf>.
- Barigazzi, G., Foni, E., Chiapponi, C., Leotti, G., Longo, S., Joisel, F., 2003. Use of standard kit for the diagnosis of respiratory viral infections in pigs. In: Martelli, P., Cavirani, S., Lavazza, A. (Eds.), 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome, p. 2.
- Brown, I.H., 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet Microbiol* 74, 29-46.
- Cameron, A.R., 1997. Active surveillance and GIS as components of an animal health information system for developing countries. Department of Geographical Sciences and Planning. University of Queensland, p. 325
- Chang, H.K., Park, J.H., Song, M.S., Oh, T.K., Kim, S.Y., Kim, C.J., Kim, H., Sung, M.H., Han, H.S., Hahn, Y.S., Choi, Y.K., 2008. Development of multiplex rt-PCR assays for rapid detection and subtyping of influenza type A viruses from clinical specimens. *Journal of microbiology and biotechnology* 18, 1164-1169.
- Chen, H., Deng, G., Li, Z., Tian, G., Li, Y., Jiao, P., Zhang, L., Liu, Z., Webster, R.G., Yu, K., 2004. The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10452-10457.
- Chin, P.S., Hoffmann, E., Webby, R., Webster, R.G., Guan, Y., Peiris, M., Shortridge, K.F., 2002. Molecular evolution of H6 influenza viruses from poultry in Southeastern China: prevalence of H6N1 influenza viruses possessing seven A/Hong Kong/156/97 (H5N1)-like genes in poultry. *Journal of virology* 76, 507-516.
- Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S., 2002. Prevalence of swine influenza virus subtypes on swine farms in the United States. *Arch Virol* 147, 1209-1220.
- Choi, Y.K., Nguyen, T.D., Ozaki, H., Webby, R.J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T., Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G., 2005. Studies of H5N1 influenza virus infection of pigs by using viruses isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of virology* 79, 10821-10825.
- Choi, Y.K., Ozaki, H., Webby, R.J., Webster, R.G., Peiris, J.S., Poon, L., Butt, C., Leung, Y.H., Guan, Y., 2004. Continuing evolution of H9N2 influenza viruses in Southeastern China. *Journal of virology* 78, 8609-8614.
- Chutinimitkul, S., Thippamom, N., Damrongwatanapokin, S., Payungporn, S., Thanawongnuwech, R., Amonsin, A., Boonsuk, P., Sreta, D., Bunpong, N., Tantilertcharoen, R., Chamnanpood, P., Parchariyanon, S., Theamboonlers, A., Poovorawan, Y., 2008. Genetic characterization of H1N1, H1N2 and H3N2 swine influenza virus in Thailand. *Arch Virol* 153, 1049-1056.
- Cong, Y.L., Wang, C.F., Yan, C.M., Peng, J.S., Jiang, Z.L., Liu, J.H., 2008. Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004. *Virus genes* 36, 461-469.
- Desvaux, S., 2008. Présentation Observatoire Vietnam GRIPAVI. In: CIRAD (Ed.), p. 11.
- Ellström, P., Latorre-Margalef, N., Griekspoor, P., JonasWaldenström, Olofsson, J., JohnWahlgren, Olsen, B., 2008. Sampling for low-pathogenic avian influenza A virus in wild Mallard ducks: Oropharyngeal versus cloacal swabbing. *Vaccine* 26 4414-4416.
- FAO, 2009. FAO Guidelines for surveillance of Pandemic H1N1/2009 and other Influenza viruses in swine populations. FAO, p. 16.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of virology* 79, 2814-2822.

- GSO, 2009 (1). Population and population density in 2007 by province. General Statistics Office Of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=467&idmid=3&ItemID=7354>.
- GSO, 2009 (2). Average rural population by province. General Statistics Office of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=467&idmid=3&ItemID=7348>.
- GSO, 2009 (3). Land use (as of 1 January 2007). General Statistics Office Of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=466&idmid=3&ItemID=7316>.
- GSO, 2009 (4). Number of administrative units as of 31 December 2007 by province. General Statistics Office Of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=466&idmid=3&ItemID=7316>.
- GSO, 2009 (5). Livestock population. General Statistics Office of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=469&idmid=3&ItemID=7852>.
- GSO, 2009 (6). Number of pigs by province. General Statistics Office Of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=469&idmid=3&ItemID=7849>.
- GSO, 2009 (7). Number of poultry by province General Statistics Office Of Vietnam. [On line]. [2009/08/05].
<URL : http://www.gso.gov.vn/default_en.aspx?tabid=469&idmid=3&ItemID=7848>.
- Guan, Y., Shortridge, K.F., Krauss, S., Li, P.H., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1996. Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *Journal of virology* 70, 8041-8046.
- Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G., 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10682-10687.
- Hunt, M., 2006. Microbiology and immunology on line, Real Time PCR. University of South Carolina, School of Medecine. [On line]. [2009/08/05].
<URL : <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>>.
- Janke, B., 2003. Swine Influenza and the Porcine Respiratory Disease Complex. In, George A. Young Swine Conference, pp. 52-61.
- Jung, K., Song, D.S., Kang, B.K., Oh, J.S., Park, B.K., 2007. Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea. *Prev Vet Med* 79, 294-303.
- Karasin, A.I., Brown, I.H., Carman, S., Olsen, C.W., 2000. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. *Journal of virology* 74, 9322-9327.
- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 75 2183-2188.
- Kida, H., Shortridge, K.F., Webster, R.G., 1988. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Virology* 162, 160-166.
- La Van Kinh, L.T.H., Do Van Quang, Nguyen Van Duc 2002. Priorities for Pig Research in Southeast Asia and the Pacific to 2010. In: Paper, A.W. (Ed.) ACIAR, p. 71.
- Li, H., Xin, X., Yang, H., Li, Y., Qin, Y., Xuehui, C., Chen, H., Yu, K., Bi, Y., Tong, G., 2003. Serological and virologic surveillance for swine influenza virus infections among pigs over large areas in Chine in 1998-2002 In: Paolo Martelli, S.C., Antonio Lavazza (Ed.), 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome, pp. 359-360.
- Li, H., Yu, K., Xin, X., Yang, H., Li, Y., Qin, Y., Bi, Y., Tong, G., Chen, H., 2004. Serological and virologic surveillance of swine influenza in China from 2000 to 2003. *International Congress*

Series 754-757.

- Ma, W., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Brockwell, C.B., Lager, K.M., Janke, B.H., Gauger, P.C., Patnayak, D.P., Webby, R.J., Richt, J.A., 2007. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20949-20954.
- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenstrom, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W.E., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2007. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS pathogens* 3, e61.
- Nakharuthai, C., Boonsoongnern, A., Poolperm, P., Wajjwalku, W., Urairong, K., Chumsing, W., Lertwittcharasarakul, P., Lekcharoensuk, P., 2008. Occurrence of swine influenza virus infection in swine with porcine respiratory disease complex. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 39, 1045-1053.
- Nguyen Thi Huong, Wayde, J., 2006. Vietnam Livestock and Products Annual 2006. In: Service, U.F.A. (Ed.), GAIN Report. USDA Foreign Agricultural Service, p. 16.
- Ninomiya, A., Takada, A., Okazaki, K., Shortridge, K.F., Kida, H., 2002. Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. *Vet Microbiol* 88, 107-114.
- Novartis, 2006. Swine influenza virus : understanding this evolving organism.
- OIE, 2005. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2004. Organisation Mondiale de la Santé Animale. [On line]. [2009/07/10].
<URL :http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/A_summry.htm>.
- Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2006. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science (New York, N.Y)* 312, 384-388.
- Olsen, C., Brown, I., Easterday, B., Van Reeth, K., 1999. Swine influenza. In: Straw, B., Zimmerman, J., D'Allaire, S., Taylor, D. (Eds.) *Diseases of Swine*. 9th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 2006, pp. 469-482.
- Olsen, C.W., Carey, S., Hinshaw, L., Karasin, A.I., 2000. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch Virol* 145, 1399-1419.
- Peiris, J.S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R.G., Shortridge, K.F., 2001. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? *Journal of virology* 75, 9679-9686.
- Pensaert, M., Ottis, K., Vandeputte, J., Kaplan, M.M., Bachmann, P.A., 1981. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducts to swine and its potential importance for man. *Bulletin of the World Health Organization* 59, 75-78.
- Pfeiffer, D.U., Minh, P.Q., Martin, V., Epprecht, M., Otte, M.J., 2007. An analysis of the spatial and temporal patterns of highly pathogenic avian influenza occurrence in Vietnam using national surveillance data. *Vet J* 174, 302-309.
- Poljak, Z., Dewey, C.E., Martin, S.W., Christensen, J., Carman, S., Friendship, R.M., 2008. Prevalence of and risk factors for influenza in southern Ontario swine herds in 2001 and 2003. *Can J Vet Res* 72, 7-17.
- Sanchez, M.D., Carreon, N.R., Palacios, A.J., 2008. Antigen detection for SIV disease in pigs using a commercial rapid test and virus isolation in a non vaccinated farm in Mexico. In, *Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa*.
- Scholtissek, C., Burger, H., Bachmann, P.A., Hannoun, C., 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology* 129, 521-523.
- Schultz, U., Fitch, W.M., Ludwig, S., Mandler, J., Scholtissek, C., 1991. Evolution of pig influenza viruses. *Virology* 183, 61-73.
- Shieh, H.K., Chang, P.C., Chen, T.H., Li, K.P., Chan, C.H., 2008. Surveillance of avian and swine

- influenza in the swine population in Taiwan, 2004. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 41, 231-242.
- 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., 2002. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of clinical microbiology* 40, 3256-3260.
- Spickler, A.R., Trampel, D.W., Roth, J.A., 2008. The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Pathol* 37, 555-577.
- Swenson, E., 1999. Swine Influenza Virus. Swine Health Fact Sheet 1.
- Thacker, E., Janke, B., 2008. Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *The Journal of infectious diseases* 197 Suppl 1, S19-24.
- Thacker, E.L., Thacker, B.J., Janke, B.H., 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *Journal of clinical microbiology* 39, 2525-2530.
- Thawatsupha, P., Waicharoen, S., 2003. Isolation and identification of influenza virus strains circulating in Thailand in 2001. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 34, 94-97.
- Van Der Goot, J.A., Koch, G., de Jong, M.C., van Boven, M., 2005. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 18141-18146.
- Van Reeth, K., 2007. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet Res* 38, 243-260.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y., 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews* 56, 152-179.
- WHO, 2009 (1). Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. World Health Organization. [On line]. [2009/07/18].
<URL:http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_08_11/en/index.html>.
- WHO, 2009 (2). WHO and hoc scientific teleconference on the current influenza A(H1N1) situation. World Health Organization. [On line]. [2009/04/29].
<URL : http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/TCReport2009_05_04.pdf>.
- Yu, H., Hua, R.H., Wei, T.C., Zhou, Y.J., Tian, Z.J., Li, G.X., Liu, T.Q., Tong, G.Z., 2008. Isolation and genetic characterization of avian origin H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Vet Microbiol* 131, 82-92.
- Yu, H., Zhang, G.H., Hua, R.H., Zhang, Q., Liu, T.Q., Liao, M., Tong, G.Z., 2007. Isolation and genetic analysis of human origin H1N1 and H3N2 influenza viruses from pigs in China. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 91-96.
- Zhou, N.N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K., Krauss, S., Webster, R.G., 1999. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. *Journal of virology* 73, 8851-8856.
- Zhu, Q., Yang, H., Chen, W., Cao, W., Zhong, G., Jiao, P., Deng, G., Yu, K., Yang, C., Bu, Z., Kawaoka, Y., Chen, H., 2008. A naturally occurring deletion in its NS gene contributes to the attenuation of an H5N1 swine influenza virus in chickens. *Journal of virology* 82, 220-228.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Effectifs du cheptel vietnamien, en milliers de têtes (GSO 2009 (5))

	Buffaloes	Cattle	Pigs	Horses	Goats, sheep	Poultry (Mill. heads)
1990	2854,1	3116,9	12260,5	141,3	372,3	107,4
1995	2962,8	3638,9	16306,4	126,8	550,5	142,1
2000	2897,2	4127,9	20193,8	126,5	543,9	196,1
2005	2922,2	5540,7	27435,0	110,5	1314,1	219,9
2006	2921,1	6510,8	26855,3	87,3	1525,3	214,6
Prel. 2007	2996,4	6724,7	26560,7	103,5	1777,6	226,0

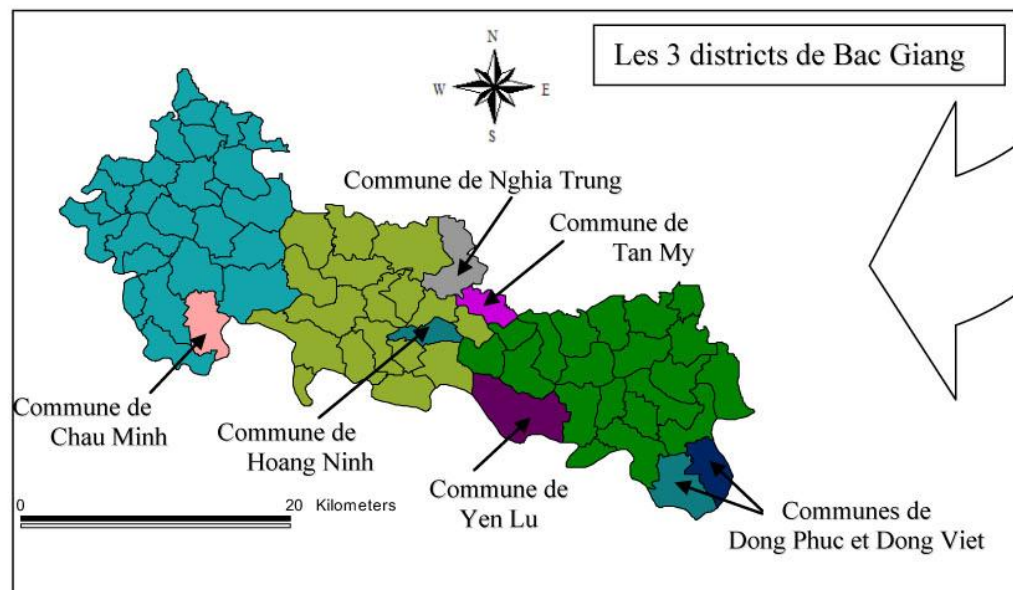
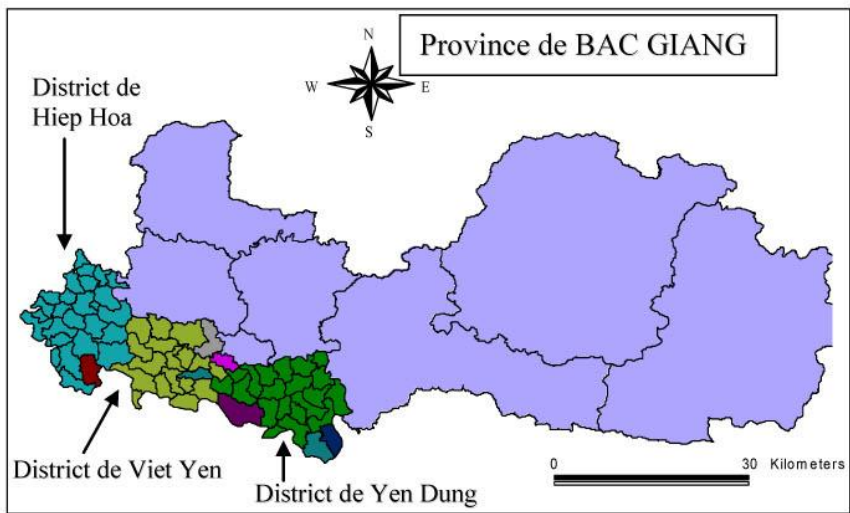
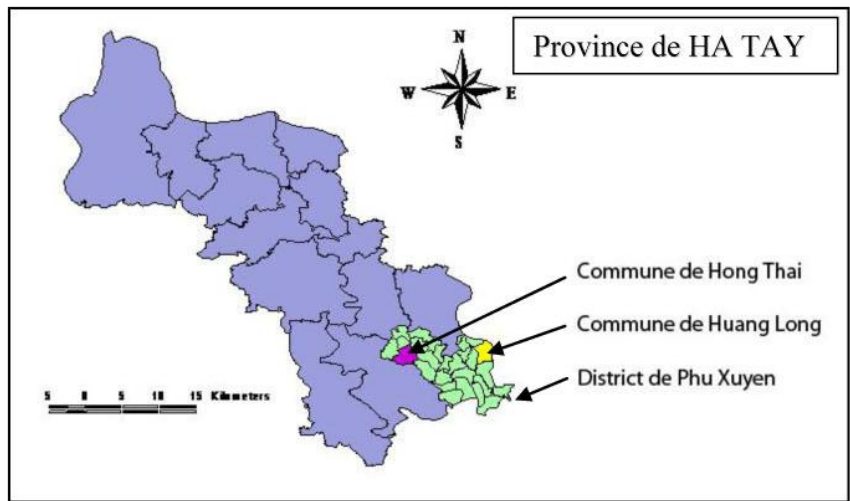
ANNEXE 2 : Aperçu non exhaustif des différents sous-types isolés en Asie et aux Etats-Unis

Localisation	Année	Sous-type viral	Stratégie	Taux d'isolement	Symptômes	Référence
Taiwan	2004	Influenza A	Slaughterhouse	0,8%	healthy	Shieh, 2008
Taiwan	2004	H1N2	Slaughterhouse	0,1%	healthy	Shieh, 2008
Taiwan	2004	H3N1	Slaughterhouse	0,1%	healthy	Shieh, 2008
China	1994	Influenza A	Slaughterhouse	16,9%	healthy	Guan, 1996
China	1994	H1N1 classic	Slaughterhouse	16,6%	healthy	Guan, 1996
China	1994	H1N1 avian like	Slaughterhouse	0,4%	healthy	Guan, 1996
China	2006	H9N2	Clinical farm	1,9%	Flu+PRRsV	Yu, 2008
China	2005	Influenza A	Healthy Farm	1,0%	NR	Yu, 2007
China	2006	H1N1	Healthy Farm	0,2%	NR	Yu, 2007
China	2006	H3N2	Healthy Farm	0,8%	NR	Yu, 2007
China	2004	H9N2	Clinical Farm	4,2%	Respiratory	Cong, 2008
Thailand	2000	Influenza A	Clinical Farm	2,8%	Respiratory	Nakharuthai, 2008
Thailand	2000-2005	Influenza A	Healthy Farm	0,6%	healthy	Thawatsupha, 2003
China	1998-2000	Influenza A	Slaughterhouse	3,7%	healthy	Peiris, 2001
China	1998-2000	H9N2	Slaughterhouse	0,1%	healthy	Peiris, 2001
China	1998-2000	H3N2	Slaughterhouse	0,6%	healthy	Peiris, 2001
China	1998-2000	H1N1 classic	Slaughterhouse	3,1%	healthy	Peiris, 2001
China	2000-2003	Influenza A	Healthy Farm	5,8%		Li, 2004
China	2000-2003	H1N1	Healthy Farm	30,5%		Li, 2004
		H1N2	Healthy Farm	2,4%		Li, 2004
China	2000-2003	H3N2	Healthy Farm	54,9%		Li, 2004
China	2000-2003	H9N2	Healthy Farm	9,8%		Li, 2004
China	2003	H5N1	Healthy Farm	2,4%		Li, 2004
Thailand	NR	Influenza A	Clinical Farm		Respiratory	Chutinimitkul, 2008
Thailand	NR	H1N1	Clinical Farm		Respiratory	Chutinimitkul, 2008
Thailand	NR	H1N2	Clinical Farm		Respiratory	Chutinimitkul, 2008
Thailand	NR	H3N2	Clinical Farm		Respiratory	Chutinimitkul, 2008
US	2000	Influenza A	Clinical farm		Respiratory	Choi, 2002
US		H1N2	Clinical farm		Respiratory	Choi, 2004
US		H3N2	Clinical farm		Respiratory	Choi, 2005

NR = Non renseigné

Informations résumées par Carlène Trévennec

ANNEXE 3 : Districts et communes de la zone d'étude - Ha Tay et Bac Giang



(cartes créées grâce au logiciel Arcview GIS 3.2)

ANNEXE 4 : Fiche distribuée aux Vétérinaires

(version française, traduite en vietnamien)

DIAGNOSTIC DES MALADIES RESPIRATOIRES DES PORCS

Contactez nous si un éleveur vous contacte au sujet de symptômes respiratoires chez **plusieurs porcs** avec :

- ⇒ De la **toux** ou des **difficultés respiratoires** ou des **écoulements nasaux**.
- ⇒ Et de la **fièvre**.

Nous proposons une visite dans l'élevage pour faire un **diagnostic gratuit**, avec analyse sérologique concernant : *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hypopneumoniae*, *Streptococcus suis*, PRRsV, Influenza. Des prélèvements seront réalisés chez les porcs, et les volailles (prises de sang, et écouvillons).

Appelez-nous au : 0975191982 Oanh.

Cette démarche rentre dans le cadre d'une étude sur les virus Influenza porcins, en coopération avec les services vétérinaires. En plus des prélèvements, un questionnaire sera réalisé dans les élevages sur les pratiques et la présence de volailles.

ANNEXE 5 : Fiche distribuée aux éleveurs de porcs

(version française, traduite en vietnamien)

DIAGNOSTIC DES MALADIES RESPIRATOIRES DES PORCS

Contactez-nous si vous observez chez **plusieurs porcs** :

- ⇒ De la **toux** ou des **difficultés respiratoires** ou des **écoulements nasaux**.
- ⇒ Et de la **fièvre**.

Nous proposons une visite de votre élevage pour faire **un diagnostic gratuit de la maladie respiratoire des porcs** (Pasteurellose, Mycoplasmosse, PRRsV...). Des prélèvements seront réalisés chez les porcs et les volailles.

Appelez-nous au : 0975191982 Oanh.

Cette démarche rentre dans le cadre d'une étude sur les gripes porcines, en coopération avec les services vétérinaires.

ANNEXE 6 : Questionnaire

Date Ngày	Province Tỉnh	Commune Xã	N°fiche Bộ câu hỏi số

Village / Thôn :

Nom du propriétaire / Họ tên chủ hộ :

GPS

Latitude
Longitude

PRELEVEMENTS EFFECTUES / Số lượng mẫu được lấy như sau:

Nombre de porcs(tête)	Nombre de poule(tête)
Số mẫu lợn thịt:(con)	Số mẫu gà :(con)
Nombre de Truie(tête)	Nombre de canards.....(tête)
Số mẫu lợn nái :(con)	Số mẫu vịt :(con)
Nb de CB(tête)	Nombre d'autre (tête)
Số mẫu ngan :(con)	Số mẫu khác :(con)

1. COMMÉMORATIFS

- 1 Combien de porcs ont actuellement des problèmes respiratoires ?.....
- 2 Quelle catégorie d'âge est concernée ?
 - Porcelets
 - Porcs à l'engrais
 - Truies
 - Verrat
- 3 Combien y a-t-il eu de morts ?.....
- 4 Quels sont les symptômes observés ?
 - Toux,
 - Jetage,
 - Difficultés respiratoires (dyspnée),
 - Fièvre,
 - Abattement,
 - Autres symptômes.....
- 5 Quand sont apparus les 1ers symptômes respiratoires ?.....
- 6 D'après vous, l'apparition de la maladie a-t-elle été :
 - Brutale
 - Progressive
- 7 Avez-vous une idée de la maladie qu'ont les porcs ?
 - Oui
 - Non
- 8 Si oui, à quelle maladie pensez-vous ?.....

Observation sur place : *A remplir par l'équipe de prélèvements*

- 9 Nombre de porcs avec des problèmes respiratoires ?
 - Porcelets (moins de 3 semaines)
 - Porcs à l'engrais : 4 à 10 semaines.....
 - 11 à 17 semaines.....
 - 18 à 27 semaines.....
 - Truies.....
 - Verrat.....

- 10 Quels sont les symptômes observés ?
- Toux,
 - Jetage,
 - Difficultés respiratoires (dyspnée),
 - Fièvre,
 - Abattement,
 - Autres symptômes.....

2. STRUCTURE DE L'EXPLOITATION

Thông tin chung về nông hộ

1. Nombre de personnes travaillant dans l'élevage
Số lao động làm việc trong chăn nuôi

2. Autres activités (les 2 principales) :

Các hoạt động kinh tế khác (ghi 2 hoạt động chính)

- Agriculture (Nông nghiệp)
- Potager et/ou verger (Trồng rau và/hoặc cây ăn quả)
- Pisciculture (Thủy sản)
- Salariat (ouvrier, employé...) (Làm công ăn lương (công nhân, nhân viên,...))
- Artisanat (Thủ công nghiệp)
- Autres, lesquelles ? Hoạt động khác.....

Famille Lao động gia đình	
Employé Lao động ngoài	

3. ELEVAGE PORCIN Chăn nuôi lợn

PRODUCTION

Chăn nuôi

1. Quel est le type de production porcine ?

Nuôi lợn gì ?

- Naisseur (Lợn nái)
- Engrais (Lợn thịt)
- Naisseur-Engrais (Lợn nái-lợn thịt)
- Reproducteur (possède un verrat) (Lợn đực giống)

2. Part de l'élevage de porc dans les revenus de la famille :

Phần thu nhập từ nuôi lợn trong tổng các nguồn thu của gia đình

- Simple autoconsommation ou loisir (Nuôi lợn chỉ do thích hoặc phục vụ gia đình)
- 0 - 25%
- 25 - 50%
- 50 - 75%
- 75 - 100%

3. Quel est le nombre de porcs produit par an ?

Nuôi bao nhiêu con/năm ?

4. Combien de bandes de porcs sont produites par an ?.....

Bao nhiêu lứa/năm ?

5. Quel est le type racial des porcs à l'engrais?

Nuôi lợn thịt giống gì ?

- Local (giống nội)
- F1 (mère race locale) F1 (lợn mẹ giống nội)
- F2 (mère F1) F2 (lợn mẹ F1)
- F3 (mère F2) F3 (lợn mẹ F2)

6. Quel est le nombre d'animaux présents le jour de la visite ?

Có bao nhiêu lợn tại thời điểm điều tra ?

	Truies (Nái)	Porcelets (Lợn con)	Porcs à la croissance (Lợn gột)	Porcs à l'engrais (Lợn thịt)	Verrat (Lợn đực giống)
Nombre Số con					

7. Quelle est la durée moyenne du cycle de production ?
Thời gian trung bình cho chu kỳ chăn nuôi của các loại lợn là bao lâu ?

Durée Thời gian	Truies (an) Nái (năm)	Porcelets (semaine) Lợn con (tuần)	Porcs à la croissance (semaine) Lợn gột (tuần)	Porcs à l'engrais (mois) Lợn thịt (tháng)	Verrats (an) Lợn đực giống (năm)

ACHATS – VENTES

Mua – bán

8. L'éleveur achète-t-il des porcs ou des truies dans une autre ferme ou au marché ?
Người chăn nuôi mua lợn thịt hoặc lợn nái từ hộ chăn nuôi khác (ở chợ) không?

Oui – Non / Có - không

Si Non, aller directement à la question 10.

Nếu không, chuyển sang câu hỏi 10.

9. Comment se déroulent les introductions de porcs dans l'élevage?

Các thông tin về hoạt động mua lợn giống của nông hộ

Chú ý : chỉ điền vào câu hỏi này nếu nông hộ mua lợn giống từ bên ngoài)

	Porcs à la croissance Lợn nuôi gột	Porcs à l'engrais Lợn nuôi thịt	Truies Nái (thay nái)
Nombre d'animaux introduits dans l'élevage par an <i>Số lợn mua/năm</i>			
Nombre des bandes introduites par an <i>Số lứa mua/năm</i>			
Taille moyenne des bandes <i>Số con trung bình/ lứa</i>			
Age moyen à l'introduction (semaine) <i>Tuổi trung bình khi mua về nuôi (tuần)</i>			
Examen clinique à l'entrée dans l'élevage Kiểm tra lâm sàng khi mang về	Oui – Non Có-không	Oui – Non Có-không	Oui – Non Có-không
Quarantaine, isolement même courte durée <i>Cách li, nuôi riêng ngay cả trong thời gian ngắn</i>	Oui – Non Có-không	Oui – Non Có-không	Oui – Non Có-không
Origine principale des animaux <i>Mua lợn chủ yếu ở đâu ?</i>	<input type="checkbox"/> Marché (Chợ) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <i>Hộ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <i>Hộ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche <i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>	<input type="checkbox"/> Marché (Chợ) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <i>Hộ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <i>Hộ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche <i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>	<input type="checkbox"/> Marché (Chợ) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <i>Hộ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <i>Hộ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche <i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>
Lieu d'origine <i>Địa điểm mua</i>	<input type="checkbox"/> Village Thôn <input type="checkbox"/> Commune Xã <input type="checkbox"/> District Huyện <input type="checkbox"/> Province Tỉnh <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? Tỉnh khác, ghi rõ	<input type="checkbox"/> Village Thôn <input type="checkbox"/> Commune Xã <input type="checkbox"/> District Huyện <input type="checkbox"/> Province Tỉnh <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? Tỉnh khác, ghi rõ	<input type="checkbox"/> Village Thôn <input type="checkbox"/> Commune Xã <input type="checkbox"/> District Huyện <input type="checkbox"/> Province Tỉnh <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? Tỉnh khác, ghi rõ
Nom du vendeur (nom du marché ou de l'éleveur + adresse) <i>Tên người bán (tên chợ hoặc tên người chăn nuôi + địa chỉ)</i>			
Autre origine possible des animaux <i>Nơi mua khác</i>	<input type="checkbox"/> Marché (Chợ) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <i>Hộ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <i>Hộ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche	<input type="checkbox"/> Marché (Chợ) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <i>Hộ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <i>Hộ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche	<input type="checkbox"/> Marché (Chợ) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <i>Hộ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <i>Hộ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche

	<i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>	<i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>	<i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>
Lieu d'origine <i>Địa chỉ nơi mua</i>	<input type="checkbox"/> Village <i>Thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ</i>	<input type="checkbox"/> Village <i>Thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ</i>	<input type="checkbox"/> Village <i>Thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ</i>
Nom du vendeur (nom du marché ou de l'éleveur + adresse) <i>Tên người bán (tên chợ hoặc tên người chăn nuôi + địa chỉ)</i>			
Livraison par un collecteur (trader) <i>Người buôn giao tận nhà (trader)</i>	Oui – Non <i>Có - không</i>	Oui – Non <i>Có - không</i>	Oui – Non <i>Có – không</i>
Nom du collecteur principal <i>Tên người buôn hay mua</i>			

10. L'éleveur vend-il ses porcs ? *Oui – Non*

*Người chăn nuôi có bán lợn không ? **Có – không***

Si non, aller directement à la question 12

Nếu không, chuyển sang câu 12

11. Comment se déroulent les ventes ?

Hoạt động bán lợn tại nông hộ diễn ra thế nào ?

Vente Bán	Porcelets Lợn con	Porcs à la croisement lợn gột	Porcs à l'engrais Lợn thịt
Nombre d'animaux vendus par an <i>Số lợn bán/năm</i>			
Nombre des bandes vendues par an <i>Số lứa bán/năm</i>			
Taille moyenne des bandes <i>Số con trung bình/lứa</i>			
Age moyen à la vente <i>Tuổi trung bình khi bán</i>			
<i>Principal site de vente des animaux Nơi thường bán lợn</i>	<input type="checkbox"/> Sur place tại trại <input type="checkbox"/> Marché chợ <input type="checkbox"/> Abatteur lò mổ <input type="checkbox"/> Autre chỗ khác.....	<input type="checkbox"/> Sur place tại trại <input type="checkbox"/> Marché chợ <input type="checkbox"/> Abatteur lò mổ <input type="checkbox"/> Autre chỗ khác.....	<input type="checkbox"/> Sur place tại trại <input type="checkbox"/> Marché chợ <input type="checkbox"/> Abatteur lò mổ <input type="checkbox"/> Autre chỗ khác.....
<i>Personne principale de achat des animaux Người thường mua lợn</i>	<input type="checkbox"/> Petit collecteur lái buôn nhỏ <input type="checkbox"/> Grand collecteur lái buôn lớn <input type="checkbox"/> Autre, khác ghi rõ	<input type="checkbox"/> Petit collecteur lái buôn nhỏ <input type="checkbox"/> Grand collecteur lái buôn lớn <input type="checkbox"/> Autre, khác ghi rõ	<input type="checkbox"/> Petit collecteur lái buôn nhỏ <input type="checkbox"/> Grand collecteur lái buôn lớn <input type="checkbox"/> Autre, khác ghi rõ
Lieu des personnes achetées <i>Địa điểm người mua</i>	<input type="checkbox"/> Village cùng thôn <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ.....</i>	<input type="checkbox"/> Village cùng thôn <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ.....</i>	<input type="checkbox"/> Village cùng thôn <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ.....</i>
<i>Autre site de vente possible des animaux Nơi bán lợn khác</i>	<input type="checkbox"/> Sur place tại trại <input type="checkbox"/> Marché chợ <input type="checkbox"/> Abatteur lò mổ <input type="checkbox"/> Autre chỗ khác.....		<input type="checkbox"/> <i>Sur place tại chỗ</i> <input type="checkbox"/> <i>Marché chợ</i> <input type="checkbox"/> <i>Autre Ferme nông hộ khác</i> <input type="checkbox"/> <i>Abatteur chỗ giết mổ</i> <input type="checkbox"/> <i>Autre nơi khác.....</i>
<i>Lieu de la vente (autre que sur place) Địa điểm nơi bán (ngoài điểm bán tại chỗ)</i>	<input type="checkbox"/> Village <i>thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Province <i>huyện</i> <input type="checkbox"/> Autre Province <i>tỉnh khác</i>		<input type="checkbox"/> Village <i>thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Autre Province <i>tỉnh khác</i>
Qui emmène les animaux ? <i>Ai mang lợn đi bán</i>	<input type="checkbox"/> Eleveur người chăn nuôi <input type="checkbox"/> Transporteur người vận chuyển	<input type="checkbox"/> Eleveur người chăn nuôi <input type="checkbox"/> Transporteur người vận chuyển	<input type="checkbox"/> Eleveur người chăn nuôi <input type="checkbox"/> Transporteur người vận chuyển

Vente Bán	Porcelets Lợn con	Porcs à la croisement lợn gột	Porcs à l'engrais Lợn thịt
	<input type="checkbox"/> Collecteur lái buôn <input type="checkbox"/> Autre đối tượng khác	<input type="checkbox"/> Collecteur lái buôn <input type="checkbox"/> Autre đối tượng khác	<input type="checkbox"/> Collecteur lái buôn <input type="checkbox"/> Autre đối tượng khác
Le transporteur rentre-t-il dans l'élevage? Người vận chuyển quay về hộ chăn nuôi không ?	Oui – Non Có – không	Oui – Non Có – không	Oui – Non Có – không
Est-il possible que les animaux non vendus reviennent dans l'élevage ? Có khi nào số lợn không bán được lại được mang về không ?	Oui – Non Có – không	Oui – Non Có – không	Oui – Non Có – không

BÂTIMENT Chuồng trại

12. Les porcs sont-ils libres la journée?
Lợn được thả ra trong ngày không ?

- Jamais *Không bao giờ*
 Parfois *Thỉnh thoảng*
 Tous les jours *Ngày nào cũng thả*

Si pas de bâtiment, aller directement à la question 17.
Nếu không có chuồng nuôi, chuyển sang câu hỏi 17.

13. Comment sont les bâtiments ? (Cocher)
Kiểu chuồng trại (đánh dấu chéo)

	Truies Nái	Porcs à la croissance	Porcs à l'engrais Lợn thịt	Verrat Lợn đực giống
Pas de bâtiment <i>Không có chuồng</i>				
Bâtiment ouvert <i>Chuồng hở</i>				
Bâtiment fermé <i>Chuồng kín</i>				

14. Quel est le type de revêtement au sol ?
Nền chuồng bằng gì ?

	Truies Nái	Porcs à la croissance Lợn gột	Porcs à l'engrais Lợn thịt	Verrat Lợn đực
Terre đất				
Bois gỗ				
Béton bê tông				

15. Où se trouve le bâtiment Chuồng nuôi ở đâu ?

- Près du lieu d'habitation *Gần chỗ ở*
 Dans les champs *Ở ngoài đồng*

16. A quelle distance se trouve le cours d'eau le plus proche (canaux, rivières, étangs, rizières...)?
Chỗ gần nhất có nước cách bao xa (kênh, mương, sông, ao, ruộng,....) ?

ALIMENTATION THỨC ĂN CHO LỢN

17. De quels aliments la ration des porcs est elle constituée ?
Khẩu phần ăn của lợn bao gồm các loại thức ăn nào ?

Type d'aliment Loại thức ăn	Truies Nái (%)	Porcs à la croissance Lợn gột (%)	Porcs à l'engrais Lợn thịt (%)	Verrat Lợn đực (%)
Déchets ménagers <i>Thức ăn dư thừa của người</i>%%%%
Viande de porc (cadavre...) <i>Thịt lợn (thịt lợn chết...)</i>%%%%
Viande de volaille (cadavre...) <i>Thịt gia cầm (thịt gia cầm chết...)</i>%%%%
Œufs des volailles <i>Trứng gia cầm</i>%%%%
Culture, résidus de culture <i>Cây trồng và phế phẩm nông nghiệp</i>%%%%
Industriel (Pourcentage de la ration) <i>Thức ăn công nghiệp</i>%%%%

18. D'où provient l'eau d'abreuvement des porcs ?

Nước dùng của lợn lấy từ đâu ?

- Eau de la rivière et des canaux (*nước sông hoặc nước kênh mương*)
- Eau du puits ou de la pompe (*nước giếng hoặc nước bơm*)
- Eau du réseau d'eau potable (*nước từ hệ thống nước máy*)

VERRAT LỢN ĐỰC GIỐNG

19. L'éleveur utilise-t-il un verrat pour la reproduction ? **Oui - Non**

Người chăn nuôi có dùng lợn đực làm giống không ? Có - không

Si Non, aller directement à la question 22. *Nếu không, chuyển sang câu 22.*

20. Si présence de verrat dans l'élevage / *Nếu hộ chăn nuôi có lợn đực giống*

Réponse	
Le verrat est-il prêté aux autres élevages <i>Có cho hộ khác mượn lợn đực không ?</i>	Oui – Non Có-không
Si oui, à quels élevages (Village, Commune, District, Province, Autre Province) <i>Nếu có, cho hộ nào mượn (thôn, xã, huyện, tỉnh, tỉnh khác)</i>	

21. Si absence de verrat dans l'élevage / *Nếu hộ chăn nuôi không có lợn đực giống*

Réponse	
Utilisation de verrats prêtés par d'autres élevages <i>Có mượn lợn đực giống của hộ khác không</i>	Oui – Non / Có - không
Nombre de fois par an <i>Số lần mượn/năm</i>	
Nombre de verrat introduit à chaque fois <i>Số lợn đực mượn về mỗi lần</i>	
Examen clinique à l'entrée dans l'élevage <i>Có kiểm tra qua lợn trước khi cho vào chuồng không</i>	Oui – Non / Có - Không
Quarantaine, isolement même courte durée Si oui, combien de temps ? <i>Cách li, nuôi riêng (thậm chí chỉ trong thời gian ngắn)</i> <i>Nếu có, bao lâu ?</i>	Oui – Non / Có - không jours / ngày

22. L'éleveur utilise-t-il l'insémination artificielle ? **Oui – Non**

Hộ chăn nuôi có thụ tinh nhân tạo cho lợn không ? **Có – không**

Si Non, aller directement à la question 24.

Nếu không, chuyển sang câu hỏi 24

23. Insémination artificielle (IA)

Thụ tinh nhân tạo (IA)

Réponse Trả lời	
Qui pratique l'IA ? Ai thụ tinh nhân tạo cho ?	<input type="checkbox"/> Eleveur / Người chăn nuôi <input type="checkbox"/> Vétérinaire thú y <input type="checkbox"/> Technicien Inséminateur <input type="checkbox"/> Người chuyên thụ tinh nhân tạo
Nombre de fois par an (nombre moyen de venues par an) <i>Số lần/năm (số lần đến nông hộ/năm)</i>	
Nombre de truies inséminées à chaque fois <i>Số lợn nái được thụ tinh nhân tạo mỗi lần</i>	
Comment sont gérées les truies vides ? Xử lý như thế nào đối với nái thụ tinh không đậu thai ?	<input type="checkbox"/> Réforme loại thải <input type="checkbox"/> Nouvelle IA thụ tinh nhân tạo lại <input type="checkbox"/> Verrat Phối trực tiếp <input type="checkbox"/> Attente d'un autre cycle đợi thêm một chu kỳ nữa

REFORME LOẠI THẢI

24. Que deviennent les animaux non productifs ?

Xử lý như thế nào đối với lợn có năng suất sinh sản kém ?

Vente	Truies	Verrats
Nombre d'animaux réformés (ou sortis du troupeau) par an <i>Số lợn loại thải (hoặc không xuất hiện trong</i>		

Vente	Truies	Verrats
đàn/năm		
Age moyen à la réforme (ou à la sortie) Tuổi trung bình loại thải (hoặc không xuất hiện trong đàn)		
Principal mode de sortie Lý do loại khỏi đàn	<input type="checkbox"/> Mort naturelle Chết tự nhiên <input type="checkbox"/> Enlèvement par un abatteur Bán cho người giết mổ <input type="checkbox"/> Abattage et consommation sur place Nông hộ giết mổ ăn <input type="checkbox"/> Autre...cách khác	<input type="checkbox"/> Mort naturelle Chết tự nhiên <input type="checkbox"/> Enlèvement par un abatteur Bán cho người giết mổ <input type="checkbox"/> Abattage et consommation sur place Nông hộ giết mổ ăn <input type="checkbox"/> Autre...cách khác.....

MALADIES BỆNH DỊCH

25. Maladies respiratoires Bệnh hô hấp

	Le jour de la visite Thời điểm điều tra	Dans l'année Trong cả năm
Les porcs à l'engrais sont ils atteints d'un syndrome respiratoire contagieux ? <i>Lợn thịt có mắc các triệu chứng hô hấp lây nhiễm không ?</i>	Oui – non Có – không	Oui – non Có – không
Quelle proportion de malades ? <i>Tỉ lệ con bị bệnh</i>		
Quelle proportion de morts ? <i>Tỉ lệ con chết</i>		

26. Quelle est la saison des maladies respiratoires des porcs à l'engrais ?

Lợn thịt thường hay mắc bệnh hô hấp vào mùa nào ?

Jan tháng 1	Fev tháng 2	Mar tháng 3	Avr tháng 4	Mai tháng 5	Juin tháng 6
Juil tháng 7	Aou tháng 8	Sep tháng 9	Oct tháng 10	Nov tháng 11	Dec tháng 12

27. L'élevage a-t-il été atteint de maladies contagieuses cette année (excepté les maladies néonatales)

Năm nay, gia đình có lợn bị mắc bệnh lây nhiễm không ? (trừ các bệnh của lợn con)

- PRRSv Bệnh tai xanh
- Influenza porcine Cúm ở lợn
- Mycoplasmes Vi khuẩn gây bệnh viêm phổi
- Pasteurellose Tụ huyết trùng
- Peste porcine classique Bệnh dịch tả lợn
- Salmonellose Phô thương hàn
- Autres Bệnh khác

28. Comment a été réalisé le diagnostic ? /Việc chuẩn đoán bệnh được thực hiện bởi ai ?

- Par l'éleveur Người chăn nuôi
- Clinique uniquement, par les SV / Cơ quan thú y chỉ chuẩn đoán lâm sàng
- Laboratoire Phòng thí nghiệm

29. L'éleveur utilise-t-il un thermomètre ? Oui – Non

Người chăn nuôi có sử dụng cặp nhiệt độ không ? Có – không

30. Les porcs et les truies sont-ils vaccinés ?

Lợn thịt và lợn nái có được tiêm vaccin không ?

- Aucune vaccination không tiêm vaccin nào
- PRRSv Bệnh tai xanh
- Influenza porcine cúm ở lợn
- Mycoplasmes Bệnh sưng
- Pasteurellose Bệnh tụ huyết trùng
- Peste porcine classique Bệnh dịch tả lợn
- Autres bệnh khác

31. Quand ont lieu les vaccinations ? Tiêm phòng khi nào ?

4. ELEVAGE AVICOLE CHĂN NUÔI GIA CẦM

1. Y a-t-il des volailles dans l'élevage ? Oui – Non

Nông hộ có chăn nuôi gia cầm không ? Có – không

Si Non, passer directement à la partie 5.

Nếu không, chuyển sang câu 5.

2. Types de production et quantités

Các loại gia cầm được nuôi và số lượng

Type loại gia cầm nuôi	Production annuelle số con/năm	Nb de bandes/an số lứa/năm	Nombre le jour de la visite số con thời điểm điều tra
Basse Cour (< 50 par bande, tous âges) <i>Chăn nuôi tận dụng (<50 con /lứa, đủ mọi lứa tuổi)</i>	-	-	
Poulets Chair Gà thịt			
Poules pondeuses Gà đẻ			
Canards chair Vịt thịt			
Canard pondeur Vịt đẻ			
Canard Barbarie Ngan			
Reproducteurs Gia cầm giống (đẻ)			

3. L'éleveur achète-t-il des volailles dans une autre ferme ou au marché ? **Oui – Non**

Người chăn nuôi có mua gia cầm từ các hộ chăn nuôi khác hoặc ở chợ không ? Có – không

Si Non, aller directement à la question 5 *Nếu không, chuyển sang câu hỏi 5*

4. Comment se déroulent les introductions de volailles dans l'élevage?

Hoạt động mua gia cầm diễn ra như thế nào tại nông hộ ?

	Activité 1 Loại gia cầm 1	Activité 2..... Loại gia cầm 2
Nombre d'animaux introduits par an <i>Số gia cầm mua về/năm</i>		
Nombre de lots introduits par an <i>Số lứa gia cầm nhập về/năm</i>		
Taille moyenne des lots introduits <i>Số con trung bình/ lứa nhập về</i>		
Age moyen à l'introduction (jour) <i>Tuổi trung bình mua về (ngày)</i>		
Examen clinique à l'entrée dans l'élevage <i>Kiểm tra lâm sàng khi đưa gia cầm về</i>	Oui – Non <i>Có – không</i>	Oui – Non Có – không
Quarantaine, isolement même courte durée (sauf DOC) <i>Cách li, nuôi riêng (thậm chí chỉ trong thời gian ngắn) trừ gia cầm con</i>	Oui – Non <i>Có – không</i>	Oui – Non Có – không
Origine principale des animaux <i>Mua gia cầm chủ yếu ở đâu</i>	<input type="checkbox"/> Marché (<i>Chợ</i>) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <input type="checkbox"/> <i>Hệ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <input type="checkbox"/> <i>Hệ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <input type="checkbox"/> <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche <input type="checkbox"/> <i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>	<input type="checkbox"/> Marché (<i>Chợ</i>) <input type="checkbox"/> Ferme Commerciale <input type="checkbox"/> <i>Hệ thương mại</i> <input type="checkbox"/> Autre Ferme <input type="checkbox"/> <i>Hệ chăn nuôi khác</i> <input type="checkbox"/> Compagnie <input type="checkbox"/> <i>Công ty</i> <input type="checkbox"/> Centre, institut de recherche <input type="checkbox"/> <i>Trung tâm, viện nghiên cứu</i>
Lieu d'origine <i>Địa điểm mua gia cầm</i>	<input type="checkbox"/> Village <i>Thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ</i>	<input type="checkbox"/> Village <i>Thôn</i> <input type="checkbox"/> Commune <i>Xã</i> <input type="checkbox"/> District <i>Huyện</i> <input type="checkbox"/> Province <i>Tỉnh</i> <input type="checkbox"/> Autre Province, Ou ? <i>Tỉnh khác, ghi rõ</i>
Nom du vendeur (nom du marché ou de l'éleveur + adresse) <i>Tên người bán (tên chợ hoặc tên người chăn nuôi + địa chỉ)</i>		

5. Les volailles sont-elles libres la journée? *Gia cầm có được thả trong ngày không ?*

- Jamais *không bao giờ*
 Parfois *đôi khi*
 Tous les jours *tất cả các ngày*

6. Les volailles ont-elles accès à un cours d'eau, un étang ou une rizière ? **Oui – Non**

Gia cầm có được tiếp cận với nguồn nước, ao hoặc ruộng không ? Có - không

7. Les volailles ont-elles accès au bâtiment des porcs ? **Oui – Non**

Gia cầm có tiếp xúc được với chuồng trại của lợn không ? Có – không

8. Si oui, y-a-t-il des nids pour la volaille dans les bâtiments des porcs? **Oui – Non**

Nếu có, trong chuồng lợn có chỗ trú cho gia cầm không ? Có – không

9. Y a-t-il des volailles dans le bâtiment des porcs le jour de la visite ? **Oui – Non**
 Có gia cầm trong chuồng lợn tại thời điểm điều tra không ? **Có – không**

10. Comment sont les bâtiments des volailles? (Cocher)
 Tình trạng chuồng gia cầm như thế nào (đánh dấu chéo)

	Activité 1 Loại gia cầm 1	Activité 2 Loại gia cầm 2
Pas de bâtiment <i>Không có chuồng nuôi</i>		
Bâtiment ouvert <i>Chuồng mở</i>		
Bâtiment fermé <i>Chuồng kín</i>		

Si pas de bâtiment, aller directement à la question 12.
 Nếu không có chuồng, chuyển sang câu hỏi 12.

11. Détails du bâtiment *Thông tin về chuồng nuôi*

	Activité 1 Loại gia cầm 1	Activité 2 Loại gia cầm 2
Distance du cours d'eau (canaux, rivières, étangs, rizières...) <i>Khoảng cách đến chỗ có nước (kênh, mương, sông ngòi, ruộng, ...)</i>mm
Distance du bâtiment des porcs <i>Khoảng cách đến chuồng nuôi lợn</i>mm

12. Maladies contagieuses *Các bệnh lây nhiễm*

	Le jour de la visite Thời điểm điều tra	Dans l'année Trong cả năm
Les volailles ont-elles des signes cliniques suivant : mortalité brutale, baisse de consommation, baisse de production, diarrhées, ou troubles nerveux. <i>Gia cầm có các triệu chứng lâm sàng như sau : tỉ lệ chết cao, kém ăn, kém đẻ, ỉa chảy, hoặc rối loạn thần kinh</i>	Oui – non Có – không	Oui – non Có – không
Quelle proportion de malades ? <i>Tỉ lệ con ốm là bao nhiêu ?</i>		
Quelle proportion de morts ? <i>Tỉ lệ con chết là bao nhiêu ?</i>		

13. L'élevage a-t-il été déclaré atteint d'AI ces dernières années ? **Oui – non**
 Hộ chăn nuôi có khai báo bị cúm gia cầm trong những năm vừa qua không ? **Có – không**

14. Si oui, quand ? / *Nếu có, khi nào*

15. Les volailles sont-elles vaccinées contre AI ? **Oui – non**
 Gia cầm có được tiêm vaccin phòng bệnh cúm gia cầm không ? **Có – không**

Si oui, date de la dernière vaccination :
 Nếu có, ngày tiêm của đợt tiêm gần nhất :

16. Quelle est la saison des maladies des volailles (signes cliniques suivant : mortalité brutale, baisse de consommation, baisse de production, diarrhées, ou troubles nerveux) ?
 Các bệnh gia cầm thường xuất hiện nhiều vào mùa nào (tỉ lệ chết cao, kém ăn, kém đẻ, ỉa chảy, hoặc rối loạn thần kinh)?

Jan tháng 1	Fev tháng 2	Mar tháng 3	Avr tháng 4	Mai tháng 5	Juin tháng 6
Juil tháng 7	Aou tháng 8	Sep tháng 9	Oct tháng 10	Nov tháng 11	Dec tháng 12

17. Les volailles sont-elles vaccinées contre la maladie de Newcastle ? **Oui – non**
 Si oui, date de la dernière vaccination :

18. Y a-t-il des volailles dans l'élevage voisin mitoyen? **Oui – Non**
 Hộ chăn nuôi giáp ranh có nuôi gia cầm không ? **Có-không**

Si Non, passer directement au paragraphe Biosécurité et Hygiène
 Nếu không, chuyển sang phần An toàn sinh học và Vệ sinh

19. Types de production et quantités de l'élevage voisin mitoyen
 Loại gia cầm và số lượng các loại gia cầm của hộ chăn nuôi giáp ranh

Type Loại	Cocher Đấu chéo
Basse Cour (< 50 par bande, tous âges) <i>Chăn nuôi tận dụng (<50 con/lúa, mọi lứa tuổi)</i>	
Poulets Chair Gà thịt	
Poules pondeuses Gà đẻ	

Canards chair <i>Vịt thịt</i>	
Canard pondeur <i>Vịt đẻ</i>	
Canard Barbarie <i>Ngan</i>	
Reproducteurs <i>Gia cầm sinh sản (giống)</i>	

5. BIOSECURITE et HYGIENE/AN TOÀN SINH HỌC VÀ VỆ SINH

Quelles sont les mesures de biosécurité adoptées ?

Áp dụng các biện pháp an toàn sinh học nào ?

Mesure de biosécurité et d'hygiène générales <i>Biện pháp an toàn sinh học và vệ sinh</i>	Porcs <i>Lợn</i>	Volailles <i>Gia cầm</i>
Fréquence de nettoyage des bâtiments <i>Tần số vệ sinh chuồng trại</i>	<input type="checkbox"/> Tous les jours <i>tất cả các ngày</i> <input type="checkbox"/> Toutes les semaines <i>tất cả các tuần</i> <input type="checkbox"/> Entre les bandes seulement <i>chỉ giữa các lứa nuôi</i> <input type="checkbox"/> Jamais <i>Không bao giờ</i>	<input type="checkbox"/> Tous les jours <i>tất cả các ngày</i> <input type="checkbox"/> Toutes les semaines <i>tất cả các tuần</i> <input type="checkbox"/> Entre les bandes seulement <i>chỉ giữa các lứa nuôi</i> <input type="checkbox"/> Jamais <i>Không bao giờ</i>
Désinfection entre les bandes <i>Khử trùng giữa các lứa nuôi</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
Habillement spécial pour entrer dans le bâtiment (chaussures et vêtement) <i>Có quần áo riêng khi vào chuồng nuôi (giày và quần áo)</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
La main d'œuvre extérieure entre dans l'élevage (pendant les achats, ventes, réformes ou l'insémination....) ? Lao động bên ngoài có vào trong hộ chăn nuôi (trong lúc bán, mua, loại thải hoặc thu tinh ..) không ?	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
Si oui, porte-t-elle un habillement spécial pour rentrer dans l'élevage? Si oui, désinfection des mains et des chaussures ? Nếu có, người này có quần áo riêng để vào không ? Nếu có, có rửa tay và giày không ?	Oui – Non <i>Có-không</i> Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i> Oui – Non <i>Có-không</i>
Echange de matériel entre les élevages <i>Trao đổi các dụng cụ giữa các hộ chăn nuôi</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
Désinfection du matériel d'élevage <i>Khử trùng các dụng cụ chăn nuôi</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
Pédiluve à l'entrée de l'élevage (utilisé) <i>Qua hố sát trùng trước khi vào chuồng</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
Désinfection des véhicules à l'entrée dans l'élevage <i>Khử trùng phương tiện đi lại trước khi vào hộ chăn nuôi</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>	Oui – Non <i>Có-không</i>
Quel produit désinfectant ? <i>Loại thuốc sát trùng nào ?</i>		
Gestion des cadavres <i>Xử lý gia cầm chết</i>	<input type="checkbox"/> Brulés <i>đốt</i> <input type="checkbox"/> Enterrés <i>chôn</i> <input type="checkbox"/> Equarrissage <i>xử lí xác chết để thu lợi kinh tế</i> <input type="checkbox"/> Donnés aux porcs <i>cho lợn ăn</i> <input type="checkbox"/> Autre <i>cách khác</i>	<input type="checkbox"/> Brulés <i>đốt</i> <input type="checkbox"/> Enterrés <i>chôn</i> <input type="checkbox"/> Equarrissage <i>xử lí xác chết để thu lợi kinh tế</i> <input type="checkbox"/> Donnés aux porcs <i>cho lợn ăn</i> <input type="checkbox"/> Autre <i>cách khác</i> (Eufs abîmés? <i>Trứng hỏng ?</i>

ANNEXE 7 : Composition du milieu de transport pour écouvillons

PBS x 5 Stock

NaCL	40g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	14,5g
KH ₂ PO ₄	1g
KCL	1g
H ₂ O	1L

Antibiotiques

Pénicilline G	2 x 10 ⁶ U/L
Streptomycine	200 mg/L
Polymyxine B	2 x 10 ⁶ U/L
Gentamicine	250 mg/L
Nystatin	0,5 x 10 ⁶ U/L
Ofloxacin HCl	60 mg/L
Sulfaméthaxazole	0,2 g/L
Amphotéricine B	1 mg/L
Kanamycine	100 mg/L

ANNEXE 8 : Protocoles d'extraction d'ARN et de RRT-PCR

Purpose: RNA extraction

Method: Qiagen RNeasy Mini Kit

Materials

Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen No.74106)

2-mercaptoethanol(SIGMA M6250)

Ethanol(70%)

Preparation

1. Prepare Buffer RLT with 2-mercaptoethanol by adding 1/100 volume of 2-mercaptoethanol to buffer RLT.

Procedures

Lysis of samples

2. Add 600 ul of Buffer RLT (added with 2-mercaptoethanol) to 1.5ml tubes.
3. Transfer 100-200 ul of sample homogenate to the tube.
4. Vortex for 15 sec, and spin down.
5. Add 600 ul of 70% ethanol (96-100%), vortex for 15 sec, and spin down.
6. Centrifuge for 5 min at 5000g at room temperature.

Spin column

7. Transfer 500ul of the lysed sample to a spin column with a collection tube.
8. Centrifuge for 1 min at 8000g at room temperature.
9. Repeat step 7-8.

Washing 1

10. Add 700ul of RW1 buffer to the spin column with a collection tube.
11. Centrifuge for 1 min at 8000 at room temperature.
12. Place the column in a new clean collection tube.

Washing 2

13. Add 500ul RPE buffer(added 220ml ethanol 96-100%) to the spin column.
14. Centrifuge for 1 min at 8000g at room temperature.
15. Discard the flow through from the collection tube.
16. Add 500ul RPE buffer to the spin column.
17. Centrifuge for 2 min at 20000g (14000rpm)

Elution of RNA

18. Place the spin column in 1,5ml tube.
19. Add 50 AE buffer into the column.
20. Incubate at room temperature for 1 min.
21. Centrifuge for 1 minute at 6000g (8000rpm).
22. Transfer eluted RNA solution to a new 1.5ml tube.

Method: Real-time One-step RT-PCR with Taqman Probe

Virus: Avian Influenza Virus

Gene: M-2, M-4, H5-3S, H5-2, N1

Materials:

Qiagen One-step RT-PCR Kit; Qiagen Cat No.210210 (100 rxn)

MgCl₂ (25mM); Promega A3513

Primers and probes: see Table 1 in Annex.

Procedure:

1. Prepare the master mix as follows.

Reagent	Volume (ul)	
	M2, M4, H5-2, N1	H5-3S
DW	10.5	10.0
5x Buffer	5.0	5.0
MgCl ₂ (25mM)	1.2	1.2
dNTP (10mM each)	0.8	0.8
Primer forward (20uM)	0.5	0.5
Primer reverse (20uM)	0.5	0.5
Probe-1 (6uM)	0.5	0.5
Probe-2 (6uM)		0.5
Enzyme mix	1.0	1.0

2. Dispense 20 ul of master mix to PCR tubes.
3. Add 5 ul of sample RNA to tubes.
4. Centrifuge tubes, and place them to the Real-time PCR machine.
*(For Biorad remember to choose TET for H5 PPP)
5. Run the program as follows.
 - a) 50°C for 30 min, 95°C for 15 min
 - b) 40 cycles of the following program

Platform	Target gene	Denature	Annealing and Extension
SmartCycler	M, H5, N1	95C for 2sec	57C for 50sec
BioRad iQ5	M, H5, N1	95C for 10sec	57C for 50sec

6. Read at the annealing steps.

Interpretation of results:

Test is valid when:

Positive control gives Ct of expected value (± 2)

Negative control gives no Ct value

Sample is positive; when sample RNA gives Ct value ≤ 35

Sample is suspect positive; when sample RNA gives Ct value > 35

Sample is negative; when sample RNA gives no Ct value

Table 1. List of Primers and Probes

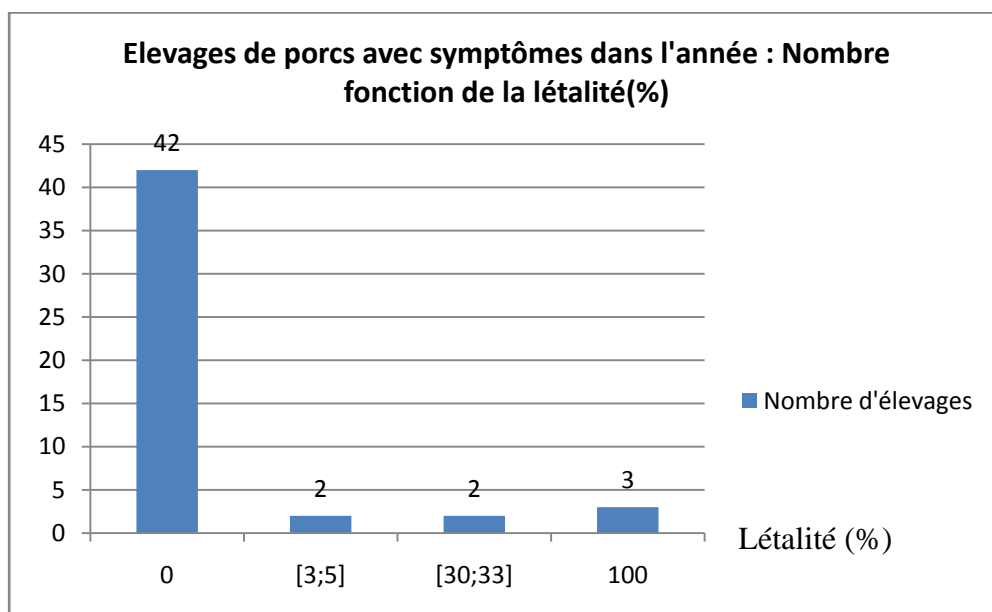
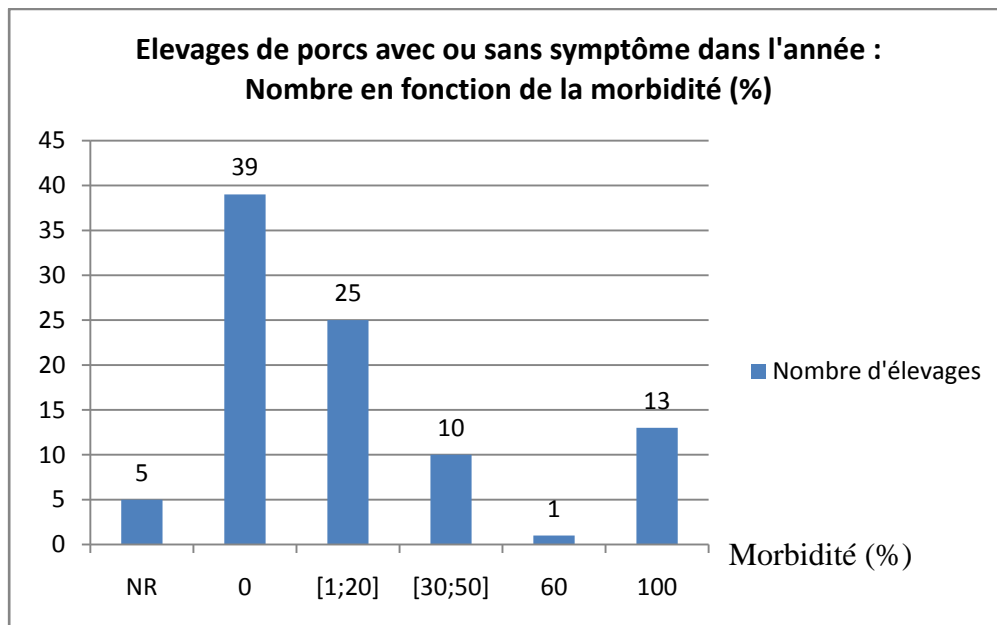
Target	Set No.	Primer/ Probe	Sequence (5'-3')	Modification	
				5'	3'
M-2 (TDH)	4P	Probe	TCA ggC CCC CTC AAA gCC gA	FAM	BHQ1
	4F	Forward	AgA TgA gTC TTC TAA CCg Agg TCg	None	None
	4R	Reverse	TgC AAA AAC ATC TTC AAg TCT CTg	None	None
M-4 (CDC)	4P	Probe	TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG	FAM	BHQ1
	4F	Forward	CATGGARTGGCTAAAGACAAGACC	None	None
	4R	Reverse	AGGGCATTGTTGGACAAAKCGTCTA	None	None
H5-3S (USDA+AAHL)	1P	Probe	TCA ACA gTg gCg AgT TCC CTA gCA	TET	BHQ1
	1P(2.3)	Probe	TCAACAGTTGCGAGTTCTCTAGCA	TET	BHQ1
	3F	Forward	ACg TAT gAC TAC CCg CAg TAT TCA	None	None
	1R	Reverse	AgA CCA gCT ACC ATg ATT gC	None	None
H5-2 (HK1)	8P	Probe	AgA Agg CCA ATC CAg TCA ATg ACC TCT gTT A	TET	BHQ1
	8F	Forward	TgC Cgg AAT ggT CTT ACA TAg Tg	None	None
	8R	Reverse	TCT TCA TAg TCA TTg AAA TCC CCT g	None	None
N1 (TDH)	13P	Probe	CAC TAA TTC CAg gAg Cgg C	FAM	BHQ1
	13F	Forward	Tgg ATC ggg AgA ACC AAA	None	None
	13R	Reverse	Tgg ATC CCA AAT CAT TTC AA	None	None

- (1) H5-3S:; USDA protocol and AAHL protocol
(2) H5-2: EID Vol. 11, No. 8, 2005, 1303-05 "Influenza A H5N1 detection"
(3) M-2, N1: In-house protocol developed by tropical disease hospital in HCMC
(4) M-4: CDC protocol

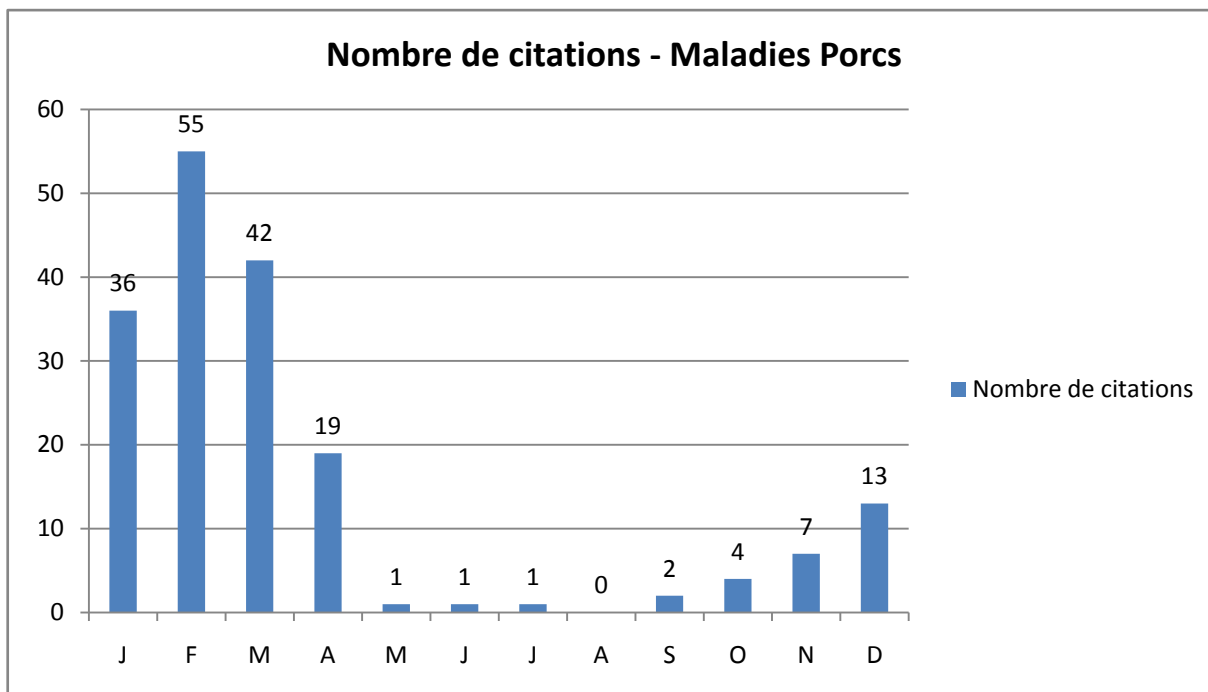
ANNEXE 9 : Déclaration de maladies contagieuses à manifestations respiratoires dans l'année

Nombre d'élevages	Nombre d'élevages	Diagnostic	Maladies dans l'année
39 élevages n'ayant pas déclaré de maladies à manifestations respiratoires dans l'année	12	Aucune réponse	Non
	1	Eleveur	Non
	16	Services Vétérinaires (clinique uniquement)	Non
	10	Eleveur et/ou Services Vétérinaires (clinique)	Salmonelle
9 élevages avec maladie, diagnostiquée par l'éleveur	1	Eleveur	PRRsV
	5	Eleveur	Mycoplasme
	1	Eleveur	Mycoplasme + Peste porcine classique
	2	Eleveur	Mycoplasme + Pasteurelle
45 élevages avec maladie, diagnostic clinique par les services vétérinaires	2	Services Vétérinaires (clinique uniquement)	Pasteurelle
	17	Services Vétérinaires (clinique uniquement)	PRRsV
	22	Services Vétérinaires (clinique uniquement)	Mycoplasme
	3	Services Vétérinaires (clinique uniquement)	Mycoplasme + Pasteurelle
	1	Services Vétérinaires (clinique uniquement)	PRRsV + Pasteurelle

ANNEXE 10 : Morbidité et Létalité chez les porcs dans l'année

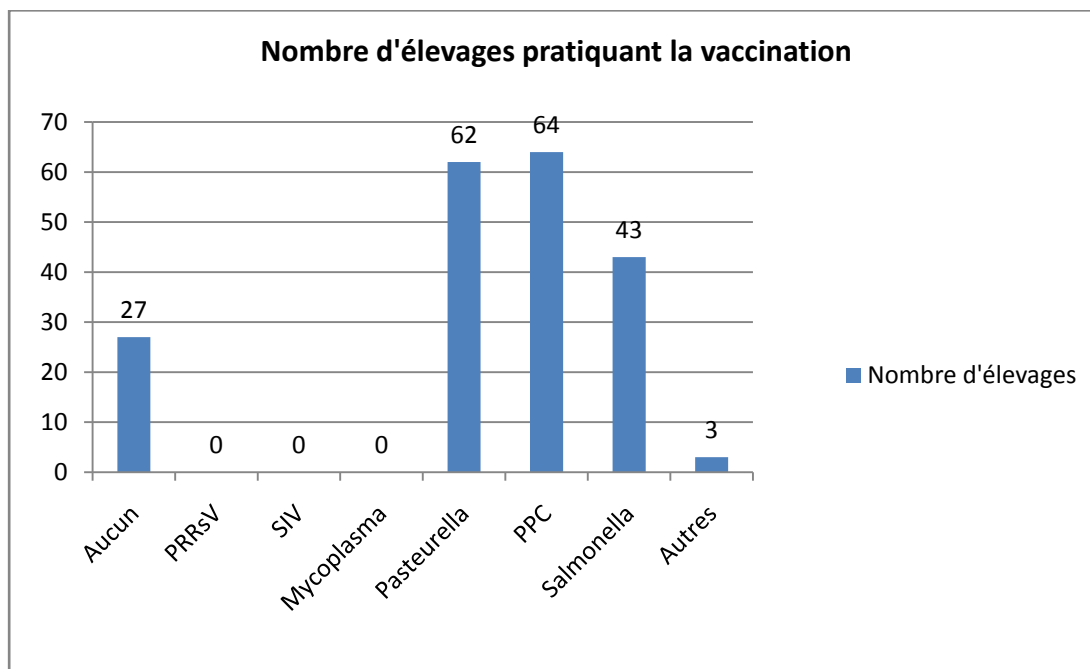


ANNEXE 11 : Période des maladies respiratoires porcines

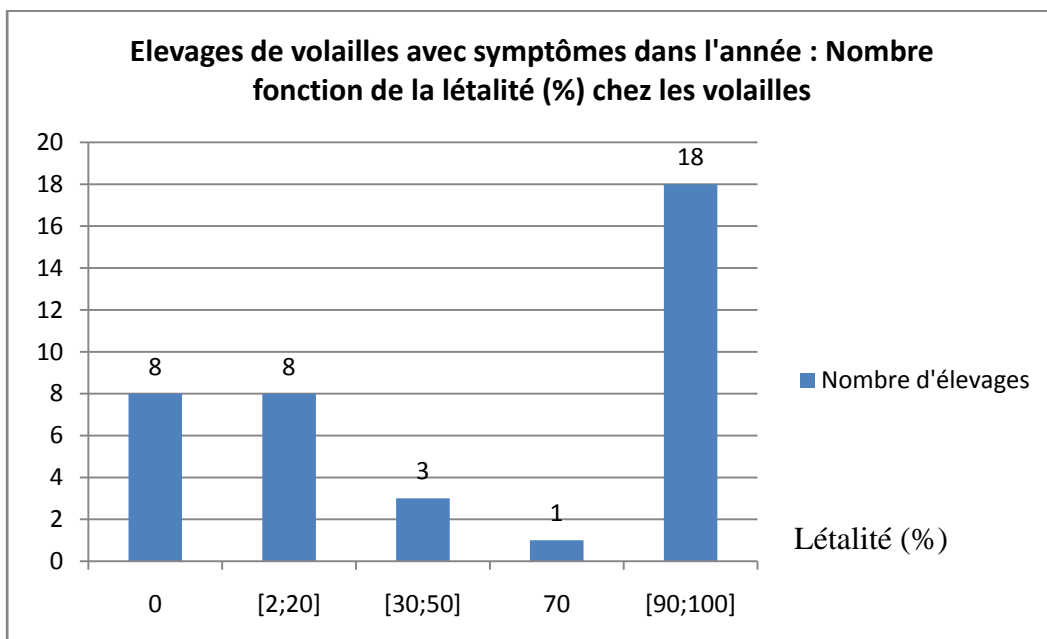
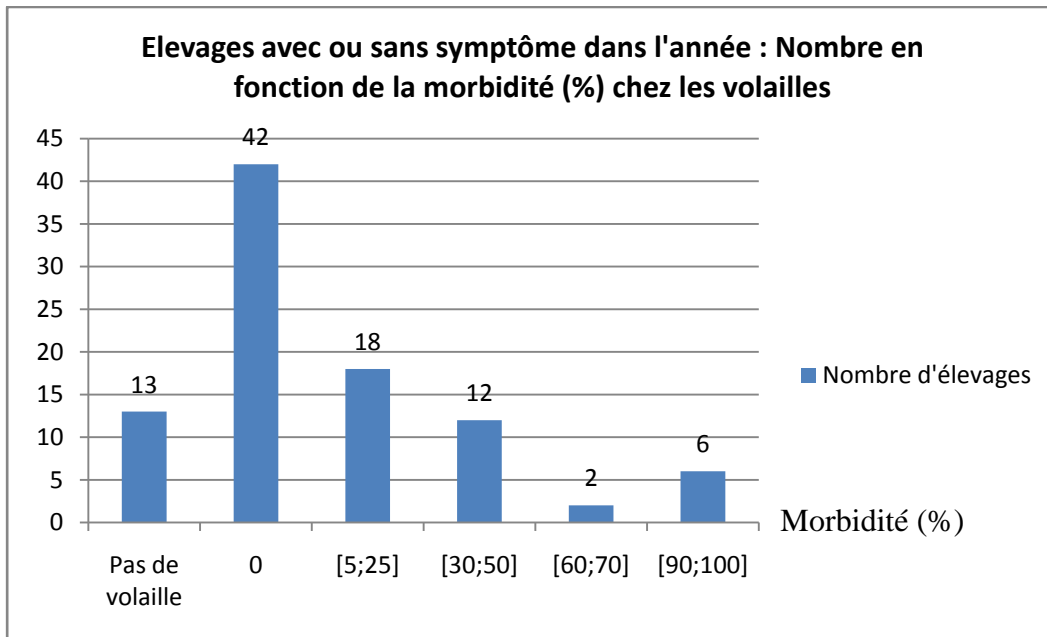


Nombre de fois que les différents mois ont été cités par les éleveurs comme étant propices aux maladies respiratoires porcines.

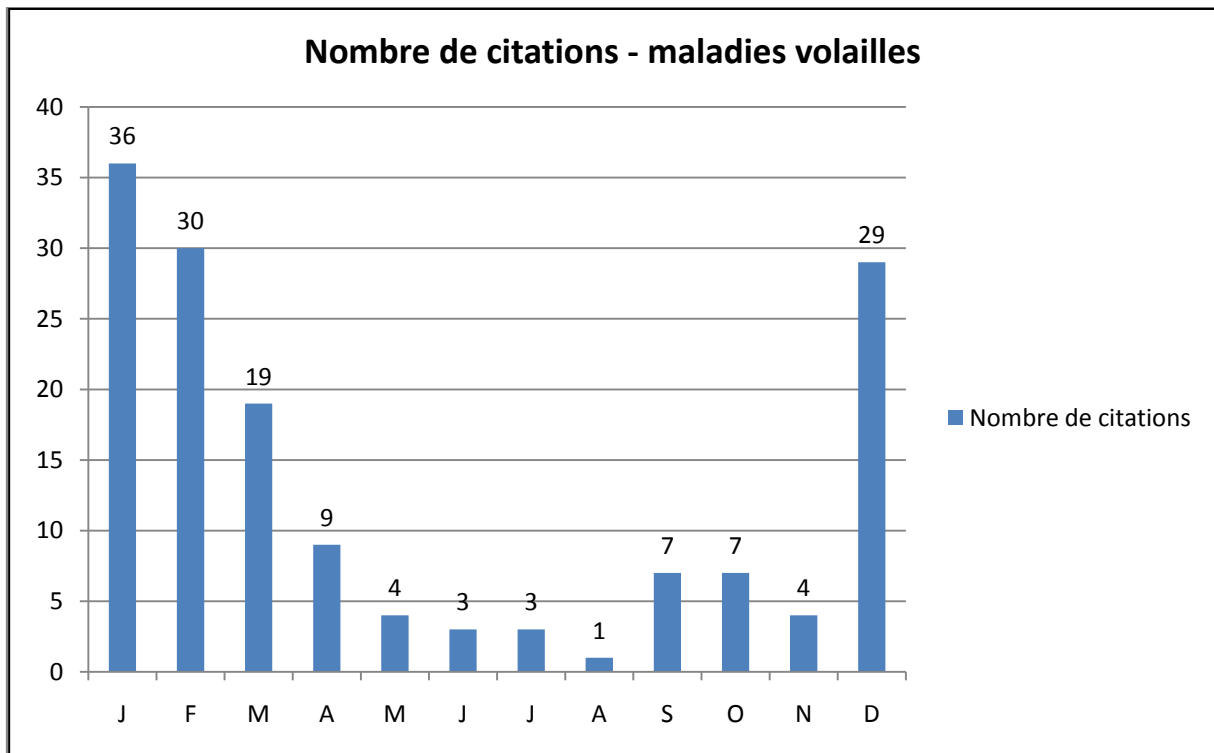
ANNEXE 12 : Vaccinations des porcs pratiquées dans les élevages



ANNEXE 13 : Morbidité et Létalité chez les volailles dans l'année



ANNEXE 14 : Période des syndromes grippaux chez les volailles



ANNEXE 15 : Vaccinations Influenza et maladie de Newcastle pratiquées chez les volailles

Vaccins utilisés	Nombre d'élevages
Newcastle et Influenza A H5	16
Influenza A H5 uniquement	22
Newcastle uniquement	2
Aucun	40

Année de vaccination Influenza A H5	Nombre d'élevages
2009	18
2008	17
2007	1
Non Renseigné	2

ANNEXE 16 : Symptômes déclarés vs observés pour les fermes avec symptômes

Symptôme fièvre	Nombre d'élevages
Déclaré + Observé	16
Déclaré + Non Observé	5
Non Déclaré + Observé	1
Non Déclaré + Non Observé	6

Symptômes déclarés	Nombre d'élevages
Respiratoires uniquement	4
Fièvre / Abattement uniquement	7
Respiratoires et Fièvre / Abattement	17
Anorexie en plus d'autres symptômes	3

Symptômes observés	Nombre d'élevages
Respiratoires uniquement	1
Fièvre / Abattement uniquement	15
Respiratoires et Fièvre / Abattement	6
Anorexie	0
Aucun	6

ANNEXE 17 : Maladies citées dans les fermes avec symptômes

Catégories concernées	Nombre d'élevages
Porcelets	6
Porcs à l'engrais	26
Truies	9
Plusieurs catégories	10
Une catégorie (engrais)	17
Non Renseigné	1

Catégories présentant des symptômes respiratoires

Nombre de morts	Nombre d'élevages
0	17
1	7
4	1
5	2
12	1

Suspicion	Nombre d'élevages
Non	11
Mycoplasmosse	9
PRRsV	8

Nombre de porcs (toutes categories) morts

Maladies suspectées par les éleveurs

ANNEXE 18 : Délai entre l'apparition des symptômes et les prélèvements

