THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Infectiologie, Physipoathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

---

Présentée et soutenue par :

M. ADAM JBENYENI

le jeudi 14 décembre 2023

Titre :

Co-infections respiratoires chez les volailles de chair au Maghreb : contribution et dynamique du virus influenza aviaire faiblement pathogène H9N2

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP)

Directeur(s) de Thèse :

M. JEAN-LUC GUERIN

Rapporteurs :

M. ERIC CARDINALE, CIRAD MONTPELLIER

Membre(s) du jury :

MME CATHERINE BELLOC, ONIRIS NANTES, Président

M. CHRISTOPHE CAZABAN, CEVA SANTE ANIMALE, Membre

M. GUILLAUME CROVILLE, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. JEAN-LUC GUERIN, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. MONCEF BOUZOUAIA, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE SIDI THABET, Membre

Productions scientifiques

A. Publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture

1. Predominance of low pathogenic avian influenza virus H9N2 in the respiratory co-infections in broilers in Tunisia: a longitudinal field study, 2018-2020 (2023). Adam Jbenyeni, Guillaume Croville, Christophe Cazaban and Jean-Luc Guérin. *Veterinary Research*. 2023 Oct 3;54(1):88. doi:10.1186/s13567-023-01204-7.
2. Validation of an RNAscope assay for the detection of avian influenza A virus (2023). Nicolas Gaide, Manuela Crispo, Adam Jbenyeni, Céline Bleuart, Maxence Delverdier, Timothée Vergne, Guillaume Le Loc'h, and Jean-Luc Guérin. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. doi:10.1177/10406387231182385.
3. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Clade 2.3.4.4b Virus in Dust Samples from Poultry Farms, France, 2021 (2022). Fabien Filaire, Laetitia Lebre, Charlotte Foret-Lucas, Timothée Vergne, Patrick Daniel, Aurélie Lelièvre, Antoine de Barros, Adam Jbenyeni, Pierrick Bolon, Mathilde Paul, Guillaume Croville, and Jean-Luc Guérin. *Emerging Infectious Diseases.* doi: 10.3201/eid2807.212247.
4. Validation of Rnascope® IN-SITU Hybridization and Comparison with Immunohistochemistry for the Detection of Avian Influenza (2022). Nicolas Gaide, Manuela Crispo, Adam Jbenyeni, Guillaume Croville, Timothée Vergne, Céline Bleuart, Maxence Delverdier, and Jean-Luc Guérin. *Journal of Comparative Pathology*. doi: 10.1016/j.jcpa.2021.11.125.
5. Full Length Genome Sequencing of a Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus isolated in Tunisia (2021). Jihene Lachheb, Adam Jbenyeni, Jihene Nsiri, Imen Larbi, Faten Ammouna, Imen El behi, Abdeljelil Ghram. *Poultry Science.* doi: 10.1016/j.psj.2020.11.035.

B. Communications Orales

1. Multiple and emerging strains of IBV detected in acute respiratory syndromes in North African Broilers (2018-2021) Adam Jbenyeni, Guillaume Croville, Christophe Cazaban and Jean-Luc Guérin. 10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN VIRAL RESPIRATORY DISEASES (ISAVRD) 23/06/2022 (Communication orale).

2. Detection and characterization of aMPV in broiler flocks in Tunisia 2020-2021. Adam Jbenyeni, Guillaume Croville, Christophe Cazaban and Jean-Luc Guérin. 10th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON AVIAN VIRAL RESPIRATORY DISEASES (ISAVRD) 24/06/2022 (Communication orale).

3. High rate of respiratory co-infections in North-African broilers in 2021: adapted diagnostic methods for acute respiratory syndrome studies. Adam Jbenyeni, Guillaume Croville, Christophe Cazaban and Jean-Luc Guérin. WVPA, Asia meeting Dhaka 23/10/2022 (Communication orale).

4. Contribution of H9N2 low pathogenic avian influenza virus to the respiratory diseases complex in broilers in North Africa (2021-2022): the tip of the iceberg. Adam Jbenyeni, Guillaume Croville, Christophe Cazaban and Jean-Luc Guérin. XXIInd World Veterinary Poultry Association (WVPA) Congress 06/09/2023 (Communication orale).

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma gratitude et ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail, en particulier :

Pr. Jean-Luc Guérin, mon directeur de thèse et **Dr. Guillaume Croville**, mon co-directeur de thèse. Mes vifs remerciements pour votre suivi attentionné, vos conseils, vos compétences scientifiques qui m'ont aidé à mener et réussir ce travail de recherche. Sans oublier vos qualités humaines et votre gentillesse. Veuillez trouver ici l'expression de mon grand respect et de ma profonde reconnaissance.

Dr. Christophe Cazaban, mon référent de Ceva. Je te remercie pour ta générosité, ton encadrement attentionné, ton partage sans limite de ton savoir scientifique et technique, ton soutien moral que tu m'as accordé pour la réalisation de ce travail. Merci infiniment pour la personne que tu es.

Pr. Catherine Belloc, merci d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici ma sincère reconnaissance.

Dr. Eric Cardinale, je vous remercie d'avoir bien voulu accepter d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici ma profonde reconnaissance.

Pr. Moncef Bouzouaia, mes vifs remerciements pour l'effort que vous avez apporté pour le montage de ce projet de thèse et à vos conseils constructifs et enrichissants pour la réussite de ce travail. Je vous remercie d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer au jury de soutenance.

Avant-propos

- **Nom et prénom de l'auteur :** Adam Jbenyeni
- **Intitulé du travail :** Co-infections respiratoires chez les volailles de chair au Maghreb : contribution et dynamique du virus influenza aviaire faiblement pathogène H9N2
- **Directeurs de thèse :**
  - Pr. Jean-Luc Guérin (ENVT) (Directeur)
  - Dr. Guillaume Croville (ENVT) (Co-directeur)
  - Dr. Christophe Cazaban (Ceva) (Référent de l'entreprise)
  - Formation doctorale : Sciences vétérinaires
  - Laboratoire et institution : UMR IHAP ENVT Toulouse
- **Comité de thèse :**
  - Pr. Jean-Luc Guérin, ENVT
  - Dr. Guillaume Croville, ENVT
  - Dr. Christophe Cazaban, Ceva
  - Pr. Sjaak de Wit, Royal GD, Deventer
  - Pr. Cecchinato Mattia, MAPS, Padova
- **Lieux de réalisation des travaux (Laboratoires, institutions) :**
  - UMR IHAP ENVT Toulouse

Financement : Ce projet a été financé par Ceva Santé Animale S.A. et co-financé par Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (CIFRE - 2019/1605) et a été hébergé par l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT),

Résumé

Les maladies respiratoires sont un problème sanitaire et économique pour la production de volailles dans le monde entier. Les maladies respiratoires causées par un seul agent pathogène sont l'exception dans les conditions de terrain, car les co-infections entre plusieurs agents pathogènes viraux et bactériens sont plus couramment observées. La co-infection entre plusieurs agents pathogènes augmente généralement la pathogénicité (intensité et/ou durée) des signes cliniques de ces agents pathogènes pris individuellement.

Les objectifs généraux de ce travail sont d'identifier les agents pathogènes impliqués dans les syndromes aigus respiratoires dans les pays d'Afrique du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie), de vérifier la multi-étiologie des épisodes respiratoires spontanées, de décrire les profils de co-infection entre les pathogènes respiratoires et d'évaluer la contribution du virus influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 (IAFP H9N2) aux syndromes aigus respiratoires.

Dans un premier temps, le travail a été dédié à la surveillance des épisodes respiratoires dans une sélection d'élevages en Tunisie. 39 lots de poulets de chair montrant des signes cliniques respiratoires ont été échantillonnés entre 2018 et 2020. Les échantillons ont été criblés à l'aide d'un panel d'analyses PCR en temps réel (qPCR, et RT-qPCR) qui cible cinq agents pathogènes respiratoires viraux et trois pathogènes respiratoires bactériens. L'émergence de la lignée G1 d'Afrique du Nord et de l'Ouest du virus H9N2 chez des volailles tunisiennes commerciales a été signalée pour la première fois ici. La détection de la lignée GI-23 du virus de la bronchite infectieuse (BI) et du sous-type B du métapneumovirus aviaire (aMPV) chez les poulets de chair en Tunisie a également été rapportée pour la première fois dans ce travail. Le virus H9N2 s'est avéré être le pathogène le plus fréquemment détecté dans les lots testés, mais rarement seul, puisque 15 des 16 troupeaux positifs au virus H9N2 étaient co-infectés. Des co-infections ont été identifiées dans 61 % des cas de maladies respiratoires.

Dans un deuxième temps, l'étude a été élargie aux trois pays du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie) afin d'étendre la vision épidémiologique à l'échelle régionale. 300 troupeaux de volailles de chair présentant des signes respiratoires aigus ont été inclus dans cette étude. Ces échantillons ont été analysés pour le même panel de huit pathogènes respiratoires que celui utilisé dans la première étude. 99 % de ces troupeaux étaient au moins positifs pour un agent pathogène viral et 82 % présentaient des co-infections. Le virus H9N2 a été détecté dans 88 %

des foyers respiratoires testés, dont 85 % qui étaient co-infectés. Il s'est avéré que le virus H9N2 est capable de co-infecter les sept autres agents pathogènes ; néanmoins, les co-infections avec BI et aMPV ont été les plus fréquentes.

Dans un troisième temps, les échantillons positifs par RT-qPCR pour le virus BI ont fait l'objet d'un génotypage plus approfondi. L'analyse phylogénétique basée sur le gène S1 partiel a montré la co-circulation d'un total de sept lignées du virus BI en Afrique du Nord et d'au moins deux lignées par pays. Certaines lignées étaient partagées entre deux ou trois des pays de l'étude. Ces lignées sont GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 et la lignée "nord-africaine" (non classifiée encore).

Ce projet a montré l'émergence continue de maladies respiratoires virales en Afrique du Nord, la multi-étiologie des maladies respiratoires et le rôle central du virus IAFP H9N2 dans les syndromes aigus respiratoires. Le virus IAFP H9N2 contribue aux syndromes respiratoires en induisant ou en compliquant les épidémies respiratoires. Ces résultats ont montré la nécessité de prévenir et de contrôler le virus IAFP H9N2 pour lutter contre les maladies respiratoires en Afrique du Nord.

Mots clés : IAFP H9N2, co-infection, syndrome aigu respiratoire, Maghreb, volailles de chair.

Abstract

Respiratory diseases are a major health and economic concern for poultry production worldwide. Respiratory diseases caused by individual pathogens are the exception as co-infections between multiple viral and bacterial pathogens are more commonly observed in commercial poultry production. The co-infection between multiple pathogens usually increases the pathogenicity and the clinical outcomes of these pathogens individually.

The global aim of this project is to identify the respiratory pathogens involved in the respiratory disease complex in North African countries (Algeria, Morocco, Tunisia), to verify the multicausal origin of spontaneous respiratory outbreaks, to describe the co-infection profiles between respiratory pathogens and to assess the contribution of low pathogenicity avian influenza virus H9N2 (LPAIV H9N2) to the respiratory disease complex.

In a first working package dedicated to the longitudinal monitoring of respiratory outbreaks of a selection of farms in Tunisia. 39 clinically diseased broiler flocks were sampled between 2018 and 2020. Samples were screened for five viral and three bacterial respiratory pathogens using a panel of real-time PCR assays. The emergence of the Northern and Western African GI lineage strain of H9N2 in commercial Tunisian poultry was reported, for the first time here. The detection of infectious bronchitis virus (IBV) GI-23 lineage and avian metapneumovirus (aMPV) subtype B in broilers in Tunisia was reported also for the first time in this work. H9N2 LPAIV was found to be the most detected pathogen in the flocks tested, but rarely alone, as 15 of the 16 H9N2 positive flocks were co-infected. Co-infections were identified in 61% of the respiratory disease cases.

In the second work package, 300 meat-type poultry flocks showing acute respiratory signs from Algeria, Morocco and Tunisia were included in this study. These samples were screened for the same panel of the eight respiratory pathogens used in the first work. 99% of these flocks were at least positive for one viral pathogen and 82% held co-infections. LPAIV H9N2 was by far the most predominant respiratory pathogen in the three countries. LPAIV H9N2 was detected in 88% of the respiratory outbreaks tested, 85% of which were co-infected. LPAIV H9N2 was found to co-infect all the other seven pathogens however, co-infections with IBV and aMPV were the most frequent.

In the third work package, qPCR positive samples for IBV were further genotyped. The phylogenetic analysis based on the partial S1 gene showed the co-circulation of a total seven IBV lineages in Northern Africa and at least two lineages per country. Some lineages were shared between two or three of the countries of the study. These lineages were GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 and the "North African" (unclassified) lineage.

This project showed the continuous emergence of viral respiratory diseases in Northern Africa, the complexity of the respiratory disease and the pivotal role of LPAIV H9N2 in respiratory LPAIV H9N2 contributes to the respiratory disease complex by inducing or complicating respiratory outbreaks. These findings showed the need for preventing and controlling LPAIV H9N2 to control respiratory diseases in Northern Africa.

Keywords: LPAIV H9N2, co-infection, respiratory disease complex, North Africa, meat-type poultry.

Table des matières

Productions scientifiques I

Remerciements III

Avant-propos IV

Résumé V

Abstract VII

Table des matières IX

Liste des abréviations XII

Liste des tableaux XIII

Liste des figures XIV

Liste des annexes XV

Problématique 1

Objectifs du travail 2

Première partie : Etude bibliographique 3

I. Le secteur avicole au Maghreb 4

II. Les syndromes respiratoires et leurs facteurs de risque 6

1. Syndromes respiratoires 6
2. Facteurs de risque 8
   a. Anatomique 8
   b. Environnemental 9
   c. Technique d'élevage 10

III. Agents étiologiques majeurs des syndromes respiratoires 10

1. Virus 11
a. Virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) 11
b. Virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 (IAFP H9N2) 12
c. Virus de la bronchite infectieuse (BI) 13
d. Virus de la maladie de Newcastle (MN) 17
e. Métapneumovirus aviaire (aMPV) 19
f. Virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI) 21
2. Bactéries 22
a. Les mycoplasmes 22
b. *Ornithobacterium rhinotracheale (ORT)* 25
g. Escherichia coli 26
IV. Le virus IAFP H9N2 dans les syndromes respiratoires aigus 27
1. Les type d'interactions entre les pathogènes 27
2. Les mécanismes d'interaction de H9N2 avec les pathogènes respiratoires 28
a. H9N2 et virus BI 29
b. H9N2 et virus MN 30
c. H9N2 et Mycoplasmes 31
d. H9N2 and ORT 31
V. La situation épidémiologique actuelle au Maghreb 32
Deuxième Partie : travaux de recherche sur le terrain.... 34
Premier chapitre : 36
1. Validation du protocole de l'étude 37
2. Actualisation de la situation épidémiologique de H9N2 en Tunisie et preuve de co-infection..... 37
Deuxième chapitre : 61
1. Epidémiologie des agents pathogènes respiratoires au Maghreb 62
2. Contribution et rôle du virus H9N2 aux syndromes respiratoires aigus 62
Troisième chapitre : 86
1. Différenciation entre la souche vaccinale et la souche sauvage BI 87
2. Les souches du virus BI au Maghreb 87
Discussion générale et perspectives 109
Conclusion 117

Références bibliographiques 119

Annexes 145

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

aMPV: métapneumovirus aviaire

ARN: Acide ribonucléique

BI : virus de la bronchite infectieuse

CRD: chronic respiratory disease

DGSV: Direction générale des services vétérinaires

EOPS: Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés

FISA: Fédération Interprofessionnelle du Secteur Avicole

HA: hémagglutinine

IA : l'influenza aviaire

IAFP: Inluenza aviaire faiblement pathogène

IAFP H9N2: influenza aviaire faiblement pathogène H9N2

IAHP: Influenza aviaire hautement pathogène

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses

IPIV: indice de pathogénicité intraveineuse

LTI: virus de la laryngotrachéite infectieuse

MG: M. gallisepticum

MN: virus de la maladie de Newcastle

MS: M. synoviae

NA: neuraminidase

OMSA: organisation mondiale de la santé animale

ORT: Ornithobacterium rhinotracheale

qPCR: PCR en temps réel

SRC: syndrome respiratoire chronique

Liste des tableaux

Tableau 1: Souches prototypes et période de circulation de chaque lignée (données basées sur les séquences nucléotidiques S1)..... 14

Liste des figures

Figure 1 : Production de volaille en Algérie, Maroc et Tunisie entre 1961 et 2021 4
Figure 2 : Les dix maladies responsables des plus grandes pertes économiques chez la volaille 7
Figure 3 : Arbre phylogénétique mondial des virus H9N2 basé sur la séquence nucléotidique HA1 et leurs classifications en lignées et sous-lignées 13
Figure 4 : Une image illustrant le larmoiement et le gonflement des sinus chez un poulet de chair de 32 jours d'âge infecté par la lignée GI-23 du virus de la bronchite infectieuse 16
Figure 5 : Schéma illustrant la structure des particules et du génome du virus MN. A Illustration de la structure des particules virales. HN : hémagglutinine-neuraminidase, F : protéine de fusion, M : protéine de la matrice, RNP : complexe ribonucléotide-protéine. B Représentation schématique de la structure du génome du virus MN. La flèche rouge indique le site de clivage de la protéine F. Les motifs d'acides aminés représentatifs des sites de clivage de type virulent et peu virulent sont indiqués 17
Figure 6 : Photo illustrant la lésion d'hémorrhagie du proventricule chez un poulet de chair de 31 jours d'âge à la suite d'une infection par le génotype VII.2 du virus de la maladie de Newcastle 19
Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur une séquence nucléotidique partielle du gène F des différents sous-types du métapneumovirus aviaire (A, B, C, D) et du sous-type A du métapneumovirus humain 20

Liste des annexes

Annexe 1 : Ensemble d'amorces utilisés pour la détection des agents pathogènes respiratoires par qPCR.

Annexe 2 : Informations sur les troupeaux enquêtés.

Annexe 3 : Les valeurs de Ct des qPCR pour les agents pathogènes détectés.

Annexe 4 : Numéros d'accès à la base de données NCBI GenBank des séquences nucléotidiques générées au cours de cette étude.

Problématique

La filière avicole est un secteur important pour les pays du Maghreb, à la fois pour leur développement économique mais aussi pour garantir les besoins de leurs populations en protéine. Cette filière est souvent menacée par l'émergence continue de virus respiratoires. Plusieurs épidémies virales ont été décrites chez la volaille commerciale durant la dernière décennie, la plus récente étant celle associée au virus H9N2.

Le virus H9N2 a été introduit au Maroc en 2016, puis s'est étendu à l'Algérie en 2017. Depuis son introduction le nombre de problèmes respiratoires a augmenté et H9N2 était le plus souvent suspecté. A cause des pertes économiques liées au virus H9N2, il est devenu la première préoccupation des professionnels de la filière.

En infection expérimentale, de nombreux travaux ont montré que le virus H9N2 n'est pas capable de causer de la mortalité et induit seulement des signes cliniques respiratoires mineurs à modérés. La mortalité et des signes cliniques sévères sont observés, lors de la co-infection de H9N2 avec d'autres pathogènes viraux ou bactériens. Etant donné la présence de plusieurs autres pathogènes sur le terrain, les co-infections sont très susceptibles de se produire et être le facteur aggravant des signes cliniques de H9N2. Si la synergie entre H9N2 et le virus de la BI est bien étudié, peu d'études expérimentale d'autres co-infections avec H9N2 sont disponibles. Ces études de co-infections expérimentales ont besoin de se baser sur les données des études terrain de co-infections spontanées. Néanmoins, peu d'études terrains de co-infections sont disponibles.

La variation du nombre de foyers dus au virus H9N2 entre les saisons et les années n'est pas bien connu. La situation épidémiologique des autres agents pathogènes respiratoires majeurs et leurs évolutions est aussi mal connu dans la plupart des pays du Maghreb.

Objectifs du travail

- **Objectifs généraux**

Le présent travail s'est déroulé en trois principaux volets :

- Validation du protocole de l'étude et confirmation de la circulation de H9N2 en Tunisie entre 2018 et 2020 et confirmation de la fréquence des co-infections respiratoires.
- Evaluation de la fréquence des pathogènes respiratoires majeurs dans les épisodes respiratoires et la contribution de H9N2 aux syndromes respiratoires aigus au Maghreb entre 2020 et 2021. Evaluation de la fréquence des co-infections de H9N2 et la description des profils de combinaisons des agents pathogènes.
- Caractérisation des virus de la BI en circulation au Maghreb entre 2020 et 2022.

- **Objectifs spécifiques**

1er volet :

- Suivi de fermes de poulet de chair en Tunisie entre 2018 et 2020 et collecte des échantillons des cas respiratoires spontanées dans les cinq premiers jours de la déclaration des symptômes.
- Validation du panel respiratoire sur une plateforme de haut débit et criblage des huit agents pathogènes respiratoires par qPCR et RT-qPCR à partir des cartes FTA®.
- Séquençage des échantillons positifs à des virus respiratoires.

2e volet :

- Recrutement des partenaires de terrains pour s'assurer du respect du protocole de l'étude et de la bonne qualité des échantillons.
- Criblage des huit agents pathogènes respiratoires par qPCR et RT-qPCR à partir des cartes FTA®.

3e volet :

- Séquençage des échantillons positifs au virus BI et classification des variants identifiés.

Première partie :

Etude bibliographique

I. Le secteur avicole au Maghreb

Le Maghreb désigne les pays d'Afrique du Nord et comporte l'Algérie, le Maroc, la Tunisie, la Libye et la Mauritanie. Dans la suite de ce document, le terme Maghreb sera utilisé pour faire référence seulement à l'Algérie, au Maroc et à la Tunisie.

Le secteur avicole est stratégique pour les pays du Maghreb. Ce secteur représente une part importante de la production agricole dans ces pays, ce qui constitue une contribution dans le développement de leurs économies. Par exemple, le secteur avicole représente 12% de la production agricole en Tunisie en 2017 (DGSV 2017) ou un chiffre d'affaires de 3,7 milliards d'euros au Maroc en 2022 (FISA 2022).

Le secteur avicole garantit une source de protéines locales pour les habitants et assure ainsi une part de la souveraineté alimentaire des pays du Maghreb. La viande de volaille représente 66% de la viande produite (et consommée) en Tunisie en 2021 et 55% au Maroc en 2022. Pendant les 30 dernières années, la production de viande de volaille a été multipliée par cinq voire six en Tunisie et au Maroc. Les niveaux de production ont atteint 239 000 tonnes en Tunisie et 640 000 tonnes au Maroc en 2021. La vitesse de croissance était plus rapide au Maroc qu'en Tunisie. Cela peut être expliqué par l'ouverture du secteur avicole marocain sur le marché

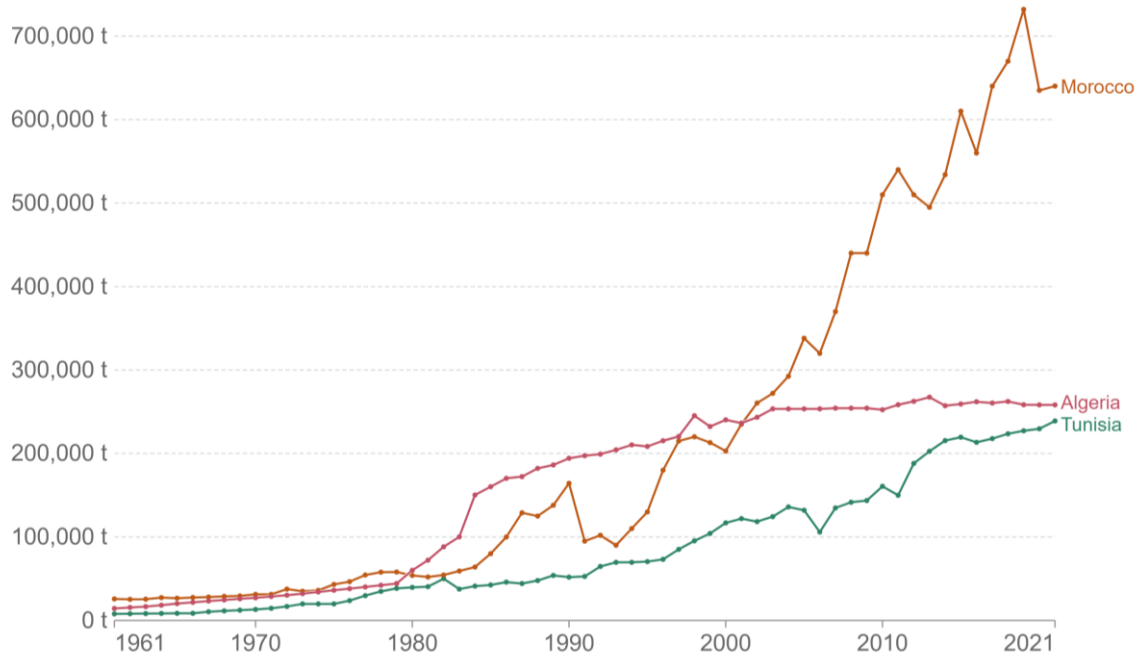


Figure 1 : Production de volaille en Algérie, Maroc et Tunisie entre 1961 et 2021

africain avec l'exportation de 2,9 millions de poussins d'un jour et de 68,5 millions d'œufs à couver de type chair en 2022. En Tunisie, le secteur est régi par des programmations de production basées sur un système de quota d'importation de reproducteurs pour éviter la surproduction et le chute des prix. En Algérie, la filière avicole a été mise en œuvre par l'état dans les années 80 dans une perspective d'atteindre l'autosuffisance ce qui explique la croissance dans les dix premières années. Au début des années 90 et à la suite d'une réforme économique, la filière avicole algérienne a été libéralisée ce qui a engendré une stagnation des niveaux de production dans les 30 dernières années. En 2020, l'Algérie a produit environ 258 000 tonnes, soit seulement 50 000 tonnes de plus qu'en 1990 (Figure 1) [1]. Les niveaux de croissance de la production de viande de volaille dans les pays du Maghreb avaient des tendances plus accélérées par rapport à la croissance mondiale qui a seulement triplé pendant les 30 dernières années. La part de la viande de volaille parmi la totalité des viandes produites étaient aussi plus élevée dans les pays du Maghreb en comparaison avec les proportions mondiales qui étaient à 40% en 2021 [1]. Cela peut s'expliquer par l'absence de production de viande de porc dans les pays du Maghreb, alors que cette espèce représente la deuxième source de protéines dans le monde. Le secteur avicole assure aussi l'autosuffisance en œufs de consommation comme 100% des besoins des pays du Maghreb en œuf sont produits localement.

Ce secteur se compose principalement d'élevages commerciaux mais aussi d'élevages traditionnels. Les élevages industriels sont des élevages intensifs de volaille à haut potentiel génétique. La taille de ces élevages peut être très variable. Par exemple en Tunisie, d'après le dernier recensement des élevages de volailles en 2016, 53% des élevages de poulets de chair ont une capacité de 5001 à plus de 30 000 ; ils assurent 85% de la production nationale. Ces élevages sont bien organisés car la plupart d'entre eux font partie d'intégrations de production. D'autre part, les 47% restants des élevages ont une capacité entre 240 et 5000 et représentent seulement 15% de la production nationale de poulets de chair [2]. Ces élevages ressemblent plus à des élevages traditionnels qu'à des élevages industriels et ils sont moins bien organisés. Etant donné leurs faible niveau de biosécurité et leurs non-intégration, ces élevages représentent un risque pour le secteur avicole. Ces élevages mal organisés peuvent être le point d'entrée et de dissémination d'agents pathogènes et ce d'autant plus que la plupart des oiseaux de ces élevages sont commercialisés dans les marchés de vif. D'un autre côté, les élevages commerciaux sont situés dans des zones à forte densité d'élevage, ce qui rend la diffusion (ou propagation) des micro-organismes contagieux plus rapide et les pertes plus conséquentes.

Le secteur avicole au Maghreb est en forte croissance et joue un rôle stratégique dans le développent de ces jeunes économies. Cependant ce secteur est fortement menacé par les crises sanitaires et en particulier, les maladies respiratoires.

II. Les syndromes respiratoires et leurs facteurs de risque

1. Syndromes respiratoires

La pathologie respiratoire représente le premier problème de santé chez la volaille, responsable des plus grandes pertes économiques dans le secteur avicole dans le monde. Parmi les dix maladies aviaires responsables des plus grandes pertes économiques chez la volaille entre 2006 et 2009, quatre maladies respiratoires figurent en premier. Ensemble, ces quatre maladies respiratoires représentent presque 85% des pertes totales dues aux dix maladies majeures (Figure 2) [3]. Le syndrome respiratoire est le terme utilisé communément pour décrire la pathologie respiratoire chez la volaille. Par définition le terme « syndrome » signifie l'ensemble de symptômes et signes cliniques et de modifications pathologiques, toujours associés, dont les causes ou les mécanismes peuvent être différents et qui permettent d'individualiser une affection (Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine, 2023). Ceci signifie que le syndrome respiratoire est une pathologie complexe où plusieurs facteurs peuvent prédisposer ou contribuer à la manifestation d'un ensemble de signes cliniques. Les facteurs prédisposant aux syndromes respiratoires chez la volaille peuvent être non-infectieux comme l'environnement, la mauvaise gestion des élevages ou même l'anatomie de l'appareil respiratoire des volailles, mais aussi des facteurs infectieux. En effet, plusieurs agents pathogènes respiratoires de type viral ou bactérien peuvent être à l'origine de ces syndromes respiratoires.

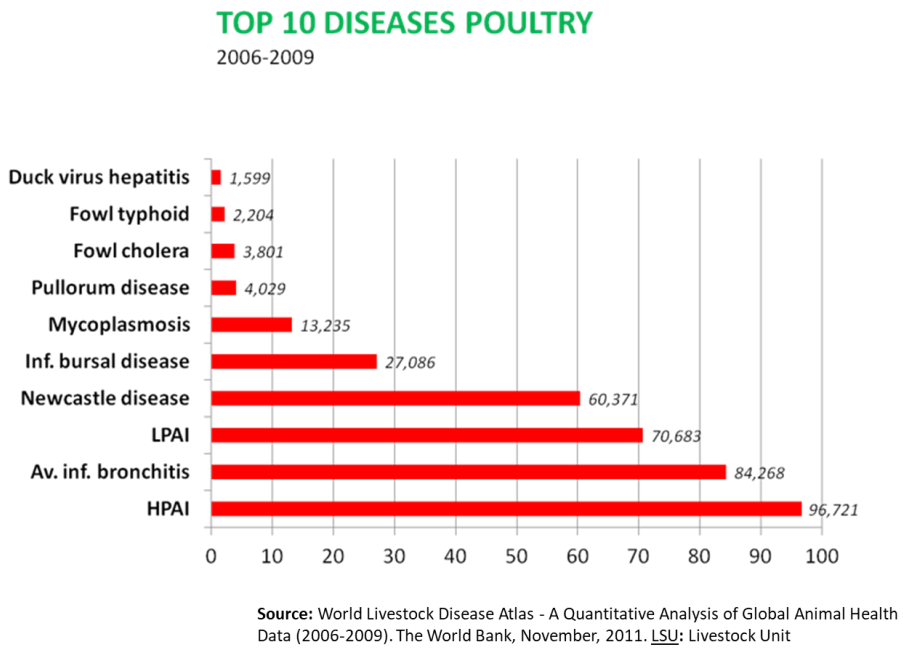


Figure 2 : Les dix maladies responsables des plus grandes pertes économiques chez la volaille

Parmi ces syndromes respiratoires, on trouve le « syndrome respiratoire chronique » (SRC) appelé en anglais « *chronic respiratory disease* » (CRD). Le syndrome respiratoire chronique désigne comme son nom l'indique les infections respiratoires de longue durée et qui sont le plus souvent associées à des infections bactériennes comme les mycoplasmes ou *Escherichia coli* [4]. Les manifestations cliniques de la maladie sont généralement lentes à se développer et peuvent durer longtemps. Cependant, pour que les oiseaux manifestent des signes cliniques à la suite de ces infections bactériennes, d'autres facteurs prédisposants doivent être réunis [5]. Ces facteurs peuvent être infectieux ou non-infectieux [6, 7]. Les cofacteurs majeurs sont les virus respiratoires, les vaccins à virus vivants ou l'ammoniac [8, 9].

Plus récemment et grâce au développement et à la démocratisation des outils de biologie moléculaire, le criblage de plusieurs agents pathogènes respiratoires dans le même échantillon est de plus en plus courant. Plusieurs études sur des cas respiratoires spontanés ont montré la multi-étiologie de la pathologie respiratoire et la prévalence élevée des co-infections lors des épisodes de ces épisodes aigües respiratoires chez la volaille commerciale [10–12]. Différentes combinaisons entre les agents pathogènes respiratoires ont aussi été découvertes, ce qui suggère la présence de synergie entre certains de ces pathogènes [13]. Cette synergie peut se traduire par l'aggravation des signes cliniques pendant ces co-infections comparé à l'infection par l'un ou l'autre pathogène séparément [14]. Cela nous amène à parler de plus en plus du syndrome aigu respiratoire ou la maladie respiratoire multi causale. Lors de ces syndromes aigus

respiratoires, des facteurs non infectieux peuvent aussi jouer un rôle dans l'apparition des signes cliniques.

2. Facteurs de risque

a. Anatomique

Devant la base du bec se situent les narines qui ouvrent les cavités nasales vers l'extérieur. Chaque cavité nasale se compose de trois cornets (rostral, moyen et caudal). Une particularité chez les oiseaux, la communication des cavités nasales avec le pharynx s'effectue par la fente palatine. La communication entre la cavité buccale et la cavité nasale prédispose donc les oiseaux à des risques d'infection respiratoire également par la voie buccale. L'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés par des agents pathogènes même strictement respiratoires peut entrainer des infections respiratoires du fait que ces pathogènes peuvent se retrouver dans l'appareil respiratoire.

Contrairement aux poumons des mammifères, ceux des oiseaux sont pratiquement inextensibles. N'ayant pas de diaphragme, la cavité thoracique et la cavité abdominale chez les oiseaux communiquent entre elles. Le diaphragme qui sépare les deux cavités chez les mammifères est réduite à une structure conjonctive. A l'extrémité terminale de la trachée se trouvent les bronches primaires. Ces deux bronches primaires entrant dans le poumon par sa face ventrale se divisent en bronches intrapulmonaires qui parcourent le poumon pour aller s'ouvrir dans les sacs aériens. Les sacs aériens sont des vastes culs de sac extra pulmonaires de paroi mince et transparente et sont au nombre de neuf chez la volaille domestique. Les sacs aériens sont le prolongement des poumons dans la cavité abdominale, les interstices musculaires et certains os. Cette structure unique place les oiseaux dans un état semi-ouvert, par conséquent plus sensible à ce qui provient du milieu extérieur. Lors d'une infection respiratoire, l'agent pathogène en cause peut envahir les sacs aériens et par conséquent se trouver plus ou moins rapidement dans la cavité abdominale [15].

La sélection génétique des poulets de chair domestiques a apporté des améliorations significatives pour les performances de croissance et le rendement en viande. Une augmentation du taux de croissance de 300 % a été obtenue au cours des 60 dernières années, passant de 25 g par jour dans les années 1950 à 100 g par jour dans l'élevage moderne [16]. Des recherches considérables sont menées pour comprendre les problèmes liés au bien-être tels que la multitude de pathologies du système locomoteur qui peuvent affecter le déplacement des poulets de chair [16], les myopathies cardiaques et pectorales, l'hypertension pulmonaire et l'ascite [17]. Les

poulets de chair souffrent de problèmes respiratoires qui peuvent être liés à leur développement musculosquelettique rapide et à leur aptitude à dépasser leur capacité pulmonaire.

Les voies respiratoires des volailles sont normalement équipées de mécanismes de défense pour prévenir ou limiter l'infection par des agents pathogènes en suspension dans l'air, pour éliminer les particules inhalées et pour maintenir les voies respiratoires propres. Plus précisément, la santé respiratoire des poulets est protégée par trois mécanismes de défense : les cils, les sécrétions de mucus et la présence des macrophages qui éliminent les bactéries. Les cils sont de minuscules structures ressemblant à des cheveux dans la trachée qui sont responsables de la propulsion des particules piégées en vue de leur élimination. Le mucus est produit dans la trachée. Les sécrétions de mucus et le mouvement des cils représentent ensemble l'escalator muco-ciliaire qui est bien développé chez les volailles. La densité du mucus produit est importante pour l'efficacité de l'activité ciliaire. Les cils ne peuvent pas fonctionner lorsque le mucus est trop épais. Les macrophages des poumons éliminent activement les particules inhalées et les bactéries qui pénètrent dans les voies respiratoires inférieures. Ces cellules phagocytent les bactéries et les dégradent, empêchant ainsi leur propagation. L'intégration des cils, du mucus et des cellules piégeuses permet aux voies respiratoires des poules d'être saines. L'altération d'un seul de ces composants permet l'accumulation de poussières ou d'agents pathogènes dans les voies respiratoires ce qui peut entraîner l'apparition de phénomènes pathologiques.

b. Environnemental

Plus de 90 % des maladies respiratoires sont soit déclenchées, soit au moins aggravées par l'inhalation d'aérosol et de gaz nocifs [18]. Le rôle des aérosols dans l'apparition ou l'aggravation des maladies pulmonaires est de mieux en mieux connu. La composition de l'air dans un élevage de volailles diffère considérablement de celle de l'air extérieur. Principalement émis au cours du processus de production, les aliments, les fientes, les plumes et les desquamations, difficiles à éviter, produisent de grandes quantités de particules [19]. En raison des différentes sources de particules et de leurs variations temporelles et spatiales, la composition et la concentration des aérosols peuvent changer de manière significative [20]. La concentration des aérosols dans les poulaillers est de 10 à 100 fois plus élevée dans les espaces limités qu'à l'extérieur. Les particules d'une taille de moins de 10 mm peuvent atteindre les voies respiratoires supérieures des poulets de chair, et les particules d'une taille inférieure à 2,5 µm peuvent atteindre les poumons des oiseaux. Par ailleurs, à température et humidité élevées, de grandes quantités de micro-organismes, de particules secondaires et de composés toxiques issus

du métabolisme des acides aminés dans le système digestif de l'animal se fixent plus facilement sur les aérosols [21]. Ces particules en suspension peuvent avoir toute une série d'effets néfastes sur le système respiratoire des volailles. Les particules inhalées irritent les voies respiratoires, diminuent la résistance immunitaire et provoquent des maladies respiratoires [22].

Outre les particules d'aérosol présentes dans les bâtiments d'élevages, des gaz sont générés par les déchets de volaille en décomposition, les émissions des poulets et les équipements mal entretenus ou mal installés, tels que les brûleurs à gaz. Les gaz nocifs que l'on trouve le plus souvent dans les élevages de volailles sont l'ammoniac (NH_3) et le dioxyde de carbone (CO_2). L'ammoniac est le gaz irritant nocif le plus alcalin dans un bâtiment d'élevage. Des recherches ont montré qu'à partir de 10 ppm, l'ammoniac provoque une production excessive de mucus, endommage les cils [23] et entrave l'activité mucociliaire pour l'élimination des particules inhalées [24].

c. Technique d'élevage

En élevage commercial, les bâtiments d'élevage sont passés du système ouvert au système semi-ouvert où la ventilation du bâtiment est gérée automatiquement à l'aide des extracteurs d'air pour répondre à une augmentation de la densité des oiseaux. L'augmentation du nombre d'oiseaux par mètre carré oblige un plus grand volume d'air à renouveler. Le mauvais fonctionnement du système de ventilation a pour conséquence la dégradation des paramètres d'ambiance dans le bâtiment et accumulations des gaz nocifs, en premier lieu l'ammoniac. En hiver, ce risque est plus élevé à cause de la réduction de la fréquence de ventilation pour limiter les déperditions thermiques.

La ventilation est aussi importante par temps chaud pour réduire le taux d'humidité relative et la chaleur dans le bâtiment. La concentration d'aérosols dans les bâtiments d'élevages dépend de plusieurs facteurs, notamment l'espèce de volaille, les pratiques d'élevage, l'activité, la densité d'élevage, le système de contrôle de l'environnement, l'humidité et la saison [25]. Les résultats des études sur les bâtiments de poulet de chair ont montré que la température et l'humidité relative ont un impact important sur les concentrations totales de particules en suspension [26].

III. Agents étiologiques majeurs des syndromes respiratoires

1. Virus

a. Virus de l'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP)

Les virus de l'influenza aviaire (IA) appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce sont des virus à ARN monocaténaire de polarité négative, à huit segments, qui codent pour dix protéines virales. La famille est divisée en trois genres principaux de grippe (types A, B et C). Les virus de l'influenza aviaire font partie de l'influenza type A et qui sont capable d'infecter des espèces aviaires mais aussi d'autres espèces de mammifères [27]. Les virus de la grippe A sont sous-typés en fonction des protéines d'enveloppe qui sont l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). Il existe 16 sous-types de HA de H1 à H16 et 9 sous-types de NA de N1 à N9 chez les volailles [28]. Les virus influenza ont une grande capacité à effectuer des mutations génétiques au niveau de leurs glycoprotéines de surface (HA et NA) grâce à des phénomènes de glissement (« drift ») ou de cassure (« shift ») antigénique. Ce dernier phénomène est spécifique aux virus de type A. Grâce à leurs génome segmenté, les virus influenza sont capable d'interchanger les segments entre eux, ce phénomène est appelé le réassortiment [29]. En fonction de la pathogénicité, l'infection peut être hautement létale "IA hautement pathogène" (IAHP) et constitue donc un danger pour la santé publique avec une importance zoonotique. Parallèlement, des formes moins graves d'IA ont un pouvoir pathogène plus faible et ne sont pas hautement pathogènes, avec un impact moindre sur la production de volailles, et sont appelées IA faiblement pathogène (IAFP) [27].

Les virus IA pourraient être identifiés sur la base de l'indice de pathogénicité intraveineuse (IPIV). L'IAHP est définit comme une infection de la volaille causée par le virus de l'influenza A dont l'IPIV chez les poules âgées de six semaines est supérieur à 1,2. L'infection par des virus de l'influenza A du sous-type H5 ou H7 pour lesquels le séquençage démontre la présence de multiples acides aminés basiques consécutifs au niveau du site de clivage de la HA est aussi considérée comme une IAHP. L'IAHP est à déclaration obligatoire selon la législation de l'Union européenne mais aussi selon les règles définies par l'organisation mondiale de la santé animale (OMSA). Les virus H5Nx qui appartiennent à la lignée A/goose/Guangdong/1/96 sont des virus hautement pathogènes qui entraînent de graves pertes économiques et qui ont été associé à des taux de mortalité pouvant atteindre 100 %. Le virus H5Nx se caractérise cliniquement par une septicémie accompagnée d'un degré variable d'œdème, d'hémorragies et de nécrose au niveau de la peau et des organes viscéraux ainsi qu'une chute de ponte. En général, les virus IAHP entraînent une nécrose du pancréas, de la rate, du cœur, du foie et des reins, les poumons présentant généralement une pneumonie et un œdème, et dans certains cas,

les poumons sont congestionnés avec des taches hémorragiques. En outre, on peut observer une atrophie du thymus et des bourses, ainsi qu'une augmentation de la taille de la rate [27].

b. Virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 (IAFP H9N2)

L'IAFP est l'infection causée par plusieurs sous-types de virus de l'influenza aviaire dont l'indice de pathogénicité est inférieur à 1,2 avec un site de clivage qui ne comporte pas une succession de multiples acides aminés basiques [30]. L'infection avec les virus IAFP est très courante sur le terrain, notamment en Afrique du Nord. Le virus IAFP le plus répandu dans le monde est le H9N2 [31]. Comme tous les autres virus IA, le réservoir naturel du sous-type H9N2 est les oiseaux d'eau [32]. Le virus H9N2 appartient aux virus influenza de type A de la famille *Orthomyxoviridae* et contient un génome segmenté d'ARN de polarité négative [27]. Les huit segments de H9N2 code pour dix protéines virales principales. Les protéines de surface HA et la NA jouent un rôle important dans l'immunogénicité du virus [33]. Le segment H9 a été associé à chacun des neuf segments de NA, néanmoins 75% des séquences disponibles publiquement sont associées au NA N2 ce qui suggère une association préférentielle et une coévolution de ces deux segments dans la nature [31].

Deux lignées phylogénétiques distinctes de H9N2 ont été décrites : la lignée américaine et l'eurasienne. A partir de la lignée Eurasienne découlent plusieurs clusters avec une histoire d'évolution complexe [31]. En l'absence d'un système de nomenclature standardisé comme pour les virus H5, plusieurs équipes ont proposé des systèmes de classification des virus H9N2 [34, 35]. Les virus H9N2 ont été divisés en quatre sous-lignées principales (h9.1–h9.4), qui ont été par la suite divisées en clades [34, 36]. Les virus Américains se regroupent dans la sous-lignée h9.1 et les virus Eurasiens dans les sous-lignées h9.2 (Y439-like or Korean-like), h9.3 (BJ94-like or Y280-like or G9-like) et h9.4 (G1-like) [31]. Les virus du G1-h9.4 sont les plus répandus dans le monde. Les virus de cette sous-lignée sont divisés en deux sur la base de leurs distributions géographiques, comme « Eastern » (h9.4.1) ou « Western » (h9.4.2). Le G1-Western regroupe les virus H9N2 qui circulent en Afrique et au Moyen Orient et dans le sous-continent indien [31].

Bien que le virus H9N2 soit moins mortel comparé au virus H5Nx de l'IAHP, il contribue à une grande partie des pertes économiques que subit l'industrie avicole dans de nombreuses régions du monde [37]. L'infection expérimentale par le virus H9N2 a montré des signes cliniques faibles à modérés chez la poule pondeuse et le poulet de chair mais plus sévères chez la caille. [38]. Sur le terrain, l'infection par H9N2 a été fréquemment couplée à des signes cliniques

sévères et à de la mortalité [39]. L'aggravation des signes cliniques peut être due à l'infection concomitante du virus H9N2 par d'autres pathogènes.

En termes de prévention et de contrôle du virus H9N2, il n'existe pas de mesure unique mais de nombreuses stratégies doivent être combinées pour maîtriser ce virus. Les stratégies à mettre en place doivent comprendre des mesures de biosécurité visant à bloquer l'introduction (bio-exclusion) ou la diffusion du virus (bio-confinement) [40], des études de surveillance actualisées permettant d'évaluer le statut épidémiologique du pays, un plan de vaccination ciblant tous les niveaux de production et visant à réduire la réexcrétion virale et la rupture de la chaine de transmission [41] et la sensibilisation au risque pour la santé publique.

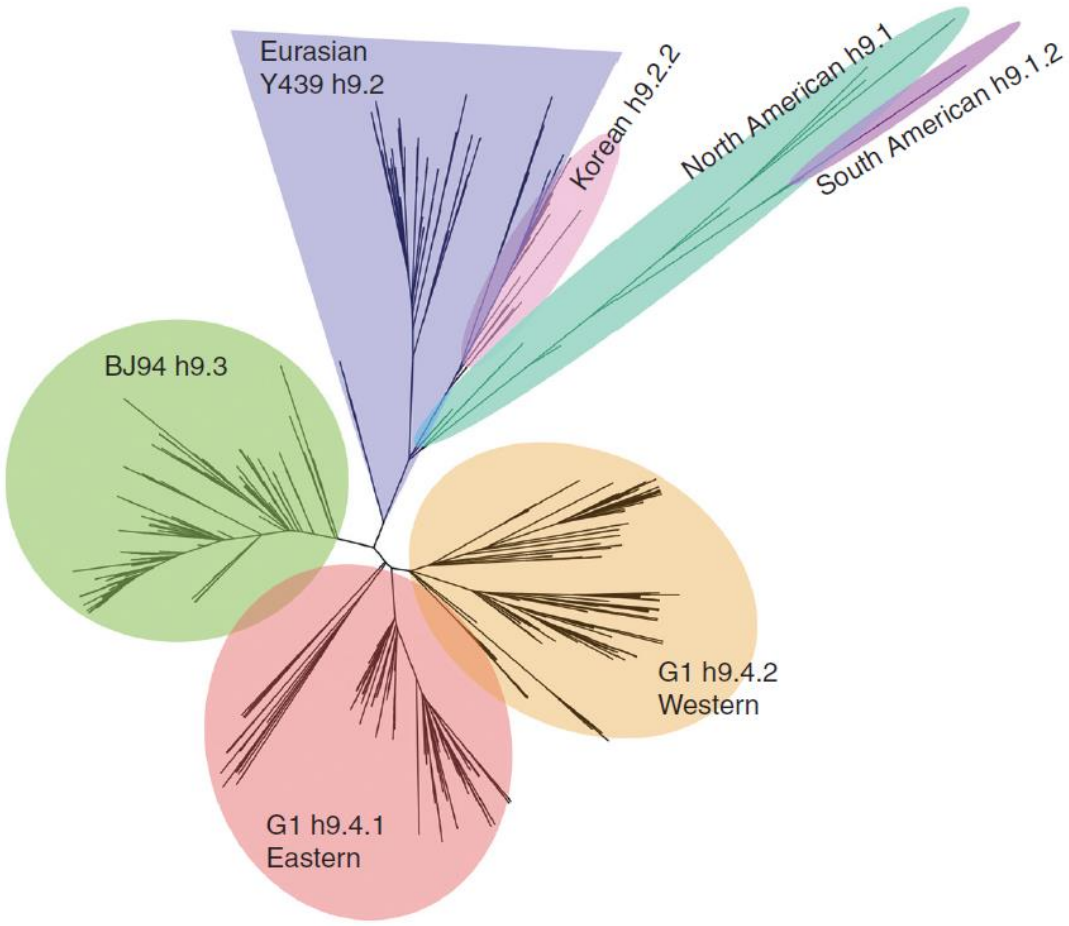


Figure 3 : Arbre phylogénétique mondial des virus H9N2 basé sur la séquence nucléotidique HA1 et leurs classifications en lignées et sous-lignées [31].

c. Virus de la bronchite infectieuse (BI)

Le virus de la BI est un gammacoronavirus qui appartient à la sous-famille des *Coronavirinae* et à la famille des *Coronaviridae* [42]. C'est un virus enveloppé de forme ronde et tapissé de

tiges (spicules) à la surface d'où le nom de corona. L'ARN du virus de la BI est simple brin, de polarité positive et non segmenté. Le génome du virus BI code pour quatre protéines structurelles : la nucléocapside (N), la membrane (M), l'enveloppe (E) et la spicule (S) [43]. La glycoprotéine S est un trimère composé de deux sous-unités, S1 et S2. La spicule est impliquée dans l'attachement et la fusion du virus avec la cellule hôte et contient des épitopes cibles de la neutralisation virale [44]. Le génotypage et la classification des virus BI sont basés principalement sur la séquence nucléotidique de la protéine S1. Valastro et al. [45] ont proposé de classer les virus BI en six génotypes (GI à GVI) qui contiennent 32 lignées avec une grande diversité génétique dans le GI (27 lignées). Depuis cette classification réalisée en 2016, de nouveaux génotypes et lignées ont été décrits.

Tableau 1 : Souches prototypes et période de circulation de chaque lignée (données basées sur les séquences nucléotidiques S1) [45]

Lignée	**Période de circulation**	**Souche prototype**			
		Nom de la souche	Pays d'origine	Date de prélèvement	Numéro d'accès GenBank
GI-1	1937–2013	Beaudette	USA	1937	M95169
GI-2	1954–2006	Holte	USA	1954	GU393336
GI-3	1960–2006	Gray	USA	1960	L14069
GI-4	1962–1998	Holte	USA	1962	L18988
GI-5	1962–2012	N1/62	Australia	1962	U29522
GI-6	1962–2010	VicS	Australia	1962	U29519
GI-7	1964–2012	TP/64	Taiwan	1964	AY606320
GI-8	1965–1967	L165	USA	1965	JQ964061
GI-9	1973–2011	ARK99	USA	1973	M99482
GI-10	1970s–2000s	B	New Zealand	1970s	AF151954
GI-11	1975–2009	UFMG/G	Brazil	1975	JX182775
GI-12	1978–2006	D3896	The Netherlands	1978	X52084
GI-13	1983–2013	Moroccan-G/83	Morocco	1983	EU914938
GI-14	1984–2006	B1648	Belgium	1984	X87238
GI-15	1986–2008	B4	Korea	1986	FJ807932
GI-16	1986–2011	IZO 28/86	Italy	1986	KJ941019
GI-17	1988–1999	CA/Machado/88	USA	1988	AF419315
GI-18	1993–1999	JP8127	Japan	1993	AY296744
GI-19	1993–2012	58HeN-93II	China	1993	KC577395
GI-20	1996–1999	Qu_mv	Canada	1996	AF349621
GI-21	1997–2005	Spain/97/314	Spain	1997	DQ064806
GI-22	1997–2011	40GDGZ-97I	China	1997	KC577382
GI-23	1998–2012	Variant 2	Israel	1998	AF093796
GI-24	1998–2013	V13	India	1998	KF757447
GI-25	2004–2013	CA/1737/04	USA	2004	EU925393

GI-26	2006–2007	NGA/B401/2006	Nigeria	2006	FN182243
GI-27	2008–2013	GA08	USA	2008	GU301925
GII-1	1979–1984	D1466	The Netherlands	1979	M21971
GIII-1	1988–2008	N1/88	Australia	1988	U29450
GIV-1	1992–2003	DE/072/92	USA	1992	U77298
GV-1	2002–2008	N4/02	Australia	2002	DQ059618
GVI-1	2007–2012	TC07-2	China	2007	GQ265948

La bronchite infectieuse touche principalement l'espèce *Gallus gallus*, sans préférence d'âge. L'infection commence dans le système respiratoire quel que soit le tropisme (respiratoire, rénal, reproducteur) de la souche et provoque donc des symptômes respiratoires [46]. Le virus peut se répliquer et induire des lésions dans différents types de cellules épithéliales, au niveau du système respiratoire supérieur (cornets naseaux, trachée, glande de Harder), profond (poumons, sacs aériens), des reins et de l'oviducte [47]. Certaines souches sont aussi capables de se répliquer dans des organes lymphoïdes comme la bourse de Fabricius, le thymus ou la rate [48]. La sévérité des symptômes et lésions produites par le virus BI est variable en fonction de la virulence des souches, l'âge, le climat et le statut immunitaire des oiseaux [47]. Cependant, le virus BI rend les oiseaux plus sensibles à des infections secondaires ou vient compliquer une infection déjà en place [49]. L'aggravation des signes cliniques a été observé lors de co-infection du virus BI avec *Escherichia coli* [50], *Mycoplasma gallisepticum* [9], *Mycoplasma synoviae* [51], virus de la maladie de Newcastle [52] et virus IAFP H9N2 [13, 49], notamment.

Les signes respiratoires classiques (mais non spécifiques) de la BI sont la dyspnée, la toux, les éternuements, les râles et l'écoulement nasal [47]. Des yeux larmoyants, un gonflement des sinus peuvent être observés occasionnellement chez le poulet de chair [53] (Figure 4). Dès qu'ils commencent à se remettre de la phase respiratoire, les poulets de chair infectés par un virus néphropathogène commencent à présenter des signes de dépression, des plumes ébouriffées, des fientes humides, une augmentation de la consommation d'eau et de la mortalité [54]. Les lésions observées chez les poulets infectés sont un exsudat séreux ou caséeux dans la trachée, et les sinus. Les sacs aériens peuvent être recouverts de mousse pendant la phase aiguë de l'infection, puis deviennent troubles et remplis d'un exsudat jaune caséeux. Des zones de pneumonie peuvent être observées. Les souches néphropathogènes peuvent entraîner une hypertrophie et une pâleur des reins [53]. Chez les poules pondeuses et reproductrices, l'infection peut entraîner une réduction de la production d'œufs allant jusqu'à 70 % et une diminution de la qualité de la coquille. Le virus peut se répliquer dans l'oviducte et causer des

dommages permanents chez les poulettes futures pondeuses, ce qui entraîne une production limitée d'œufs ou des oiseaux qui n'entrent pas en ponte (fausses poules pondeuses). Les œufs des poules de races à coquille pigmentée peuvent devenir pâles, et l'albumen peut avoir une viscosité aqueuse.

En Afrique, le virus BI a été isolé pour la première fois en Égypte dans les années 1950, puis dans les années 1980 en Afrique australe [55] et au Maroc [56]. En 1983, le virus G/83 a été



Figure 4 : Une image illustrant le larmoiement et le gonflement des sinus chez un poulet de chair de 32 jours d'âge infecté par la lignée GI-23 du virus de la bronchite infectieuse

isolé au Maroc. Une étude rétrospective a révélé que le virus G/83 partageait 96% d'identité nucléotidique avec le variant 793B et qu'il était probablement le progéniteur de la lignée GI-13 [57]. Entre 1997 et 2002, d'autres virus BI néphro-pathogènes ont été détectés au Maroc [58]. En 2010, la souche Italy02 a été détecté pour la première fois au Maroc et a circulé jusqu'à 2014 [59]. En Algérie, un nouveau variant néphro-pathogène de BI a été détecté en 2012 [60] et en 2013 [11]. En Tunisie, des variants uniques du virus BI ont été caractérisés au cours des périodes 2000-2001 et 2007-2010 [61, 62]. En 2016, des virus étroitement liés au variant néphropathogène algérien ont été identifiés et isolés en Tunisie [63].

d. Virus de la maladie de Newcastle (MN)

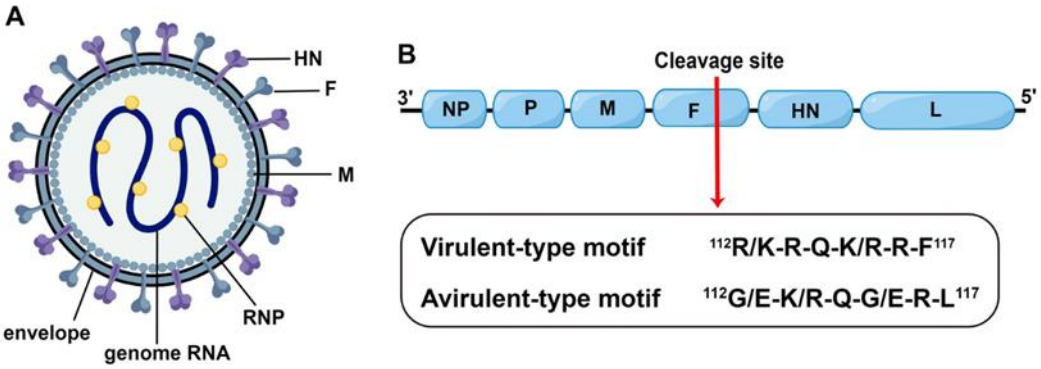


Figure 5 : Schéma illustrant la structure des particules et du génome du virus MN. A Illustration de la structure des particules virales. HN : hémagglutinine-neuraminidase, F : protéine de fusion, M : protéine de la matrice, RNP : complexe ribonucléotide-protéine. B Représentation schématique de la structure du génome du virus MN. La flèche rouge indique le site de clivage de la protéine F. Les motifs d'acides aminés représentatifs des sites de clivage de type virulent et peu virulent sont indiqués [67]

Le virus de la maladie de Newcastle (MN) est un *Avian orthoavulavirus* 1 (AOAV-1) appartenant à la nouvelle sous-famille *Avulavirinae* de la famille *Paramyxoviridae* (ICTV, 2019). Le virus MN était anciennement désigné comme *Avian avulavirus 1* (AAvV-1) et communément appelé *Avian paramyxovirus 1* (APMV-1) [64]. Le génome du virus MN est un ARN simple brin de polarité négative et codant pour 6 protéines structurelles énumérées de 5' à 3' : la protéine de nucléocapside (NP), la phosphoprotéine (P), la matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) et de l'ARN polymérase ARN-dépendante (L) (Figure 5) [65]. La protéine F est le facteur principal de la virulence des virus MN. L'activité de fusion et l'infectiosité du virus dépendent de la protéase qui est capable de cliver la protéine précurseur F0 en hétérodimère (F1 et F2) [66].

La maladie de Newcastle, appelée historiquement pseudopeste aviaire, est responsable d'énorme pertes économiques pour la volaille commerciale et a été classée comme la troisième plus importante maladie chez la volaille entre 2006 et 2009 [3]. Cette maladie peut causer des infections chez un large éventail d'oiseaux domestiques et sauvages, partout dans le monde. La maladie de Newcastle est définie comme l'infection par les virus virulents de MN car les virus peu virulents ne sont pas capables de provoquer la maladie. Les virus virulents sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OMSA) comme les virus qui ont un indice de pathogénicité intracérébrale (IPIC) de 0,7 ou plus (maximum 2,0) ou un site de clivage du gène F caractérisé par un motif polybasique d'acides aminés et une phénylalanine à la position 117 (^{112}R/G/KRQ/K-K/R-RF^{117}). Les termes « vélogène », « mésogène » et lentogène » ont été définis en se basant sur le temps de mort moyens des embryons inoculés. Ces termes sont

maintenant utilisés pour définir la pathogénicité des virus par le test de pathogénicité intra cérébrale [67]. Le virus virulent MN est très contagieux et peut être dévastateur chez des oiseaux non vaccinés où la mortalité peut atteindre 100%.

Les virus MN sont classés en deux classes (classe I et classe II) sur la base de données génomiques et le séquençage des gènes F et L [68] et regroupent tous les génotypes et lignées déjà signalés. Un système unifié et objectif de la classification du virus MN a été proposé en 2012 [69]. Ce système a permis de classer les virus de la classe I en un seul génotype qui contient trois sous-génotypes et les virus de classe II en 15 génotypes (I à XV) et de multiples sous-génotypes. Ce système a été largement adopté et son utilisation a permis de classer des nouveaux génotypes et sous-génotypes. La large circulation et l'évolution continue du virus MN ont conduit à des identifications quasi simultanées et à la dénomination non coordonnée de nouveaux génotypes ce qui a motivé un groupe de scientifiques d'agir pour harmoniser la classification des nouveaux génotypes [64]. Aujourd'hui, le génotype VII est considéré comme prédominant parmi les virus vélogènes de la MN. Les virus de la sous-lignée VII.2 sont apparus en Indonésie et ont diffusé en Asie, au Moyen-Orient, en Europe et en Afrique. Ces virus ont été responsables de la cinquième panzootie de la MN [70].

Ni les signes cliniques ni les lésions ne sont pathognomoniques pour la MN [67]. Les poulets naïfs infectés par des souches vélogènes du virus de tropisme viscéral présentent deux jours après l'infection des signes de prostration et d'abattement avec des plumes ébouriffées et 100% meurent au bout de trois à quatre jours [67]. Les signes cliniques chez les poulets, cinq jours après l'infection par un virus virulent de tropisme nerveux sont des tremblements de la tête ou des muscles, un torticolis et une paralysie d'une aile ou d'une patte peuvent apparaître [67]. La mortalité peut atteindre 50% voire plus chez les plus jeunes. Les souches lentogènes, peu virulentes, ne provoquent généralement pas de maladie chez les oiseaux adultes. Cependant, les jeunes poulets naïfs peuvent présenter une détresse respiratoire sévère après l'administration de la souche vaccinale LaSota par nébulisation de gouttelettes très fines [71]. Les signes cliniques peuvent également se manifester si des infections secondaires sont présentes ou si le taux d'ammoniac dans le bâtiment est élevé. Il est important de garder à l'esprit, lors de l'interprétation de signes cliniques d'une maladie sur le terrain, que les infections secondaires peuvent être le problème principal. Les lésions présentes chez des poulets infectés par des souches virulentes sont la nécrose et l'hémorrhagie des organes lymphoïdes secondaires (glande

de Harder, amygdales caecales, plaques de Payer). L'hypertrophie de la rate, ainsi que l'hémorrhagie du thymus et du proventricule, sont des lésions fréquentes (figure 6).



Figure 6 : Photo illustrant la lésion d'hémorrhagie du proventricule chez un poulet de chair de 31 jours d'âge à la suite d'une infection par le génotype VII.2 du virus de la maladie de Newcastle

e. Métapneumovirus aviaire (aMPV)

Le métapneumovirus est un virus à ARN simple brin de polarité négative qui appartient au genre *Metapneumovirus* de la famille des *Pneumoviridae* [72]. Le génome du métapneumovirus code pour huit protéines : nucléoprotéine (N), phosphoprotéine (P), protéine de la matrice (M), protéine de fusion (F), deuxième protéine de matrice (M2-1 et M2-2), petite protéine hydrophobe (SH), glycoprotéine de surface (G) et une grande ARN polymérase ARN-dépendante (L). Les métapneumovirus sont divisés en deux groupes selon leur hôte humain ou aviaire. Les métapneumovirus aviaires sont classés en quatre sous-types (A, B, C et D). Tandis que les aMPV/A, B et D se regroupent plus étroitement ensemble, le aMPV/C est génétiquement plus proche du sous-type A du métapneumovirus humain (Figure 7).

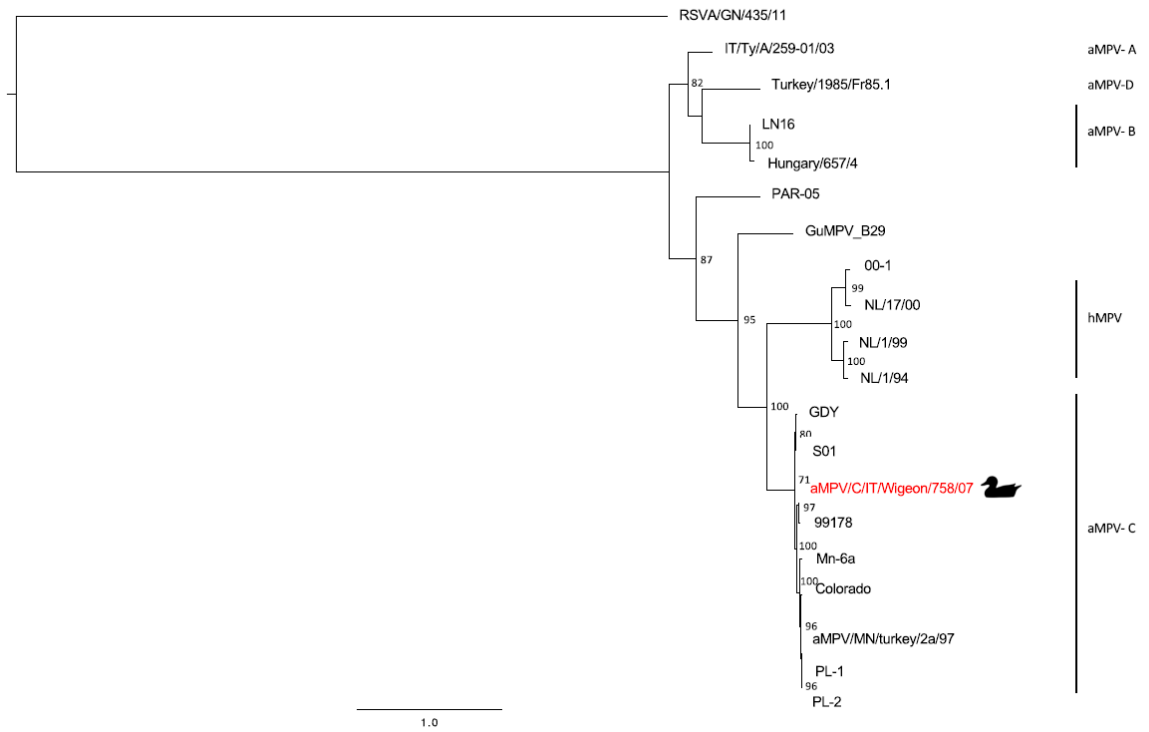


Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur une séquence nucléotidique partielle du gène F des différents sous-types du métapneumovirus aviaire (A, B, C, D) et du sous-type A du métapneumovirus humain [73]

Même si le aMPV est considéré comme l'agent causal de la rhinotrachéite infectieuse de la dinde et du syndrome infectieux de la grosse tête chez la poule, les signes cliniques et les lésions observés lors de ces infections ne sont pas spécifiques au aMPV [67]. Les signes cliniques sévères associés à cette maladie sont le plus souvent dus à la co-infection du aMPV avec d'autres bactéries. La pathogénicité du aMPV a été difficile à évaluer en laboratoire, y compris à partir des isolats de terrain qui ont présenté une forte morbidité et une augmentation du taux de mortalité [67]. Expérimentalement, les oiseaux infectés présentent souvent des signes similaires à ceux de la rhinotrachéite, mais rèstent plus légers que ceux observés sur le terrain [73]. Des études de terrain confirment que la présence concommitante d'autres agents pathogènes comme *Ornithobacterium rhinotracheale* et *Chlamydia psittaci* contribuent à l'infection par aMPV [74, 75], et une étude longitudinale a suggéré une corrélation directe entre l'infection aMPV sur le terrain et la mortalité associée à la colibacillose [76]. Dans des études de laboratoire, l'infection simultanée des dindonneaux par aMPV et des bactéries respiratoires, telles que *E. coli*, *Bordetella avium* et *Ornithobacterium rhinotracheale* [77, 78], *Mycoplasma gallisepticum* [79] et le virus lentogène de la maladie de Newcastle [80], exacerbe et prolonge de manière significative les signes cliniques et la morbidité. Chez les dindonneaux infectés

expérimentalement, il a également été démontré que la pré-infection par *Chlamydophila psittaci* augmentait de manière significative la gravité de l'infection par aMPV [81].

Les signes cliniques chez les jeunes dindonneaux se traduisent par des reniflements, des râles, des éternuements, un écoulement nasal, un larmoiement, un gonflement du sinus infra-orbitaire et un œdème sous-mandibulaire. La toux et l'agitation de la tête sont fréquemment observées, en particulier chez les dindonneaux plus âgés [82]. L'infection chez les poulets par le aMPV est moins évidente et n'est pas toujours associée à des signes cliniques visibles et la mortalité ne dépasse pas les 2% [67, 83].

f. Virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI)

Le virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI), également connu sous le nom de *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1), appartient au genre *Iltovirus* et à la sous-famille *Alphaherpesvirinae* de la famille *Herpesviridae* [84]. Le génome du virus LTI est un ADN linéaire double brin est composé d'une région longue unique (UL), une région courte unique (US) flanquée par deux répétitions inversées (IR) [85]. Au microscope électronique, les virions du virus LTI sont constitués d'un ADN à l'intérieur d'une capside icosaédrique entourée d'une couche de tégument et de glycoprotéines d'enveloppe externe. Le génome de l'ILTV comprend 80 cadres de lecture ouverts (ORF), dont 65 sont situés dans la région UL, 9 dans la région US et 6 dans la région IR [86]. L'enveloppe du virus contient les glycoprotéines gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL et gM, qui sont codées respectivement par les ORF hautement conservés UL27, UL44, US6, US8, US4, UL22, US7, US5, UL53, UL1 et UL10 [87]. Les glycoprotéines sont importantes pour la réplication du virus LTI et pour induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire chez l'hôte [88].

Le virus LTI est l'agent causal de la laryngotrachéite infectieuse qui est une maladie de l'appareil respiratoire supérieur, très contagieuse et qui touche principalement les poulets [89]. Bien que les poulets soient considérés comme l'hôte cible principal du virus de LTI [90], la maladie spontanée a été décrite chez les pintades et les faisans [91]. D'autres espèces, y compris des Galliformes étroitement apparentés, sont réfractaires à l'infection, ainsi que les corbeaux, les canards, les pigeons, les moineaux et les étourneaux [92]. La LTI est responsable de pertes économiques liés à la diminution des performances de production ou à un retard de croissance, à la suite d'une morbidité sévère et à la mortalité même si elle reste modérée [93].

Chez les poulets, dans des conditions de terrain, deux formes principales de la LTI ont été décrites : une forme aiguë ou épizootique caractérisée par une détresse respiratoire importante,

des éternuements, l'expectoration de mucus mélangé à du sang, une trachéite et une conjonctivite hémorragiques sévères accompagnées d'une mortalité élevée pouvant atteindre 70 % (de 5 à 70 %) et une forme plus légère caractérisée par une trachéite catarrhale légère à modérée, une sinusite, une conjonctivite, une morbidité relativement faible et une mortalité occasionnelle qui se situe généralement entre 0,1 et 2 % [94].

Comme d'autres herpès virus, le virus LTI peut rester en latence dans le ganglion trigéminal du système nerveux central après 7 jours d'une infection aigüe [95]. Après un évènement stressant comme le transport, l'entrée en ponte ou le mélange d'oiseaux de différents origines, le virus peut se réactiver [96]. Ces réactivations sont en général sporadiques et inapparentes avec une réplication virale productive dans l'épithélium trachéal qui peuvent conduire à une excrétion virale et une transmission de l'infection à des oiseaux sensibles [97]. Les vaccins issus d'embryons de poulet et de cultures cellulaires mis au point dans les années 1960 ont été et sont encore largement utilisés pour lutter contre les épidémies de LTI dans le monde entier. Entre-temps, les deux vaccins ont eu tendance à redevenir virulents après des passages d'un poulet à un autre. Il est communément admis que la plupart des foyers LTI sont causés par les isolats des vaccins qui ont persisté après leurs administrations chez les oiseaux à vie longue et qui se sont propagés par la suite dans les élevages voisins de volaille [98].

Des maladies respiratoires concomitantes telles que la mycoplasmose à *Mycoplasma gallisepticum*, ou à *Mycoplasma synoviae*, le coryza infectieux ou d'autres maladies immunosuppressives telles que l'anémie infectieuse du poulet, la réticuloendothéliose ou la mycotoxicose, peuvent exacerber les signes cliniques de la LTI sur le terrain [99].

2. Bactéries

a. Les mycoplasmes

Les mycoplasmes aviaires appartiennent au genre *mycoplasma*, à la famille des *Mycoplasmataceae* et à la classe des Mollicutes (en Latin : Peau fine). Les mycoplasmes sont les plus simples micro-organismes capables de s'auto-répliquer. Les mycoplasmes sont dépourvus de parois cellulaires en peptidoglycane, ce qui les rend résistants aux antibiotiques du groupe des β-lactamines et ils sont non colorables par la coloration de Gram. Les cellules des mycoplasmes sont entourés d'une membrane cytoplasmique contenant des lipoprotéines et refermant à l'intérieur des ribosomes et de l'ADN circulatoire à double brin [100].

Chez les oiseaux, environ 27 espèces de mycoplasmes ont été identifiées dont 13 responsables de maladie chez la volaille domestique. Parmi ces mycoplasmes, les plus importants, les plus courants et les plus pathogènes sont *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. iowae* et *M. meleagridis* [101]. Les infections à MG et MS surviennent principalement chez les poulets et les dindes. Cependant, elles ont été fréquemment isolées chez la caille et autres espèces aviaires [102]. La transmission horizontale de MG et MS se fait facilement par contact direct. La transmission se fait par les voies respiratoires, et généralement 100 % des oiseaux deviennent infectés. Les oiseaux sont infectés à vie et restent porteurs. À de nombreux égards, la propagation de MG et MS semble être similaire, à l'exception du fait qu'elle est plus rapide pour MS. La transmission verticale joue un rôle majeur dans la transmission de MG et MS chez les poulets et les dindes, toutefois, plusieurs troupeaux issus de reproducteurs infectés peuvent rester indemnes de l'infection [103].

Chez les poulets et les dindes, les infections à *M. gallisepticum* (MG) sont communément connues sous le nom du syndrome respiratoire chronique (SRC) des poulets et de la sinusite infectieuse des dindes. Le syndrome respiratoire chronique compliquée ou "maladie des sacs aériens" est une aérosacculite sévère résultant d'une infection à MG compliquée par une infection virale respiratoire (par exemple, bronchite infectieuse ou maladie de Newcastle) [104]. Chez les poulets de chair, la plupart des cas surviennent après l'âge de 4 semaines et les signes sont souvent plus marqués que ceux observés dans les élevages adultes. Cependant, l'apparition et l'étendue des signes cliniques à la suite d'une exposition connue peuvent être très variables en fonction de la virulence de la souche MG, des complications infectieuses, de l'âge des oiseaux et des facteurs de stress environnementaux et autres [5, 105].

Les signes les plus caractéristiques de l'infection spontanée par MG dans des troupeaux adultes sont les râles, l'écoulement nasal et la toux. La réduction de consommation d'aliments et la perte de poids sont aussi observées [103]. Les lésions causées par MG consistent principalement en une congestion des muqueuses et un exsudat catarrhal au niveau des voies nasales, la trachée, les bronches et les sacs aériens. La sinusite avec accumulation d'exsudat mucoïde à caséeux est généralement plus importante chez les dindes, mais peut également être observée chez les poulets. Les sacs aériens contiennent fréquemment un exsudat caséeux qui peut être focal, multifocal ou diffus. Un certain degré de pneumonie peut être observé. Ni les symptômes ni les lésions ne sont cependant pathognomoniques de l'infection par MG [103].

Les troupeaux peuvent présenter des preuves sérologiques d'infection par MG sans signes cliniques évidents, en particulier s'ils sont des porteurs guéris. Les épidémies graves avec une morbidité et une mortalité élevées observées chez les poulets de chair sont souvent dues à des infections concomitantes et à des facteurs environnementaux [104]. Bien que MG soit considéré comme la cause principale du SRC, d'autres organismes provoquent fréquemment des complications. Les vaccins à virus vivant de la maladie de Newcastle ou du virus de la bronchite infectieuse, peuvent exacerber l'infection par la MG, qui se complique fréquemment d'E. coli [106, 107]. Des infections simultanées par le virus de la rhinotrachéite du dindon chez les dindes [79] et par le virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H3N8 chez les poulets [108] ont également entraîné des signes cliniques plus sévères de l'infection par MG.

Les poulets et les dindes sont les hôtes naturels courants de MS. L'infection naturelle chez les poulets a été observée dès une semaine d'âge, mais l'infection aiguë est généralement observée lorsque les poulets sont âgés de 4 à 16 semaines et les dindes de 10 à 24 semaines. L'infection aiguë se produit occasionnellement chez les poulets adultes. L'infection chronique suit la phase aiguë et peut persister pendant toute la durée de vie du troupeau.

Chez les poulets et les dindes, l'infection à *Mycoplasma synoviae* (MS) se présente le plus souvent sous la forme d'une infection subclinique des voies respiratoires supérieures. Elle peut provoquer des lésions des sacs aériens lorsqu'elle est associée à la maladie de Newcastle, à une bronchite infectieuse ou aux deux. Le MS peut également devenir systémique et entraîner une synovite infectieuse qui touche principalement les membranes synoviales des articulations et les gaines des tendons. Les poulets atteints de la forme respiratoire de MS peuvent présenter de légers râles au bout de 4 à 6 jours ou être asymptomatiques. Les oiseaux issus de reproducteurs infectés par MS peuvent présenter une augmentation des lésions des sacs aériens, une réduction du gain de poids et une diminution de l'indice de consommation. Les *Mycoplasma synoviae* isolés à partir de lésions des sacs aériens sont plus susceptibles de provoquer une aérosacculite, tandis que ceux isolés à partir de synovie sont plus susceptibles de produire une synovite [109]. L'aérosacculite est exacerbée par la vaccination contre la maladie de Newcastle et la bronchite infectieuse, ou par toute infection respiratoire. La gravité de l'aérosacculite dépend de la virulence du virus de la bronchite infectieuse utilisé en association avec MS [110]. Les lésions des sacs aériens sont considérablement renforcées par des températures environnementales froides [111].

b. *Ornithobacterium rhinotracheale (ORT)*

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) est une bactérie gram-négative, en forme de bâtonnet immobile et non sporulée. ORT appartient à la superfamille V à rRNA et fait partie de la famille des *Flavobacteriaceae* qui tire son origine du phylum *Cytophag-lavobacterium-Bacteroides*. Actuellement, 18 sérotypes (A à R) d'*O. rhinotracheale* ont été déterminés (71). Le sérotype A est le plus répandu parmi les isolats de poulet (97%) et de dinde (61%). Il semble y avoir une corrélation entre l'origine géographique des isolats et leur sérotype [112]. *Ornithobacterium rhinotracheale* a été isolé dans le monde entier chez de nombreuses espèces d'oiseaux, y compris des poulets et des dindes.

ORT est à l'origine de l'ornithobactériose, une maladie contagieuse transmise horizontalement par contact direct, par aérosols ou indirectement par l'eau de boisson. La transmission verticale n'est pas encore clairement démontrée, mais elle est suspectée depuis que la bactérie a été isolée à partir de l'appareil reproducteur et d'œufs à l'éclosion [113, 114]. La gravité des signes cliniques, la durée de la maladie et la mortalité sont extrêmement variables. Elles peuvent être influencées par de nombreux facteurs tels qu'une ventilation inadéquate, une densité élevée d'oiseaux, de litière dégradée, des niveaux élevés d'ammoniac, des maladies concomitantes [115]. Les signes cliniques chez les poulets de chair apparaissent généralement à l'âge de 3 à 6 semaines, avec un taux de mortalité de 2 à 10 %. Les symptômes sont un abattement, une diminution de la consommation d'aliment, une augmentation de l'indice de consommation, un jetage nasal transitoire, des éternuements et un œdème facial [116]. Chez les dindes, les premiers symptômes sont la toux, les éternuements et l'écoulement nasal, suivis, dans certains cas, d'une détresse respiratoire sévère, d'une prostration et d'une sinusite. Ces symptômes s'accompagnent d'une réduction de la consommation d'aliments et d'eau [112].

Chez les volailles commerciales, tous les âges semblent être sensibles à l'ORT. Dans de nombreux cas, une infection concomitante a été décrite entre d'*O. rhinotracheale* avec d'autres pathogènes respiratoires, tels que *Escherichia coli* [117, 118], *Bordetella avium* [118], le virus de la maladie de Newcastle [115], le virus de la bronchite infectieuse [119], le métapneumovirus aviaire [77, 78], l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 [120, 121], *Avibacterium paragallinarum* [122], *Mycoplasma synoviae* [123] et *Chlamydia psittaci* [124, 125]. La plupart des études expérimentales ont conclu que, lorsqu'il est inoculé seul, *O. rhinotracheale* provoque des lésions pathologiques minimes chez les poulets et les dindes et que la gravité des symptômes et lésions augmente en cas d'infection concomitante par des virus ou des bactéries respiratoires.

g. Escherichia coli

Escherichia coli est un bacille Gram négatif, non acido-résistant, à coloration uniforme et non sporulé de la famille des *Enterobacteriaceae.* Les sérotypes d'*E. coli* sont classés selon le système de Kauffmann [126]. Il existe actuellement environ 180 antigènes O (Somatique), 60 antigènes H (Flagellaires) et 80 antigènes K (Enveloppe) [127]. Ces chiffres changent au fur et à mesure que de nouveaux antigènes sont identifiés. Dans la plupart des systèmes de typage sérologique, seuls les antigènes O et H sont déterminés, par exemple O157:H7. L'antigène O détermine le sérogroupe et l'ajout de l'antigène H et parfois de l'antigène K détermine le sérotype [128].

Il est généralement reconnu que la colibacillose est la maladie infectieuse bactérienne la plus fréquente chez les volailles et que, ensemble, les infections à E. coli sous leurs diverses formes sont responsables de pertes économiques considérables. La plupart des espèces aviaires, si ce n'est toutes, sont sensibles à la colibacillose. Les différentes formes de colibacillose sont considérées comme la maladie bactérienne infectieuse la plus courante chez les poulets de chair et les dindes. Les oiseaux qui ont un système immunitaire compétent, sont naturellement résistants à *E. coli,* y compris aux souches virulentes. L'infection se produit lorsque les barrières cutanées ou muqueuses sont compromises (ombilic non cicatrisé, plaies, lésions des muqueuses suite à une infection virale, bactérienne ou parasitaire, absence de microbiote normal, toxines, carences nutritionnelles), immunosuppression (infections virales, toxines), exposition et/ou stress excessif (contamination de l'environnement, fortes variations de température, mauvaise ventilation, eau contaminée). Un contrôle efficace de la colibacillose dépend de l'identification et de l'élimination des causes prédisposantes de la maladie.

La colibacillose chez les volailles est typiquement une maladie localisée ou systémique causée entièrement ou partiellement par *Escherichia coli* aviaires pathogènes (APEC) et qui survient souvent secondairement lorsque les défenses de l'hôte ont été affaiblies. La colibacillose survient souvent en co-infection avec d'autres maladies, ce qui rend difficile la détermination de la contribution de chaque agent à la maladie clinique globale. L'infection par le virus BI chez les poulets [9] et l'exposition des espèces aviaires à l'ammoniac [24] sont les facteurs les plus fréquemment rapportés qui prédisposent à la colibacillose. La forme respiratoire localisée de colibacillose est responsable d'un gonflement de la tête qui est une cellulite aigüe à subaigüe qui touche les tissus périorbitaires et les tissus sous-cutanés adjacents de la tête. Le gonflement de la tête est causé par un exsudat inflammatoire sous la peau qui s'accumule à la suite d'une infection bactérienne, généralement *E. coli,* qui vient à la suite d'une infections virales des voies

respiratoires supérieures (par exemple, métapneumovirus aviaire, virus de la bronchite infectieuse). L'ammoniac aggrave par la suite la maladie [129]. La colisepticémie d'origine respiratoire est la forme systémique d'*E. coli* communément appelée le syndrome respiratoire chronique (SRC). La SRC affecte à la fois les poulets et les dindes et constitue le type de colisepticémie le plus courant. *E. coli* accède à la circulation à la suite de lésions de la muqueuse respiratoire causées par des agents infectieux ou non infectieux [7, 130]. Le virus BI et le virus MN, y compris les souches vaccinales, les mycoplasmes et l'ammoniac sont les facteurs prédisposants les plus courants. Les infections mixtes virus BI/ *E. coli* sont plus graves que celles causées par l'un ou l'autre agent seul [9]. L'infection par le métapneumovirus aviaire augmente la sensibilité des dindes à la colisepticémie [73, 131].

IV. Le virus IAFP H9N2 dans les syndromes respiratoires aigus

1. Les type d'interactions entre les pathogènes

L'interaction entre les agents pathogènes sur le même site d'infection peut être soit antagoniste, soit synergique et ces interactions peuvent déterminer par la suite la gravité du complexe pathologique. Ces phénomènes dépendent de l'ordre successif des co-infections (pré-infection, infection simultanée ou surinfection), de la réponse immunitaire de l'hôte, des productions biologiques des pathogènes et/ou d'autres facteurs environnementaux. Comme chez l'homme, les autres mammifères, les infections virales respiratoires chez la volaille peuvent aggraver les conséquences d'infections bactériennes secondaires par des espèces pathogènes ou commensales. La réplication virale au niveau de l'épithélium de l'appareil respiratoire supérieur induit la destruction des cellules ciliées et des cellules gobelet ce qui facilite l'attachement et la colonisation bactérienne [132, 133] ou l'altération de l'activité phagocytaire et/ou la modification de la réponse immunitaire innée [134–136].

D'autre part, la pré-infection bactérienne pourrait être bénéfique à la pathogenèse de H9N2, comme dans le cas des bactéries sécrétant des protéases qui facilitent le clivage de la HA des virus IAFP [137, 138]. L'activation protéolytique des virus influenza par les bactéries peut reposer sur plusieurs mécanismes, dont quatre qui illustrent bien le rôle de la co-infection bactérienne: clivage direct de la HA, clivage de la HA indirectement par l'activation des protéases de l'hôte, antagonisme envers les inhibiteurs des protéases de l'hôte, et stimulation de la réponse inflammatoire de l'hôte [139] qui augmente par la suite la production des protéases de l'hôte [140–142]. La pré-infection bactérienne pourrait aussi provoquer une suppression de la réaction immunitaire de l'hôte et augmenter la pathogénicité de H9N2 [143]. En revanche,

l'infection bactérienne pourrait limiter la pathogénicité virale en augmentant la réponse immunitaire aux agents pathogènes viraux et/ou en inhibant ou en réduisant l'attachement viral aux cellules cibles [144].

Lors des co-infection virales, l'interaction virus-virus la plus courante est l'interférence, où un virus entre en compétition pour inhiber la réplication d'un autre virus [145]. Les causes de l'interférence virale peuvent être divisées en deux catégories : celles qui sont induites par l'interféron et celles non induites par l'interféron [146]. L'immunité innée induite par l'interféron (IFN) est la raison la plus fréquente de l'interférence virale [147, 148]. L'interférence virale non induite par l'interféron, également connue sous le nom d'interférence intrinsèque, est la résistance des cellules infectées par un virus aux infections virales ultérieures. Les mécanismes de l'interférence virale intrinsèque comportent l'inhibition de la réplication [149], la dénaturation de précurseur essentiel pour la réplication virale [150], la compétition aux récepteurs cellulaires pour l'attachement [151], et la compétition pour la machinerie intracellulaire de l'hôte [84].

Contrairement à l'interférence, l'interaction virale qui favorise la réplication des virus de la co-infection et qui aggrave les signes cliniques est appelé synergie. Les causes de la synergie virale peuvent être divisées en deux catégories : celles induites par l'interféron et celles non induites par l'interféron [146]. La synergie virale induite par l'interféron se manifeste principalement par le fait qu'un virus provoque l'immunodéficience de l'hôte, ce qui favorise la réplication des autres virus [152–154]. La synergie virale non induite par l'interféron pourrait être liée à l'effet de la protéine de l'hôte ou à la réplication d'autres virus [155]. Les mécanismes qui peuvent illustrer cette catégorie de synergie sont de deux types : l'un est la sécrétion des protéases qui peut faciliter le clivage de la HA des virus influenza [156], l'autre est l'induction d'une réaction inflammatoire sévère [13]. L'évaluation des conséquences des co-infections sur l'hôte est mesurable selon certains critères qui sont : les changements dans les schémas de réplication virale, le tropisme tissulaire, les réponses pathologiques et les réponses immunologiques [157].

2. Les mécanismes d'interaction de H9N2 avec les pathogènes respiratoires

Le virus H9N2 est devenu endémique dans de nombreux pays en Asie, au Moyen Orient et en Afrique [31], causant des infections cliniques avec des symptômes respiratoires modérés à sévères et de la mortalité sur le terrain [39, 158]. En revanche, H9N2 provoque des signes cliniques mineurs ou inexistants dans des infections expérimentales de poulets Exempts

d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) [49]. Des facteurs tels que l'ammoniac et le stress peuvent exister sur le terrain et jouer un rôle dans l'aggravation des signes cliniques du H9N2. Toutefois, le principal facteur reste la co-infection par d'autres pathogènes respiratoires viraux et/ou bactériens dans les conditions de terrain. [11, 159]. Les co-infections spontanées par H9N2 ont été rapportées à plusieurs reprises en association avec d'autres virus respiratoires telles que le virus de la maladie de Newcastle et/ou le virus de la bronchite infectieuse [159–161]. En outre, de nombreuses bactéries ont été concomitamment retrouvées chez des oiseaux infectés par H9N2, telles que *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), *Escherichia coli.* Plusieurs travaux ont étudié l'impact de ces co-infections sur les réponses de l'hôte, notamment l'excrétion virale, le tropisme du virus et les manifestations cliniques dans des conditions expérimentales et sur le terrain [10, 108, 162, 163].

a. H9N2 et virus BI

Le virus BI a été décrit très souvent en co-infection avec H9N2 lors d'études de terrain dans différents pays d'Asie, du Moyen-Orient et d'Afrique [10, 159, 164–166]. La pré-infection ou la surinfection du virus H9N2 par le virus BI ont été observés en conditions de terrain et investigués expérimentalement [14]. La synergie entre les deux virus semblait être vrai quel que soit l'ordre successif de co-infection néanmoins, le mécanisme expliquant cette synergie n'est pas très bien élucidé mais plusieurs ont été suggérés [13]. Lors de la primo infection avec le virus BI, le virus infecte d'abord les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures, puis se propage dans d'autres tissus de l'organisme par virémie. Il a été signalé que pendant sa réplication, le virus BI produit une protéase semblable à la trypsine. Cette protéase pourrait jouer un rôle dans l'augmentation de la réplication de H9N2 et de son tropisme tissulaire là où le virus BI peut se répliquer ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la pathogénicité de H9N2 [156]. Il a été aussi démontré que la primo infection avec le virus BI induit une inflammation sévère ce qui aggrave les signes cliniques lors d'une surinfection avec H9N2. Dans le cas où la co-infection est induite par H9N2, ce dernier provoque un effet d'immunosuppression [154, 167, 168] et favorise la surinfection des poulets par le virus BI [164]. La co-infection entre le H9N2 et les souches vaccinales de la BI a également été étudiée et fait l'objet de controverses. La surinfection expérimentale de H9N2 par la souche vaccinale H120 de la BI peut aggraver les signes cliniques et les lésions de H9N2 et prolonge sa période d'excrétion [162, 169]. D'autres travaux ont plutôt suggéré une interférence entre H9N2 et le virus BI vaccinal (H120). Ces travaux ont montré une réduction de la réplication des deux virus

lors d'une co-infection simultanée ou une réduction de la réplication du premier virus lors d'une surinfection par l'un ou l'autre virus [170, 171].

b. H9N2 et virus MN

Le virus MN comme le H9N2 peut se répliquer dans les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures en se fixant sur les récepteurs d'acide sialique alpha 2,3 galactose à la surface des cellules par l'intermédiaire de la protéine HN pour le virus MN ou HA pour H9N2 [172, 173]. La compétition des deux virus pour les mêmes récepteurs cellulaires au même site d'infection peut être à l'origine d'une interférence virale. La réplication antérieure d'un des deux virus peut être affectée par la réponses immunitaire antivirale, comme les immunomodulateurs, la production d'interféron ou le recrutement de cellules immunitaires [174].

Dans une étude expérimentale, la co-infection de poulets EOPS par H9N2 (A/chicken/Tehran/ZMT-173/99) et par la souche vaccinale LaSota de la MN simultanément ou successivement à trois jours d'intervalle a montré une interférence entre H9N2 et le virus MN et une modification dans l'excrétion virale sans symptômes notés. Il a été montré que lors de la co-infection simultanée, H9N2 a retardé et réduit la réplication du virus MN. Un avantage réplicatif de H9N2 sur le virus MN a été suggéré et non l'inverse étant donné qu'aucune perturbation de réplication n'a été noté pour H9N2 même lors de pré-infection par le virus MN [175]. L'avantage réplicatif des virus IA sur les virus MN été déjà constaté lors de co-infection d'embryons de poulet EOPS par les virus et IA et MN, et que cet effet est plus marqué si l'inoculation du VIA a lieu 2 à 24h avant le virus MN. Il a été aussi constaté que le niveau d'interférence est réduit si on remplace le virus MN vaccinal par un virus virulent [176].

Contrairement à la première étude, la co-infection expérimentale de poulets de chair commerciaux avec le virus H9N2 (A/Chicken/Egypt/93/2015) et la souche vaccinale LaSota du virus MN a montré une réduction significative de la réplication du virus H9N2 pour atteindre des titres non détectables avec une aggravation des signes cliniques. La période d'excrétion du virus H9N2 a été prolongée jusqu'à 9 jours dans le groupe inoculé par H9N2 trois jours avant le virus MN, dans les autres groupes la période d'excrétion était de 6 jours [177].

Pour le virus MN vélogène, une étude expérimentale sur des poulets EOPS a montré que le virus H9N2 augmente la sensibilité des oiseaux au virus MN par la diminution de la dose minimale infectieuse et l'exacerbation des signes cliniques. La co-infection a montré aussi que

H9N2 peut retarder et diminuer les niveaux d'excrétion du virus MN donc prolonger la période de réplication du virus chez les oiseaux avec des niveaux indétectables [161].

c. H9N2 et Mycoplasmes

L'infection par MG ou MS présente peu ou pas de signes cliniques chez la volaille domestique, à moins qu'elle ne soit compliquée par d'autres virus respiratoires [104]. La co-infection entre H9N2 et MG et/ou MS a été fréquemment rapportée dans des cas d'infections respiratoires spontanés sur le terrain et accompagnés par la présence de bouchons fibrineux dans la trachée [49] qui participent à l'aggravation des manifestations cliniques [11, 178].

Les résultats de co-infections expérimentales entre H9N2 (A/chicken/Saudi Arabia/CP7/1998) et MG réalisées en ex-vivo sur des coupes de trachée en culture ont révélé que l'effet de MG sur la pathogenèse de H9N2 dépend de l'intervalle entre les deux infections. Quand le temps d'incubation avec MG, avant l'épreuve virulente avec H9N2 était plus long, il a renforcé la ciliostase et a significativement réduit la réponse immunitaire antivirale innée. Cette immunodépression a aggravé ensuite l'effet de H9N2. En revanche, l'incubation avec MG pendant une courte période de 24 h suivie d'une infection par LPAIV H9N2 favorise la réplication virale et bactérienne, tandis qu'une incubation plus longue ne favorise que la croissance bactérienne comme la réplication virale est significativement réduite par rapport à l'infection par H9N2 seul [144]. Cela pourrait être attribué à la destruction des cils, à l'hyperplasie des cellules épithéliales et à la désialysation des cellules épithéliales trachéales induites par MG. Ces résultats pourraient expliquer la capacité d'une infection subclinique par MG chez les oiseaux, dans des conditions de terrain, à développer des signes respiratoires sévères avec d'autres vaccins respiratoires vivants concomitants. Ces infections pourraient être attribuées à l'immunodépression induite par MG [144].

d. H9N2 and ORT

Durant l'investigation de problèmes respiratoires récurrents en Chine, un total de six souches d'ORT et dix souches de H9N2 ont été isolées à partir d'échantillons prélevés sur le terrain. Cinq des six prélèvements à partir desquels les souches d'ORT ont été isolées, présentaient en même temps des souches de H9N2 [121]. Dans une étude ultérieure conduite par la même équipe, des niveaux de séroprévalence élevés d'ORT ont été retrouvés dans les lots de poulets de chair étudiés (84%) contre une faible séroprévalence chez des oiseaux apparemment sains (15%).

La co-infection expérimentale de poulets de chair commerciaux par le virus H9N2 (A/chicken/Shandong/2011) et ORT a montré une augmentation des taux de mortalité à des taux supérieurs à ceux induits par H9N2 ou ORT seul. La surinfection d'ORT par H9N2 trois jours après ou leur co-infection simultanée a induit les niveaux de mortalité les plus élevés, respectivement 80% et 70%. Des lésions typiques de pneumonie sévère et d'aérosacculite ont été observées. Cependant, une mortalité plus faible, a été enregistrée lors de la pré-infection d'ORT par H9N2 (30%). L'inoculation d'ORT a été réalisée par voie intrapéritonéale [121].

Dans une autre étude expérimentale sur des poulets EOPS, la co-infection simultanée entre H9N2 (A/Chicken/Iran/m.1/2010) et ORT a montré des signes cliniques sévères et une mortalité de 15%. L'inoculation de l'ORT dans cette étude a été réalisée par voir intratrachéale [179]. La différence entre les deux études peut être due au modèle animal utilisé et à la voie d'inoculation par ORT. Il est connu que la pathogénicité d'ORT dépend de la voie d'inoculation, de la virulence de la souche, des facteurs environnementaux, du statut immunitaire de l'hôte et de la présence d'une infection concomitante [180].

V. La situation épidémiologique actuelle au Maghreb

Le secteur avicole au Maghreb a été frappé par plusieurs épidémies virales durant la dernière décennie. Ces virus sont introduits le plus fréquemment, via l'activité humaine avec des pays voisins ou dans des cas plus rares par les oiseaux migrateurs. En Tunisie par exemple, une succession d'épidémies de virus respiratoires a été enregistrée dans le pays depuis 2009. L'émergence du virus IAFP H9N2 en Tunisie a été détecté en fin 2009 [181]. Des études de phylodynamie ont suggéré que cette souche a été introduite à partir du Pakistan et qu'il est peu vraisemblable que ce virus IAFP H9N2 soit introduit par les oiseaux migrateurs car il n'y a pas de couloir de migration qui correspond à cette voie de diffusion [182]. Une deuxième introduction d'une nouvelle souche du virus IAFP H9N2 à partir de la Libye a été suggéré en 2012 [183]. Une épidémie impliquant le virus MN de génotype VII vélogénique a été déclaré en 2013 en Tunisie (NCBI Accession: KX228393). Un virus MN très apparenté au virus tunisien a été détecté à la même année en Libye. La Tunisie a aussi enregistré l'émergence du virus LTI en 2015 qui est resté limité à quelques cas [184]. En 2016, une nouvelle souche du genotype I du virus BI a été détecté en Tunisie [63]. Au Maroc, une étude entre 2010 et 2014 a montré l'émergence de la souche Italy-02 (GI-21) du virus BI à partir de 2010. L'émergence du virus IAFP H9N2 a été détecté pour la première fois au Maroc en 2016 [39] causant beaucoup de pertes économiques pour le secteur et depuis, H9N2 est endémique au Maroc

[185]. Ce virus a été introduit très vraisemblablement par l'activité humaine à partir du Moyen Orient et qui a diffusé par la suite dans les autres pays du Maghreb et de l'Afrique de l'Ouest [182, 186, 187]. En Algérie, ce même virus IAFP H9N2 a été détecté en 2017 [188]. D'autres virus ont été aussi détectés en Algérie comme le virus BI à partir de 2013 ou le VLTI à partir de 2017.

Les pays du Maghreb sont aussi sujets au risque d'introduction des virus influenza aviaires hautements pathogènes (IAHP) du fait de leur emplacement géographique qui est inclus dans les couloirs de migration de nombreuses espèces d'oiseaux d'eau. Ces oiseaux migrateurs sont des hôtes naturels et des réservoirs des virus de la grippe aviaire ce qui représente un risque majeur pour le secteur avicole dans ces pays. En 2016, le virus influenza aviaire hautement pathogène de sous-type H5N8 (IAHP) a été identifié chez une trentaine d'oiseaux migrateurs (Foulque macroule et Canard siffleur) dans un parc naturel au Nord de la Tunisie. Le foyer a été maitrisé rapidement et aucun cas n'a été détecté chez les oiseaux domestiques. De même, en Algérie, des virus IAHP (H7N1 et H5N8) ont été identifiés à deux reprises en 2016 et en 2021 chez des oiseaux sauvages. Mais en 2022, un virus IAHP de sous-type H5N1 a pu émerger dans le compartiment domestique et ce qui a déclenché une épidémie en Algérie qui a touché plusieurs élevages y compris de poules reproductrices [189].

La co-circulation de plusieurs virus complexifie d'autant plus la prévention et le contrôle des agents pathogènes respiratoires. Dans les conditions de terrain, les co-infections peuvent se produire facilement et semblent être la règle, néanmoins en raison des signes cliniques et des lésions très similaires entre les maladies respiratoires, le diagnostic de certitude nécessite de faire appel à des analyses de laboratoire. Les outils de biologie moléculaire comme la PCR ou le séquençage sont de plus en plus utilisés à cet effet. La PCR et le séquençage permettent la détection de faible charge de pathogène (sensibilité) avec une grande spécificité. Ces outils peuvent être orientés vers la détection d'un large panel d'agents pathogènes. Des solutions pour effectuer des analyses en haut débit pour un grand jeu de prélèvement est désormais possible. Les outils de biologie moléculaire se démocratisent grâce à la réduction de leurs coûts et à leur plus grande accessibilité.

Deuxième Partie : travaux de recherche sur le terrain

Cette étude s'est déroulée en trois volets complémentaires, tous menés à partir de données collectées sur le terrain et analysées au laboratoire à Toulouse

- Le premier « volet : Exploration de la complexité de la pathologie respiratoire au Maghreb et validation des méthodes : La Tunisie comme modèle »

- Le deuxième « volet : Etude de la contribution des pathogènes respiratoires majeurs à la pathologie respiratoire, la complexité de son étiologie et le rôle de H9N2 et sa dynamique »

- Le troisième « volet : La caractérisation du virus de la bronchite infectieuse au Maghreb »

Premier chapitre :

Exploration de la complexité de la pathologie respiratoire au Maghreb et validation des méthodes : La Tunisie comme modèle

1. Validation du protocole de l'étude

Le syndrome aigu respiratoire est supposé être due principalement à l'infection concomitante par des virus et bactéries, éventuellement sur fond de facteurs techniques favorisants. Le protocole de prélèvement a été défini de sorte que les lots atteints soient repérés très tôt après le déclenchement de la pathologie respiratoire et que les oiseaux soient échantillonnés au plus tard cinq jours après l'apparition des premiers signes cliniques.

Pour des raisons de biosécurité, de réglementation sur l'exportation de prélèvements biologiques, les cartes FTA® ont été utilisées pour garantir la non-infectiosité du matériel biologique et assurer la bonne conservation du matériel génétique dans l'échantillon en l'absence de chaine de froid. Alors que la détection de pathogènes à partir de cartes FTA® est une technique courante qui a déjà été validée, l'amplification de longs fragments (≈ 2kb) à partir de cette même matrice est controversée. Ceci peut s'expliquer par le niveau de dégradation du matériel génétique présent sur la carte FTA®, qui dépend des conditions dans lesquelles elle est stockée. L'objectif de cette première partie était aussi de valider les amorces de criblages du panel respiratoire utilisé par Croville et al. (2018) sur les souches circulant en Tunisie et sur une nouvelle plateforme de biologie moléculaire. Cette plateforme est composée d'un robot pipeteur, le Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (Santa Clara, Californie USA) et qu'un thermocycleur Applied Biosystems ViiA7 (Foster City, Californie, USA) qui reçoit des plaques 384 puits. Ces outils permettent de réaliser un haut débit de réactions tout en garantissant une bonne répétabilité.

2. Actualisation de la situation épidémiologique de H9N2 en Tunisie et preuve de co-infection

Depuis 2016, un virus provenant du Moyen Orient a émergé au Maroc et est devenu la première préoccupation dans le pays suspectant qu'il est plus pathogène que les souches précédentes du H9N2. A partir du Maroc, ce virus a diffusé à d'autres pays en Afrique de l'Ouest et à l'Algérie en 2017. En 2018, ce virus n'a pas été encore reporté en Tunisie et l'ancien virus de 2010 ne semble plus circuler dans ce pays. Malgré l'absence de statistique officielle, des échanges commerciaux informels de volaille vivante principalement des poussins d'un jour chair existent d'un pays à l'autre ce qui augmente les suspicions de l'émergence du virus H9N2 Marocain en Tunisie via l'Algérie.

Résumé de l'article :

La pathologie respiratoire est l'un des problèmes majeurs de santé pour la volaille commerciale dans le monde entier et qui est responsable d'énormes pertes économiques. Compte tenu de la mondialisation et des échanges commerciaux ainsi que des voies de migration des oiseaux, les virus respiratoires sont susceptibles de diffuser facilement et d'une façon continue d'un territoire à un autre. L'objectif principal de cette étude était d'étudier les agents pathogènes majeurs impliqués dans la pathologie respiratoire chez les volailles de chair en Tunisie et leurs épidémiologies. Entre 2018 et 2020, des élevages de poulets de chair au nord-est de la Tunisie ont été surveillés et 39 lots qui ont présenté des signes cliniques respiratoires ont été échantillonnés. Les échantillons ont été testés à l'aide d'un panel de tests PCR en temps réel pour la recherche de cinq virus respiratoires et de trois bactéries. La réémergence du virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène H9N2 (IAFP) a été détecté chez la volaille commerciale. La souche caractérisée était similaire à celle circulant en Afrique du Nord et de l'Ouest. Cet article représente le premier rapport de cette souche de H9N2 en Tunisie. La lignée GI-23 du virus de la bronchite infectieuse (BI) et le sous-type B du métapneumovirus aviaire (aMPV) ont également été rapporté pour la première fois chez les poulets de chair en Tunisie. Le virus H9N2 était le pathogène le plus détecté dans les lots testés, mais rarement seul, puisque 15 des 16 troupeaux positifs pour le H9N2 étaient co-infectés par au moins un autre pathogène respiratoire. À l'exception du virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI), tous les agents pathogènes criblés ont été détectés et, dans 61 % des cas respiratoires investigués, une combinaison d'agents pathogènes a été identifiée. Les principales combinaisons étaient H9N2+aMPV (8/39) et H9N2+BI (6/39), ce qui montre la forte contribution du VIAFP H9N2 à la pathologie respiratoire. Cette enquête de terrain a mis en évidence l'émergence de nouveaux virus respiratoires et a montré la complexité de la pathologie respiratoire en Tunisie. Une stratégie de surveillance complète et continue est donc nécessaire pour mieux prévenir et contrôler les pathogènes respiratoires en Tunisie.

Predominance of low pathogenic avian influenza virus H9N2 in the respiratory co-infections in broilers in Tunisia: a longitudinal field study, 2018-2020

Adam Jbenyeni[1,2], Guillaume Croville[1], Christophe Cazaban[2], Jean-Luc Guérin[1*]

[1] IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

[2] Ceva Santé Animale S.A., Libourne, France

[*] Corresponding author: jean-luc.guerin@envt.fr

Abstract

Respiratory diseases are a health and economic concern for poultry production worldwide. Given global economic exchanges and migratory bird flyways, respiratory viruses are likely to emerge continuously in new territories. The primary aim of this study was to investigate the major pathogens involved in respiratory disease in Tunisian broiler poultry and their epidemiology. Between 2018 and 2020, broilers farms in northeastern Tunisia were monitored, and 39 clinically diseased flocks were sampled. Samples were screened for five viral and three bacterial respiratory pathogens using a panel of real-time PCR assays. The reemergence of H9N2 low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) in commercial poultry was reported, and the Northern and Western African GI lineage strain was typed. The infectious bronchitis virus (IBV) GI-23 lineage and the avian metapneumovirus (aMPV) subtype B also were detected for the first time in broilers in Tunisia. H9N2 LPAIV was the most detected pathogen in the flocks tested, but rarely alone, as 15 of the 16 H9N2 positive flocks were co-infected. Except for infectious laryngotracheitis virus (ILTV), all of the targeted pathogens were detected, and in 61% of the respiratory disease cases, a combination of pathogens was identified. The major combinations were H9N2+aMPV (8/39) and H9N2+IBV (6/39), showing the high contribution

of H9N2 LPAIV to the multifactorial respiratory diseases. This field survey provided evidence of the emergence of new respiratory viruses and the complexity of respiratory disease in Tunisia. A comprehensive and continuous surveillance strategy therefore is needed to better control respiratory pathogens in Tunisia.

Keywords: mixed infections, poultry, respiratory disease complex, Influenza A Virus, H9N2 LPAIV, IBV, aMPV, NDV

Introduction

Over the past 20 years, the commercial poultry sector has grown rapidly in Tunisia. Production levels have doubled, and poultry have become the main source of protein in the country (FAO). Respiratory diseases pose a major health threat to commercial poultry worldwide, causing tremendous economic losses. The H9N2 low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) is the most prevalent avian influenza virus in the world [191]. In the late 1990s, H9N2 LPAIV already had been detected in Southeast Asia and the Middle East in domestic poultry. Since the 2000s, H9N2 LPAIV has become enzootic in Asia, the Middle East, and North and West Africa [192].

H9N2 LPAIV was detected in Tunisia for the first time in 2009. The strain, assumed to have originated from Pakistan, was replaced in 2012 by a genetically related virus that originated from the United Arab Emirates (UAE) and spread to Tunisia through Libya [181–183]. In early 2018, the surveillance of H9N2 LPAIV in migratory birds in Tunisia enabled the detection of two different strains of H9N2 LPAIV from the same lagoon in the northeast region of the country. The first was closely related to the Tunisian H9N2 strain of 2012 and was isolated from wild birds, whereas the second fell in the Northern and Western African H9N2 cluster and was isolated from lagoon water [193]. The earliest virus in the latter cluster was detected in Morocco in 2016, and has since become endemic in several North and West African countries like Algeria, Burkina-Faso, Ghana, Togo and Benin [182, 159, 187, 186, 39]. An H9N2 virus from the same cluster was detected in an infant in Senegal in 2019, exhibiting its potential zoonotic risk [194]. Over the past decade, other respiratory viruses affecting poultry also have emerged in Tunisia, including Newcastle disease virus (NDV) genotype VII.2 in 2013, a novel variant of infectious bronchitis virus (IBV) in 2016, and infectious laryngotracheitis virus (ILTV) between 2013 and 2016 [63, 184].

Previous studies have provided evidence of the multifactorial origin of respiratory diseases. A primary infection can be complicated by environmental factors (ammonia, dust, moisture etc.) and/or by co-infection with other pathogens [10, 195, 196]. Co-infection is likely to enhance the clinical signs and mortality of each of the pathogens involved through synergistic mechanisms operating between them. This seems to be true for H9N2 LPAIV, which under experimental conditions barely induces clinical signs in chickens, while in the field is correlated with severe clinical signs and high mortality [14, 39]. Several experimental infections succeeded in reproducing H9N2 LPAIV clinical signs in the field by co-infecting H9N2 alongside another pathogen such as IBV, NDV or *E. coli* [13, 121, 161, 197].

Given the repeated emergence and circulation of respiratory pathogens in the Tunisian commercial poultry sector, a comprehensive and longitudinal surveillance study is needed. In this study, we monitored broiler flocks in northeast Tunisia over three years to investigate the pathogens involved in the respiratory disease outbreaks observed and assess their longitudinal circulation. In the end we brought to light the emergence of three respiratory viruses on broiler farms in Tunisia between 2018 and 2020. We also conveyed that the respiratory diseases have a multifactorial etiology as 2/3rd of the flocks tested were co-infected.

Materials and methods

Context and sampling protocol

From January 2018 to June 2020, six farms belonging to the same broiler rearing company in Tunisia were monitored for respiratory outbreaks. These farms were located either in Ben Arous or in Nabeul, two northeastern Tunisian governorates (Figure 1). The farms were named using letters from A to F. Flocks showing acute respiratory signs were sampled within the first five days of an outbreak. The number of flocks sampled from the same farm during an outbreak depended on the health status of each one of the flocks. For each flock, 12 tracheal swabs were collected from diseased or freshly dead birds and immediately smeared onto the four circles of an FTA® card, with three swabs per circle. FTA® cards were dried for at least five minutes, labelled, placed in a Ziploc bag and transported on ice to be stored at -20 °C until later use [198]. A written form including information about the GPS location, age, date of the first respiratory signs, daily mortality and vaccination history was provided with each sampled flock.

FTA card preparation and nucleic acid extraction

Three disks of 2 mm diameter were punched out of each FTA® card's circle using a Whatman Harris Uni-Core™ puncher and pooled together in a 2 mL microcentrifuge tube with 300 µL of TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0) to soak the disks. The puncher was cleaned using pure ethanol between circles and cards. For nucleic acid elution, microcentrifuge tubes were vortexed for two hours with Vortex-Genie® 2 then briefly centrifuged. Then 150 µL of eluent were used for RNA and DNA extraction using the NucleoSpin RNA Virus extraction kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions.

Screening of respiratory pathogens

Samples were screened for a panel of eight respiratory pathogens including H9N2 LPAIV, IBV, NDV, aMPV and ILTV, *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), and *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Primers used for this study are listed in -Additional file 1[190]. Depending on the different pathogens' nucleic acid class, real-time PCR (qPCR) or RT-real-time PCR (RT-qPCR) assays were performed on an Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (Santa Clara, USA) and an Applied Biosystems ViiA7 thermocycler (Foster City, USA).

RT-qPCR for RNA amplification

The RNA viruses were screened using the iTaq™ universal SYBR® green one-step RT-qPCR kit (Bio-Rad, Hercules, USA). The reaction mix consisted of 5 µL of 2x iTaq mix, 0.125 µL of iScript reverse transcriptase, 0.3 µL of each primer (10 µM), 2.275 µL of nuclease free water and 2 µL of RNA with the following program: reverse transcription at 50 °C for 10 min and polymerase activation at 95 °C for 1 min followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 60 s. AIV M gene positive samples were further subtyped using [199] H9 primers following the same reaction setup and thermal cycling conditions of one-step RT-qPCR on a LightCycler 96® system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

qPCR for DNA amplification

The DNA viruses and bacteria were screened using LightCycler® 480 SYBR Green I Master qPCR kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). The reaction mix consisted of 5 µL of Master mix, 0.2 µL of each primer (10 µM), 2.6 µL of nuclease free water and 2 µL of DNA with the following program: pre-incubation at 95 °C for 10 min followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 15 s and extension at 72 °C for 15 s.

Sanger sequencing

Sequencing was performed only on material from FTA cards. The HA gene of H9N2 LPAIV was sequenced using universal primers described by Hoffmann et al. [200]. The complete fusion gene of NDV was sequenced using Esmaelizad et al. [201] primers to differentiate vaccine type strains from field challenge strains. A partial sequence (~950 base pairs) overlapping the small hydrophobic (SH) and attachment (G) gene of aMPV was generated using SH1+ and G6- primers described by Cecchinato et al. [202]. The partial S1 gene sequence of IBV (~300 base pairs) spanning the hypervariable region 3 (HVR3) was generated using Worthington et al. [203] nested PCR. For all viruses, PCR products were loaded on agarose gel and DNA fragments with the expected length were excised and purified using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the supplier's instructions. Purified DNA was prepared for Sanger sequencing and shipped to the sequencing external service of Eurofins genomics (Cologne, Germany).

Sequence treatment and phylogenetic analysis

Fasta format sequences were manually treated using the BioEdit v7.2.5 software package and consensus sequences were generated. The BLASTprogram [204] was used for comparison with sequences in the NCBI database. Sequences with high identity percentages were used to construct phylogenetic trees. MAFFT multiple sequence alignment program online version 7 was used to align sequences [205]. Maximum likelihood phylogenetic trees with 1000 bootstraps were created using MEGA 10 software: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 10.

Results

Farms and flocks

During the study period, a total of 39 flocks were investigated and sampled between January 2018 and June 2020. Due to logistical reasons, monitoring and sampling activities were interrupted between April and October 2019. Of these 39 flocks, 34 originated from the six monitored farms in the Ben Arous and Nabeul governorates (Figure 1). The number of flocks sampled from farms A, B, C, D, E and F were 1, 15, 2, 10, 4 and 2, respectively (Additional file 2). The five additional flocks came from farms that were not affiliated with the rearing company (referred to as "external farms") (Additional file 2) and were located in the Ben Arous,

Nabeul, Bizerte and Manouba governorates (Figure 1). The median age of all 39 flocks studied was 31 days, with a minimum age of 15 days. The daily mortality of the flocks studied ranged from 0.05% to 14.36% during the outbreak (Additional file 3). The respiratory signs observed included sneezing, coughing, foamy eye, and dyspnea. In terms of lesions, tracheitis, fibrinous cast in the trachea, pneumonia, petechial proventriculitis and inflammation of Harderian gland, spleen and caeca tonsils were recorded. All flocks were vaccinated against IBV and NDV. The IBV vaccination schedule comprised priming at the hatchery with a Mass-like vaccine and boosting on the farm with a 793B-like vaccine. For NDV, birds were primed at the hatchery with either a combination of a recombinant and a live virus vaccine or with a live virus vaccine only, and were boosted every 10 days using a live virus vaccine. None of the flocks had been vaccinated for H9N2 LPAIV or aMPV.

Molecular epidemiology

The qPCR assays showed a high detection of viral pathogens with at least one of the five screened viruses per flock. For the 39 tested flocks, 56 positive results for viruses were recorded. H9N2 LPAIV, IBV, aMPV and NDV were detected in 21 (54%), 20 (53%), 11 (28%), and 4 (10%) flocks, respectively. ILTV was not detected in any of the flocks. MS, ORT and MG were detected in 13 (33%), 12 (31%) and one (3%) flock, respectively (Table 1).

Although monitoring began in January 2018, it was not until April 2018 that H9N2 LPAIV was first detected. This virus continued to be detected until the end of the study on all of the monitored farms, exhibiting two waves of outbreaks. IBV was detected throughout the three-year study on all of the monitored farms except farms A and C. NDV was recorded in two flocks of farm D and in one external flock during the same period in February 2019. aMPV was first detected in February 2020, and continued to be detected until the end of the study on monitored and external farms (Table 1).

Respiratory co-infections

Altogether, the PCR tests performed on the 39 study flocks showed a total of 82 positive results, covering 4 viruses and 3 bacteria included in the panel, which confirms frequent co-infections and the diversity of respiratory pathogens in these Tunisian poultry holdings. The co-infections were detected in 24 (61%) of the 39 flocks and involved viruses and/or bacteria in combinations of two, three, four or five pathogens in 14, 2, 7 and 1 flock, respectively (Table 1). Co-infections involving only viruses occurred in 16 flocks. These viral-viral co-infection combinations were

mainly H9N2+aMPV, H9N2+IBV, IBV+aMPV and H9N2+IBV+aMPV, profiled in 8, 6, 1 and 1 co-infections, respectively. H9N2 LPAIV was the most involved pathogen, found in 15 of the 16 viral co-infected flocks. Co-infections involving viruses and bacteria occurred in 18 of the 24 co-infected flocks, and were divided in two groups. The first consisted of a bacterial superinfection of a viral-viral co-infection and occurred in 10 flocks; the second consisted of a bacterial superinfection of a single virus infection and occurred in 8 flocks. Again, H9N2 LPAIV was the most involved pathogen in the co-infections, with 18/21 H9N2 LPAIV positive flocks. H9N2 LPAIV co-infections were detected with ORT, MS, aMPV and IBV in 11, 10, 9, 7 flocks, respectively.

Phylogenetic analysis

H9N2 LPAIV

Complete (1.7 kb) or partial (1 kb) HA sequences of H9N2 LPAIVs from seven flocks were generated. HA gene sequences and related metadata were deposited in the GenBank database under accession numbers OQ179924- OQ179930 (Additional file 4). The phylogenetic tree showed that Tunisian H9N2 LPAIV viruses belonged to the h9.4.2 clade of the G1-like lineage and have a common ancestor with the United Arab Emirates H9N2 LPAIV virus (JX273562.1) (Figure 2). Our Tunisian H9N2 viruses clustered with those detected in Algeria and Morocco. The H9N2 LPAIV viruses detected during this study exhibit a nucleotide pairwise distance of 10% from the Tunisian H9N2 LPAIV of 2010.

Other viruses

NDV

Complete F gene sequences of NDVs from one monitored flock and one external flock were generated. F gene sequences and related metadata were deposited in the GenBank database under accession numbers OQ199524 and OQ199525 (Additional file 4). Referring to the revised nomenclature recommended by [64], the phylogenetic analysis showed that NDV sequences belonged to the genotype VII.2 (formerly VII-i) and shared 97% of nucleotide identity with the 2013 and 2015 Tunisian genotype VII.2 strains (Figure 3).

aMPV

Partial SH and G gene sequences of aMPVs were generated from eight flocks. G gene sequences and related metadata were deposited in the GenBank database under accession numbers OQ199508 and OQ199515 (Additional file 4). The phylogenetic analysis sorted G gene sequences into two different clusters within the subtype B, and were distinct from aMPV vaccine strains (Figure 4). The alignment of the SH and G gene sequences of the detected aMPVs and the reference sequence of aMPV revealed some genetic polymorphic features. These features consist of two or four nucleotide insertions in the noncoding region between the SH and G genes. Based on these two features, we were able to retrieve the two clusters obtained by the phylogenetic analysis of the G gene sequences. Two motifs of nucleotide insertions were found; the first involved the insertion of two nucleotides and the second the insertion of four nucleotides (Figure 5).

IBV

The partial S1 gene sequence of IBV was generated from 13 flocks. These sequences and related metadata were deposited in the GenBank database under accession numbers OQ199494 and OQ199507 (Additional file 4). To distinguish between vaccine and field type viruses, nucleotide identity between the detected IBV sequences and IBV vaccine sequences was used. The detected IBVs were considered a vaccine type when their nucleotide identity with a vaccine strain was 99% or more, and were considered a field challenge when their nucleotide identity was less than 99% [203]. Adopting [206] nomenclature, the phylogenetic analysis showed the presence of three GI lineages. Eleven, two and one sequence respectively fell in the GI-13, GI-23 and GI-1 lineages. GI-13 were 793B vaccine-like sequences and homologous to either 4/91 (eight sequences) or CR88 vaccine strains (three sequences). The GI-23 sequences shared 95% of nucleotide identity with both the Israeli variant 2 strain (AF093796) and the Libyan GI-23 strains detected in 2012 (Figure 6).

Discussion

In this study, we monitored over a three year-period spontaneous acute respiratory cases on broiler farms operated by the same rearing company in Tunisia. Our aim was to investigate the major respiratory pathogens involved in respiratory diseases in the northeastern region of Tunisia and their longitudinal circulation.

The design of our study, which involved targeting a large panel of respiratory pathogens and sampling clinically diseased birds during the early stage of a respiratory outbreak, enabled us

to detect at least one viral pathogen per flock with high viral loads. We even detected aMPV (Ct 15), which is known to be difficult to detect due to its short shedding window (Additional file 3) [207].

Importantly, we found that H9N2 LPAIV was the most detected respiratory pathogen (54%) on the farms monitored. H9N2 LPAIV was enzootic on the monitored farms in 2018 and 2020, with outbreaks occurring during spring and summer. However, we cannot confirm the seasonality of H9N2 LPAIV due to the interruption of field monitoring that occurred during the study period. Further investigation is therefore required. The phylogenetic analysis revealed that the H9N2 LPAIV viruses detected in 2018 and 2020 were monophyletic, belonged to the G1 lineage and clustered with Northern and Western African viruses introduced from the Middle East in 2016 [182]. In addition, the H9N2 LPAIV strain reported here was distant from the old Tunisian G1 lineage that emerged in 2009 and that was detected until 2016 on poultry farms, and until 2018 in migratory birds [181, 183]. The phylogenetics of H9N2 LPAIV suggest a new introduction of H9N2 LPAIV in Tunisia. This study is the first to report the circulation of the Northern and Western African clade of H9N2 LPAIV in poultry in Tunisia. Interestingly, during the same period in 2018, the first detection of H9N2 LPAIV coincided with the detection of a very closely related virus (99%) from the water of a lagoon in the same region of Tunisia [193]. Our findings support the hypothesis proposed by Larbi et al. [193] that the transmission of H9N2 LPAIV occurs from poultry farms to migratory birds via their contamination of the environment as strains isolated from the water and the migratory birds on the same site were different. Considering the close phylogenetic relatedness between the H9N2 LPAIV introduced in Tunisia and those circulating in neighboring countries during the same period, we assume that the new introduction occurred through the trade of poultry or poultry products.

The second most detected virus on the farms monitored was IBV (53%), with an enzootic circulation over the study period. The phylogenetic analysis showed the dominance of GI-13 vaccine-like strains (793B). This finding is common as GI-13 live virus vaccines are used widely on poultry. The rolling infection of birds with vaccine viruses within a flock, when the initial coverage is incomplete, can lead to vaccination reactions, thus complicating diagnostic efforts [208]. Given the epidemiological context in Tunisia, an infection with a rolling IBV vaccine strain could be co-infected by H9N2 LPAIV which leads to the exacerbation of the clinical signs [162, 169]. In this study, we report the detection of the GI-23 lineage (variant 2) for the first time in Tunisia. Over the three years of the study period, variant 2 was detected twice, five months apart, on the same farm. The lack of spread of the GI-23 virus to the other

farms monitored and its occasional detection suggest a cross protection of Massachusetts and 793B combination against variant 2, as also described in previous studies [209, 210]. However, we cannot draw conclusions about the prevalence of this lineage in Tunisia; active and continuous surveillance of this variant therefore is required.

The detection of aMPV started in February 2020 and lasted until June 2020. During this period, aMPV was detected on both monitored and external farms (28%) in the different governorates, indicating the emergence and circulation of a new aMPV in broilers. Lachheb et al. [211] also reported the detection of an aMPV field strain in 2019 in broilers. Unfortunately, we were not able to determine the phylogenetic relatedness of the previously described virus with the detected aMPVs during this study as the sequence was not published. The phylogenetic analysis grouped the detected aMPVs in two different clusters within the subtype B and outside of the vaccine strains cluster, suggesting the circulation of two different field strains. We noticed that these aMPVs held polymorphic features in their SH-G non-coding region which do not exist in other aMPVs. Noncoding regions have different biological roles, including the regulation of viral replication, viral persistence, host immune evasion, and cellular transformation [212]. These insertions consequently should not be neglected, and pathogenicity studies are required.

NDV genotype VII.2 was detected during the same period in two flocks on the same monitored farm and on one external farm, showing an epizootic circulation of this virus. This sporadic detection of NDV could be explained by the reinforcement of NDV control measures. After genotype VII.2 emerged in 2013 in Tunisia, it was recommended to add NDV live vaccine boosters every ten days in broilers and to use NDV vector vaccines. The phylogenetic analysis of NDV showed that the detected viruses are identical and share the most recent common ancestor with previously reported viruses in Tunisian (KU175357) and Libya [213].

Bacterial pathogens also were highly detected, even though samples were collected in the acute respiratory phase showing an early bacterial superinfection. To the best of our knowledge, mycoplasma prevalence in poultry in Tunisia has not yet been studied. Based on the global prevalence of MG and MS, the low detection of MG (one flock) in contrast with the high detection of MS (33%) is in line with their reported occurrence in all poultry populations. However, our results are not in line with the global occurrence of MG and MS in broiler poultry, which are reported to be approximately the same (around 25%) [214]. The lower rate of MG compared to MS could be explained by control measures that are oriented more toward MG than MS in breeding birds, thereby reducing MG vertical transmission in broilers. Considering

these results, we are tempted to say that control measures in Tunisia have reduced the occurrence of MG on broiler farms. Nevertheless, more studies on mycoplasma in different poultry populations are needed to monitor the effectiveness of MG and MS control measures and adapt them accordingly. Surprisingly, the detection rate of ORT was very high (100%) in the 12 flocks tested. The screening of ORT was included in our respiratory panel in 2020 and only flocks sampled that year were tested. Even so, these results draw our attention to the likely contribution of this pathogen to respiratory disease in broilers. Our results are consistent with the few existing ORT studies in other countries suggesting the underdiagnosis of this pathogen [121, 215–217].

Interestingly, co-infections between respiratory pathogens were very frequent as 61% of the flocks studied were positive for two or more pathogens. Our results are consistent with the results of similar studies [10, 196] confirming the complexity of respiratory disease and its diagnosis in the field. Viral co-infections occurred in 16 of the 39 flocks studied; of these, H9N2 LPAIV was the major contributor (15/16). The dominance of co-infections by H9N2 LPAIV could be explained by the high detection rate of H9N2 LPAIV in the flocks studied, and could explain the clinical signs associated with H9N2 LPAIV positive flocks. In these co-infections, the major viral combinations were H9N2+IBV (6/16) and H9N2+aMPV (8/16). Several experimental studies have shown that co-infections with H9N2 LPAIV and IBV consistently result in more severe clinical signs than single infections with either H9N2 LPAIV or IBV, regardless of the virulence of the IBV strain [14, 162, 169]. This synergy between H9N2 LPAIV and IBV could be explained either by the severe inflammatory response induced by IBV [13], or by the trypsin-like serine protease encoded by IBV which probably facilitates the cleavage activation of the hemagglutinin of the H9N2 LPAIV virus, and thus increases its replication [156, 218]. In contrast, little is known about co-infection mechanisms between H9N2 LPAIV and aMPV as to the best of our knowledge this co-infection has not been previously reported. Clinical manifestations of aMPV in broilers are absent or mild, so co-infections with H9N2 LPAIV could explain the clinical manifestation of flocks positive for aMPV [219]. All of the flocks co-infected with H9N2 and aMPV also were positive for ORT, making it even more difficult to understand the sequential order of co-infections and the synergistic effect between the three pathogens. Only dual co-infections between ORT and H9N2 or aMPV and ORT were previously studied by experimental infections. Pan et al. [121] showed that in broilers, a co-infection involving H9N2 and ORT, either simultaneously or primed by ORT, increased mortality by 60% to 70% respectively comparing to a single infection with H9N2 LPAIV.

Similarly, Marien et al. [78] showed that a prior infection of ORT with aMPV enabled the reproduction of respiratory disease in specific pathogen free (SPF) turkeys, which was not possible by the inoculation of ORT alone via the natural infection route.

In conclusion, this study brought to light the emergence of three new respiratory viruses in Tunisia, as well as several respiratory co-infections. The introduction of a new G1 lineage of H9N2 LPAIV, GI-23 lineage of IBV and subtype B of aMPV was shown, which highlights the importance of active and continuous surveillance and points to an urgent need to adjust control measures to the current situation. The high frequency of the co-infection between H9N2 LPAIV and aMPV suggests that it would be relevant to study the mechanisms of a likely synergism between these two viruses. The complexity of respiratory disease demonstrated in the study emphasizes the need to adopt a comprehensive diagnostic approach for multifactorial respiratory diseases.

Ethics approval and consent to participate

All farms enrolled in the study followed their own management practices. No protocol approval from the ethics committee of Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) was required.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request. The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was performed in the framework of the PhD program of Adam Jbenyeni, hosted by the Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) and funded by Ceva Santé Animale S.A., with the cofunding by the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (Grant: CIFRE - 2019/1605).

Authors' contributions

JLG, GC and CC: contributed to the conception and the design of the study. Samples collected by AJ. PCR analyses were conducted by AJ and were interpreted by AJ and GC. Data was curated by AJ. AJ drafted the first manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Tunisian rearing company for offering us the possibility to collect samples and data from its farms. We also thank Professor Moncef Bouzouaia, DVM, from the Ecole Nationale Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisia for his help and effort dedicated to the project.

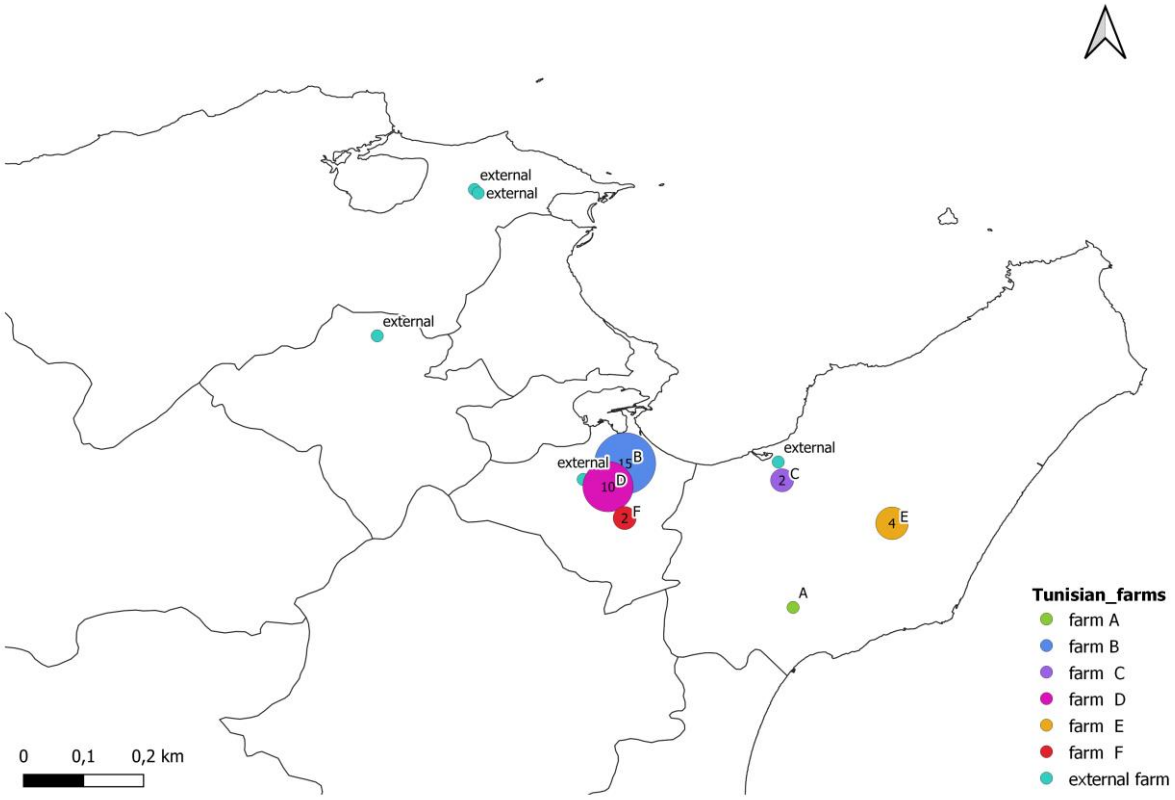


Figure 1 Geographic distribution of tested flocks on monitored and external broiler farms in Tunisia. Circles on the map represents the surveyed farms and the numerical value represents the cumulative number of sampled flocks in each farm. The monitored farms were distributed in two governorates, Nabeul in the east of the country, and Ben Arous in the west. The map was created using QGIS3 software.



Figure 2 Phylogenetic tree of H9N2 LPAIV. The tree was constructed using the HA gene nucleotide sequences. Sequences from this study were labelled with red triangle, Tunisian sequences available in GenBank were labelled with black circle and G1 lineage sequences from Africa and the Middle East and reference sequences of other H9N2 lineages were unlabelled. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with General Time Reversible model and 1000 bootstrap replications in MEGA X. All nucleotide positions containing gaps and missing data were eliminated. A total of 924 positions were included in the final dataset. Only bootstrap values higher than 60 were conserved.

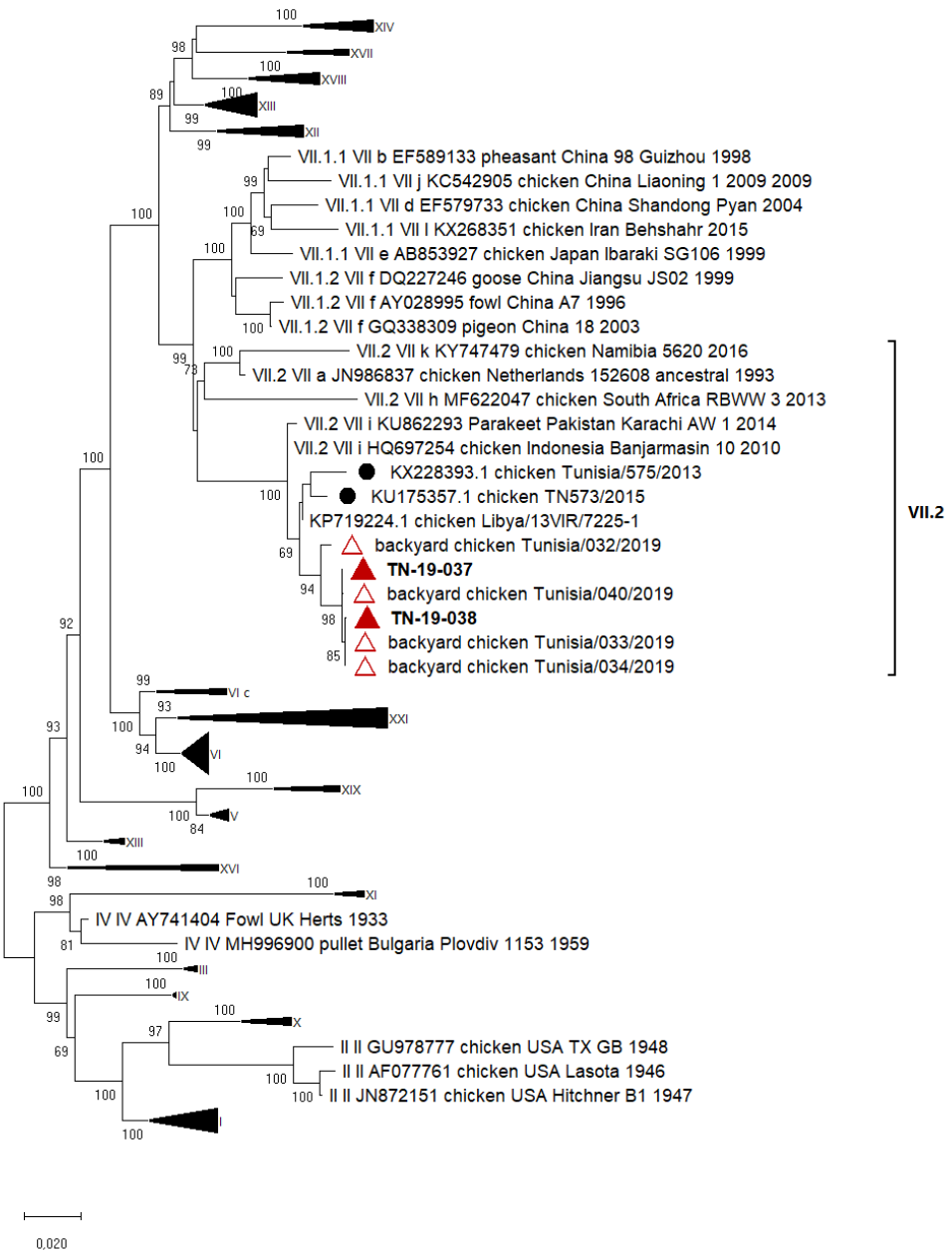


Figure 3 Phylogenetic tree of NDV. The tree was constructed using F gene nucleotide sequences of Class II NDV. Sequences from this study were labelled with filled red triangle, previous NDV Tunisian sequences available in GenBank were labelled with black circle, 2019 NDV sequences from Tunisian backyard chickens were labelled with empty red triangle and reference sequences were unlabelled. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with Tamura 3-parameter model and 1000 bootstrap replications in MEGA X. All nucleotide positions containing gaps and missing data were eliminated. A total of 1675 positions were included in the final dataset. Only bootstrap values higher than 60 were conserved.

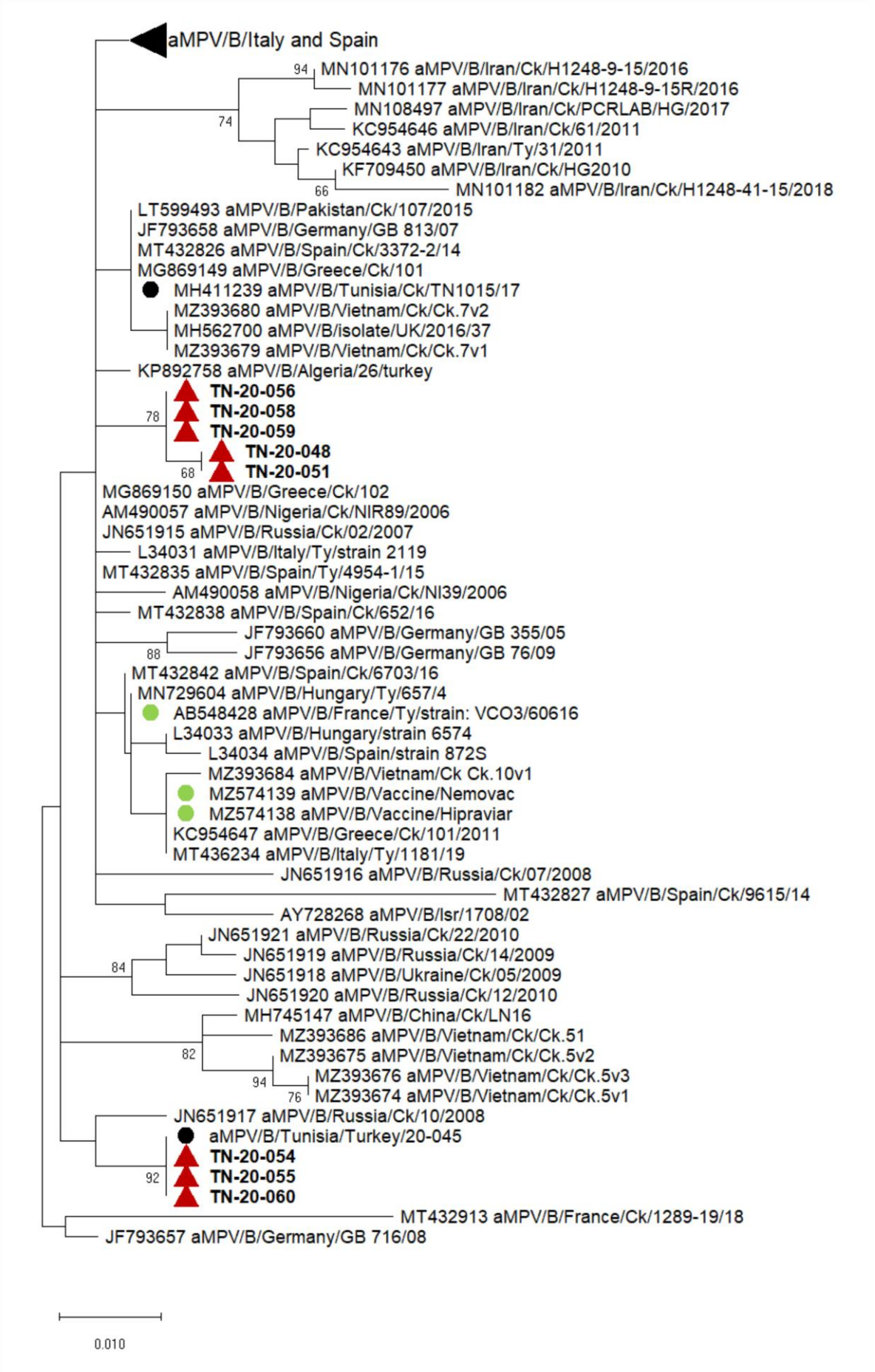

aMPV/B/Italy and Spain
94
MN101176 aMPV/B/Iran/Ck/H1248-9-15/2016
MN101177 aMPV/B/Iran/Ck/H1248-9-15R/2016
74
MN108497 aMPV/B/Iran/Ck/PCRLAB/HG/2017
KC954646 aMPV/B/Iran/Ck/61/2011
KC954643 aMPV/B/Iran/Ty/31/2011
KF709450 aMPV/B/Iran/Ck/HG2010
66
MN101182 aMPV/B/Iran/Ck/H1248-41-15/2018
LT599493 aMPV/B/Pakistan/Ck/107/2015
JF793658 aMPV/B/Germany/GB 813/07
MT432826 aMPV/B/Spain/Ck/3372-2/14
MG869149 aMPV/B/Greece/Ck/101
MH411239 aMPV/B/Tunisia/Ck/TN1015/17
MZ393680 aMPV/B/Vietnam/Ck/Ck.7v2
MH562700 aMPV/B/isolate/UK/2016/37
MZ393679 aMPV/B/Vietnam/Ck/Ck.7v1
KP892758 aMPV/B/Algeria/26/turkey
TN-20-056
78
TN-20-058
TN-20-059
TN-20-048
68
TN-20-051
MG869150 aMPV/B/Greece/Ck/102
AM490057 aMPV/B/Nigeria/Ck/NIR89/2006
JN651915 aMPV/B/Russia/Ck/02/2007
L34031 aMPV/B/Italy/Ty/strain 2119
MT432835 aMPV/B/Spain/Ty/4954-1/15
AM490058 aMPV/B/Nigeria/Ck/NI39/2006
MT432838 aMPV/B/Spain/Ck/652/16
JF793660 aMPV/B/Germany/GB 355/05
88
JF793656 aMPV/B/Germany/GB 76/09
MT432842 aMPV/B/Spain/Ck/6703/16
MN729604 aMPV/B/Hungary/Ty/657/4
AB548428 aMPV/B/France/Ty/strain: VCO3/60616
L34033 aMPV/B/Hungary/strain 6574
L34034 aMPV/B/Spain/strain 872S
MZ393684 aMPV/B/Vietnam/Ck Ck.10v1
MZ574139 aMPV/B/Vaccine/Nemovac
MZ574138 aMPV/B/Vaccine/Hipraviar
KC954647 aMPV/B/Greece/Ck/101/2011
MT436234 aMPV/B/Italy/Ty/1181/19
JN651916 aMPV/B/Russia/Ck/07/2008
MT432827 aMPV/B/Spain/Ck/9615/14
AY728268 aMPV/B/Isr/1708/02
JN651921 aMPV/B/Russia/Ck/22/2010
JN651919 aMPV/B/Russia/Ck/14/2009
84
JN651918 aMPV/B/Ukraine/Ck/05/2009
JN651920 aMPV/B/Russia/Ck/12/2010
MH745147 aMPV/B/China/Ck/LN16
MZ393686 aMPV/B/Vietnam/Ck/Ck.51
82
MZ393675 aMPV/B/Vietnam/Ck/Ck.5v2
94
MZ393676 aMPV/B/Vietnam/Ck/Ck.5v3
76
MZ393674 aMPV/B/Vietnam/Ck/Ck.5v1
JN651917 aMPV/B/Russia/Ck/10/2008
aMPV/B/Tunisia/Turkey/20-045
TN-20-054
92
TN-20-055
TN-20-060
MT432913 aMPV/B/France/Ck/1289-19/18
JF793657 aMPV/B/Germany/GB 716/08
0.010

Figure 4 Phylogenetic tree of aMPV. The tree was constructed using G gene nucleotide sequences. Sequences from the present study were labelled with red triangle, previous Tunisian sequence were labelled with black circle, vaccine sequences were labelled with green circle and other aMPV-B sequences available in GenBank were unlabelled. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with Tamura 3-parameter model and 1000 bootstrap replications in MEGA X. All nucleotide positions containing gaps and missing data were eliminated. A total of 292 positions were included in the final dataset. Only bootstrap values higher than 65 were conserved.

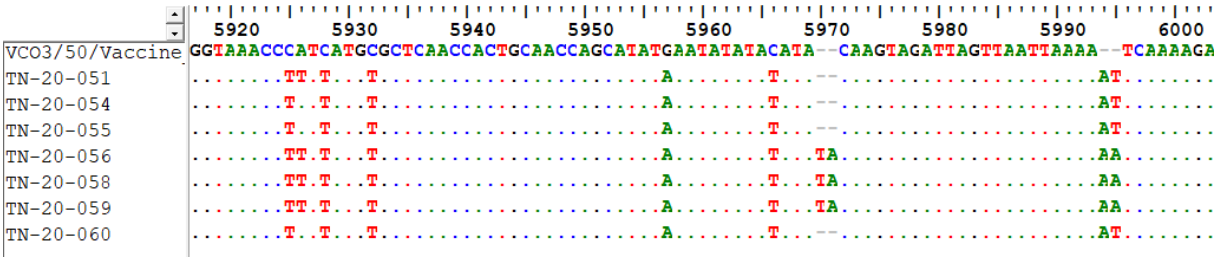


Figure 5 The genetic polymorphic features of Tunisian aMPV sequences. The alignment of the noncoding region between SH and G genes of Tunisian aMPV sequences from this study with VCO3 reference sequence showed the presence of two motifs of nucleotide insertions highlighted in the red frames.

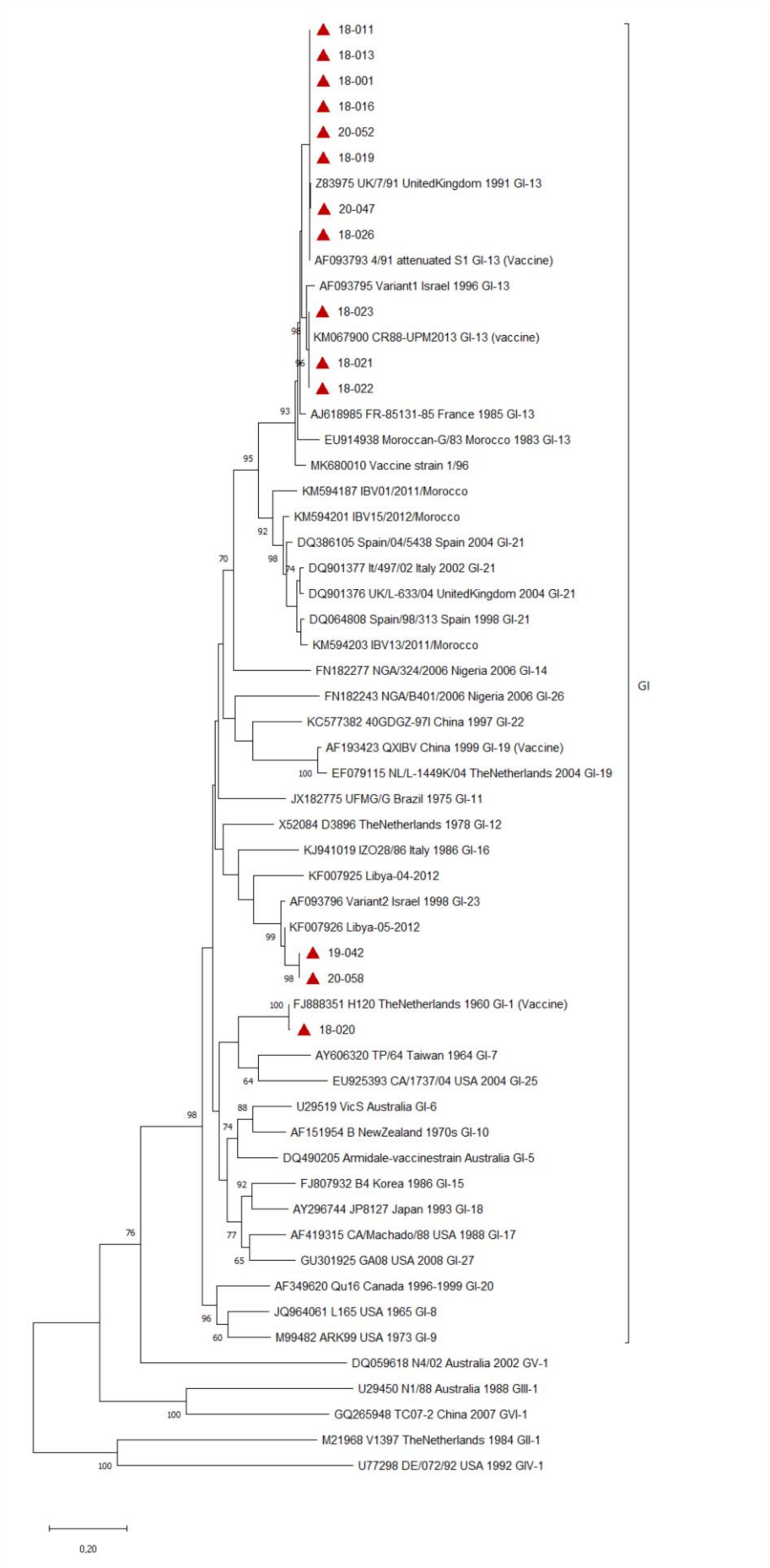

18-011
18-013
18-001
18-016
20-052
18-019
Z83975 UK/7/91 UnitedKingdom 1991 GI-13
20-047
18-026
AF093793 4/91 attenuated S1 GI-13 (Vaccine)
AF093795 Variant1 Israel 1996 GI-13
18-023
KM067900 CR88-UPM2013 GI-13 (vaccine)
18-021
18-022
AJ618985 FR-85131-85 France 1985 GI-13
EU914938 Moroccan-G/83 Morocco 1983 GI-13
MK680010 Vaccine strain 1/96
KM594187 IBV01/2011/Morocco
KM594201 IBV15/2012/Morocco
DQ386105 Spain/04/5438 Spain 2004 GI-21
DQ901377 It/497/02 Italy 2002 GI-21
DQ901376 UK/L-633/04 UnitedKingdom 2004 GI-21
DQ064808 Spain/98/313 Spain 1998 GI-21
KM594203 IBV13/2011/Morocco
FN182277 NGA/324/2006 Nigeria 2006 GI-14
FN182243 NGA/B401/2006 Nigeria 2006 GI-26
KC577382 40GDGZ-97I China 1997 GI-22
AF193423 QXIBV China 1999 GI-19 (Vaccine)
EF079115 NL/L-1449K/04 TheNetherlands 2004 GI-19
JX182775 UFMG/G Brazil 1975 GI-11
X52084 D3896 TheNetherlands 1978 GI-12
KJ941019 IZO28/86 Italy 1986 GI-16
KF007925 Libya-04-2012
AF093796 Variant2 Israel 1998 GI-23
KF007926 Libya-05-2012
19-042
20-058
FJ888351 H120 TheNetherlands 1960 GI-1 (Vaccine)
18-020
AY606320 TP/64 Taiwan 1964 GI-7
EU925393 CA/1737/04 USA 2004 GI-25
U29519 VicS Australia GI-6
AF151954 B NewZealand 1970s GI-10
DQ490205 Armidale-vaccinestrain Australia GI-5
FJ807932 B4 Korea 1986 GI-15
AY296744 JP8127 Japan 1993 GI-18
AF419315 CA/Machado/88 USA 1988 GI-17
GU301925 GA08 USA 2008 GI-27
AF349620 Qu16 Canada 1996-1999 GI-20
JQ964061 L165 USA 1965 GI-8
M99482 ARK99 USA 1973 GI-9
GI
DQ059618 N4/02 Australia 2002 GV-1
U29450 N1/88 Australia 1988 GIII-1
GQ265948 TC07-2 China 2007 GVI-1
M21968 V1397 TheNetherlands 1984 GII-1
U77298 DE/072/92 USA 1992 GIV-1
0,20

Figure 6 Phylogenetic tree of IBV. The tree was constructed using IBV HVR3 nucleotide sequences. The sequences from the present study were labelled with red triangle and reference sequences of the different IBV lineages available in GenBank were unlabelled. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with General Time Reversible model and 1000 bootstrap replications in MEGA X. A total of 1875 positions were included in the final dataset. Only bootstrap values higher than 60 were conserved.

Table 1. qPCR positive results and number of pathogens detected per flock.

Pathogen / Flocks ID	Viral				Bacterial			Number of pathogens detected per flock
	H9N2	NDV	IBV	aMPV	Ms	Mg	ORT	
18-001	-[a]	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-003	-	-	**1**	-	**1**	-	N.D	**2**
18-004	**1**[b]	-	-	-	**1**	-	N.D	**2**
18-007	**1**	-	-	-	**1**	-	N.D	**2**
18-008	**1**	-	-	-	-	-	N.D	**1**
18-010	**1**	-	-	-	-	-	N.D	**1**
18-011	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-012	**1**	-	**1**	-	-	-	N.D	**2**
18-013	**1**	-	**1**	-	-	-	N.D	**2**
18-014	**1**	-	-	-	-	-	N.D	**1**
18-015	**1**	-	**1**	-	-	-	N.D	**2**
18-016	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-017	**1**	-	**1**	-	-	-	N.D	**2**
18-019	**1**	-	**1**	-	-	-	N.D	**2**
18-020	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-021	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-022	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-023	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-026	-	-	**1**	-	**1**	-	N.D	**2**
18-028	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
18-029	-	-	**1**	-	-	-	N.D	**1**
19-035	-	**1**	-	-	-	-	N.D	**1**
19-036	-	**1**	-	-	**1**	-	N.D	**2**
19-037	-	**1**	-	-	-	-	N.D	**1**
19-038	-	**1**	-	-	-	-	N.D	**1**
19-042	-	-	**1**	-	-	**1**	N.D	**2**
20-047	-	-	**1**	**1**	-	-	N.D	**2**
20-048	-	-	-	**1**	-	-	**1**	**2**
20-049	**1**	-	-	-	-	-	**1**	**2**
20-051	**1**	-	-	**1**	-	-	**1**	**3**
20-052	**1**	-	**1**	-	**1**	-	**1**	**4**
20-053	**1**	-	-	**1**	**1**	-	**1**	**4**
20-054	**1**	-	-	**1**	**1**	-	**1**	**4**
20-055	**1**	-	-	**1**	**1**	-	**1**	**4**
20-056	**1**	-	-	**1**	-	-	**1**	**3**
20-057	**1**	-	-	**1**	**1**	-	**1**	**4**
20-058	**1**	-	**1**	**1**	**1**	-	**1**	**5**
20-059	**1**	-	-	**1**	**1**	-	**1**	**4**
20-060	**1**	-	-	**1**	**1**	-	**1**	**4**
Total	**21**	**4**	**20**	**11**	**13**	**1**	**12**	**82**

In this table, we reported the qPCR positive results and the number of pathogens detected per flock as well as the total number of detections for the eight screened pathogens: H9N2, low pathogenic avian influenza virus; aMPV, Avian metapneumovirus; IBV, Infectious Bronchitis virus; ILTV, Infectious Laryngotracheitis virus; MG, *Mycoplasma gallisepticum*; MS, *Mycoplasma synoviae*; NDV, Newcastle Disease virus; ORT, *Ornithobacterium rhinotracheale*.

N.D: not done.
[a]Negative
[b]Positive

Additional files

Additional file 1. Oligonucleotides set used for the PCR screening of respiratory pathogens. The targeted gene, the primers' nucleotide sequences and the amplicon size for each one of the eight screened pathogens were listed in this file.

Additional file 2. Investigated flocks' information. The date of sampling, the farm and governorate of origin, the size and the age of the investigated flocks were showed in this file.

Additional file 3. The qPCR Ct values of detected pathogens. The Age, the mortality, and the qPCR Ct values of the detected pathogens per flocks were listed in this file.

Additional file 4. GenBank accession numbers of nucleotide sequences generated during this study. The virus sequences generated during this study were submitted to GenBank database under the accession numbers listed in this additional file.

Deuxième chapitre :

Etude de la contribution des pathogènes respiratoires majeurs à la pathologie respiratoire, la complexité de son étiologie et le rôle de H9N2 et sa dynamique

1. Epidémiologie des agents pathogènes respiratoires au Maghreb

Durant la dernière décennie, plusieurs agent pathogènes respiratoires ont été détectés dans les différents pays du Maghreb. Ces détections n'ont pas été suivies par des études épidémiologiques pour connaitre la prévalence de ces agents dans les élevages de volailles ainsi que leur évolution génétique au cours du temps. La recherche des agents pathogènes respiratoires majeurs lors cas respiratoires aigües va permettre de savoir à la fois le niveau de contribution de chaque pathogène dans la maladie respiratoire, la nature de circulation.

2. Contribution et rôle du virus H9N2 aux syndromes respiratoires aigus

Depuis l'introduction de H9N2 au Maghreb, la détection de ce virus est de plus en plus fréquente sur le terrain laissant penser que H9N2 et la cause majeure des maladies respiratoires chez la volaille. La surestimation de la contribution de H9N2 dans ces épisodes respiratoires est peut-être due à l'absence de recherche de co-infections associant d'autres pathogènes respiratoires. La similarité des tableaux cliniques et lésionnels des différentes maladies respiratoire ne permet pas de différencier entre elles.

Le rôle de H9N2 comme *agent inducteur* de la maladie respiratoire et la co-infection ou en tant qu'*agent de complication* n'est pas très clair. Connaitre le rôle de H9N2 dans la maladie respiratoire est très important, car cette information devrait permettre de mieux évaluer l'importance de la lutte contre ce virus et les mesures de contrôle à mettre en place.

Résumé de l'article :

Les maladies respiratoires causées par des agents pathogènes indépendants sont l'exception sur le terrain, néanmoins les co-infections entre plusieurs agents pathogènes viraux et/ou bactériens sont plus couramment observées spontanément. La co-infection entre plusieurs agents pathogènes augmente généralement la pathogénicité et les signes cliniques de ces agents pathogènes pris individuellement. C'est le cas du virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène (IAFP) H9N2, comme il a été démontré que la co-infection de ce virus avec des agents pathogènes viraux ou bactériens augmentait la gravité de ses signes cliniques. L'objectif de cette étude était de vérifier la multi-étiologie des syndromes aigus respiratoires dans des épisodes spontanés chez les poulets de chair commerciaux en Algérie, au Maroc et en Tunisie et d'évaluer la fréquence de la co-infection du H9N2 avec le virus de la bronchite infectieuse (BI), le virus de la maladie de Newcastle (MN), le métapneumovirus aviaire (aMPV), le virus de la laryngotrachéite infectieuse (LTI) et *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Durant deux ans de surveillance, 300 troupeaux de volailles de chair présentant des signes respiratoires aigus ont été inclus et ont fait l'objet d'un criblage pour un panel de cinq pathogènes respiratoires viraux et de trois pathogènes respiratoires bactériens. 99 % de ces troupeaux étaient au moins positifs pour un agent pathogène viral et 82 % présentaient des co-infections. Les huit pathogènes testés ont été détectés dans les trois pays, à l'exception du MG et du virus de la LTI en Tunisie ; cependant, le virus IAFP H9N2 était le plus souvent détecté. Le H9N2 a été détecté dans 88 % de ces foyers respiratoires, dont 85 % étaient co-infectés et été détecté dans des coinfections impliquant les sept autres pathogènes. Cependant les co-infections de H9N2 avec l'IBV et l'aMPV étaient les plus fréquemment observées. Notre étude a montré la co-circulation des huit agent pathogènes respiratoires majeurs en Afrique du Nord et la complexité de l'étiologie des maladies respiratoires dans la production de poulets de chair en Afrique du Nord. Elle montre également la forte contribution du virus H9N2 aux syndromes aigus respiratoires par son taux de détection élevé et la fréquence des co-infections. Le H9N2 a, vraisemblablement, un rôle dans l'induction et la complication des syndromes aigus respiratoires. Cette étude montre le réel besoin d'un plan de lutte contre le virus IAFP H9N2 afin de contrôler les maladies respiratoires en Afrique du Nord.

A multiple pathogens screening survey in North Africa showed the multicausal nature of respiratory diseases and the high co-infection capacity of LPAIV H9N2: 2020-2022

(Running title: high co-infection rate of LPAIV H9N2 in North Africa)

Adam Jbenyeni[1,2], Guillaume Croville[1], Christophe Cazaban[2] & Jean-Luc Guérin[1#]

[1] IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

[2] Ceva Santé Animale S.A., Libourne, France

[#]**Corresponding author:**

Jean-Luc Guérin

IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

jean-luc.guerin@envt.fr

Abstract

Respiratory diseases caused by individual pathogens are the exception under field conditions as co-infections between multiple viral and bacterial pathogens are more commonly observed in commercial poultry production. The co-infection between multiple pathogens usually increases the pathogenicity and the clinical outcome of these pathogens individually. This is true for low pathogenicity avian influenza virus (LPAIV) H9N2 as the co-infection with viral and bacterial pathogens was shown to increase the severity of its clinical signs. The aim of this study was to verify the multicausal origin of respiratory disease complex in spontaneous respiratory outbreaks in commercial broilers in Algeria, Morocco and Tunisia and to assess the co-infection frequency of H9N2 with infectious bronchitis virus (IBV), Newcastle disease virus (NDV), avian metapneumovirus (aMPV), infectious laryngotracheitis virus (ILTV) and *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). In a two-year study, 300 meat type poultry flocks showing acute respiratory signs were included and

screened for a panel of five viral and three bacterial respiratory pathogens. 99% of these flocks were at least positive for one viral pathogen and 82% held co-infections. The eight tested pathogens were detected in the three countries except MG and ILTV in Tunisia; however, LPAIV H9N2 was the most predominant. LPAIV H9N2 was detected in 88% of these respiratory outbreaks, 85% of which were co-infected. LPAIV H9N2 was found to co-infect the seven other pathogens however co-infections with IBV and aMPV were the most frequent. Our study shows the co-circulation of eight of the main respiratory pathogens in North Africa and demonstrate the complexity of the respiratory diseases' aetiology in broiler production in Northern Africa. It also shows the high contribution of LPAIV H9N2 to the respiratory disease complex by its high detection and co-infection. LPAIV H9N2 contributes also to the respiratory disease complex by inducing and complicating it. This study shows the real need for a prevention plan for LPAIV H9N2 in order to control the respiratory diseases in Northern Africa.

KEYWORDS: Respiratory disease complex, mixed infections, AIV, Algeria, Morocco, Tunisia

INTRODUCTION

Low pathogenicity avian influenza virus (LPAIV) of H9N2 subtype is the most widespread avian influenza virus (AIV), since it is endemic in Africa, Middle East and Asia, causing significant economic losses for commercial poultry [31]. In North Africa, LPAIV H9N2 was first detected in Libya (2006) [220] and Tunisia (2009) [181]. More recently, a LPAIV H9N2 from a Middle Eastern source was detected in Morocco (2016) [39], Algeria (2017) [188] and Tunisia (2018) (Jbenyeni et al. 2023). In these North African countries, the number of clinical suspicions of LPAIV H9N2 has increased and has been more frequently associated with mortality, raising concerns about the increased pathogenicity of this low pathogenicity virus. Because of the enzootic circulation of H9N2 in these North African countries, H9N2 inactivated vaccines are routinely used in breeder hens and in some broiler flocks. Respiratory diseases are considered to be a complex health problem as many factors like environment (particulate matter, ammonia…) [221], and co-infections of multiple pathogens are likely to contribute to the onset and severity of the disease [14]. From an etiological point of view, respiratory diseases are considered to be multicausal as they result more often from multiple causes in the field [10, 165, 166]. The role of concomitant infections in exacerbating the severity of LPAIV H9N2 clinical signs is well documented [121, 161, 222, 223]. For instance, IBV may increase the replication and broaden the tissue tropism of

H9N2 by encoding for a trypsin-like serine protease and facilitating the cleavage activation of the hemagglutinin [156]. Other researchers suggested that IBV may change the stability of H9N2 hemagglutinin [224] or may induce severe inflammatory response [13] increasing the pathogenicity of H9N2.

However, the hypothesis of LPAIV co-infections in spontaneous acute respiratory cases in North Africa was not tested before. This cross-sectional study aimed to assess the actual contribution and the role of LPAIV in spontaneous respiratory disease outbreaks in Algeria, Tunisia and Morocco in broiler flocks in field conditions. In this study we also aimed at describing and quantifying the possible co-infections of LPAIV H9N2 with the other respiratory pathogens. To address these aims, broiler flocks showing acute respiratory disease signs were sampled and tested for a panel of five viruses (LPAIV H9N2, infectious bronchitis virus (IBV), Newcastle disease virus (NDV), avian metapneumovirus (aMPV), infectious laryngotracheitis virus (ILTV) and) and three bacteria (*Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT)).

The screening of the eight main respiratory pathogens in poultry became possible thanks to the latest molecular biology tools which offered a unique opportunity to study simultaneously the epidemiology of multiple pathogens. In this study we demonstrated a very high contribution of LPAIV H9N2 to the respiratory disease complex (88% of the cases). LPAIV H9N2 was very frequently co-infected with the other pathogens (85%). LPAIV H9N2 was found to co-infect all the other seven pathogens; however, it was more frequently paired with IBV, aMPV and bacterial pathogens. LPAIV H9N2 was found to infect more frequently flocks that were older than three weeks of age suggesting the role of MDAs in delaying the infection; interestingly, early infections were observed in co-infection with IBV. Our observations suggested that LPAIV H9N2 could play both priming and complicating roles. We strongly recommend that this complex approach be used routinely in the diagnosis of respiratory diseases in poultry.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Between 2020 to 2022 commercial meat-type poultry flocks in Algeria, Morocco and Tunisia showing acute respiratory disease signs were sampled. Only clinically diseased flocks showing acute respiratory signs for at most five days were included in the study. 12 tracheal swabs were

collected from each flock and were smeared immediately onto the four circles of the FTA® card with three swabs per circle. FTA® cards were dried for at least five minutes, labelled, placed in a Ziploc bag and stored at +4°C [198]. FTA® cards were shipped to the IHAP virology laboratory of ENVT, Toulouse, France for molecular analysis. A written form including information about age, date of onset of clinical signs, daily mortality at the age of sampling and detailed IBV vaccination history and commercial names of used vaccines, was provided with each sample.

FTA cards preparation and RNA extraction

Three disks of 6 mm diameter were punched out of the four FTA® card's circles using a Whatman Harris Uni-Core™ puncher and pooled together in 2 ml microcentrifuge tube to form four pools from each flock sampled. 800 µl of TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0) were added to the microcentrifuge tubes and left to soak at +4°C for 15 min then briefly vortexed and centrifuged. RNA was extracted from 200 µl of the supernatant using MagFast RNA Virus extraction kit (IDSolution, Montpellier, France) according to the manufacturer's instructions and eluted in 80 µl. The puncher was cleaned using pure ethanol between circles and cards.

Screening of respiratory pathogens

The four pools of each flock sampled were screened in duplicate for a panel of eight respiratory pathogens including LPAIV H9N2, IBV, NDV, aMPV and ILTV, MG, MS and ORT. Primers used for this study are listed in Table S1. Depending on the different pathogens' nucleic acid class, real-time PCR (qPCR) or reverse transcription real-time PCR (RT-qPCR) assays were performed on an Agilent Bravo Automated Liquid Handling Platform (Santa Clara, California USA) and an Applied Biosystems ViiA7 thermocycler (Foster City, California, USA).

RT-qPCR for RNA amplification

The RNA viruses were screened using the iTaq™ universal SYBR® green one-step RT-qPCR kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The reaction mix consisted of 5 µl of 2x iTaq mix, 0.125 µl of iScript reverse transcriptase, 0.3 µl of each primer (10 µM), 2.275 µl of nuclease free water and 2 µl of RNA with the following program: reverse transcription at 50°C for 10 min and polymerase activation at 95°C for 1 min followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec and annealing/extension at 60°C for 60 sec. AIV M gene positive samples were further subtyped for H9N2 using ID Gene™ Influenza H9 Lineage G1-like Duplex commercial kit (IDSolution,

Montpellier, France). The reaction setup consisted of 8 µl of the Amp-mix, 3 µl of nuclease free water and 2 µl of RNA. The thermal cycling was performed on a LightCycler 96® system (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) following the manufacturer's instructions. RT-qPCR product of NDV positive samples were sequenced using forward or reverse RT-qPCR primers to differentiate between vaccine type and field strains. IBV positive samples were genotyped using primers spanning the hyper variable region 3. IBV genotyping results were discussed in a previously published paper by the same authors (Jbenyeni et al., 2023.b).

qPCR for DNA amplification

The DNA viruses and bacteria were screened using iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix qPCR kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The reaction mix consisted of 5µl of Master mix, 0.2 µl of each primer (10 µM), 2.6 µl of nuclease free water and 2 µl of DNA with the following program: pre-incubation at 95°C for 10 min followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 60°C for 15 sec and extension at 72°C for 15 sec.

Preparation of standards for genome copy quantification

PCR products were generated for each pathogen using respective primer pairs (Table S1) on positive controls. Recombinant plasmid DNA for each pathogen was prepared by inserting the amplified product into a pSC-A-amp/kan Vector and transformed into SoloPack Competent Cells (Agilent Technologies, San Diego, CA, USA). Plasmids were extracted using Nucleospin ® Plasmid EasyPure (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and presence of the inserts was verified by qPCR. The concentration of plasmid DNA was measured using CLARIOstar multifonctionnal microplate reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany). The copy number was calculated using the following formula: Concentration of DNA in g /µl / (650 × [length of plasmid + length of amplicon]) × 6.022 × 1023 =number of molecules /µl and diluted in serial 10-fold until a final dilution of 10^1.

Results

Respiratory outbreaks and studied population

From December 2020 to August 2022, 300 meat-type poultry flocks exhibiting acute respiratory signs from the three North African countries were included in this survey. 168 flocks were sampled

in 2021 (December 2020 included) and 132 were sampled in 2022 (Table 1). Samples were collected throughout the whole year and 87, 114, 64 and 35 flocks were sampled in Winter, Spring, Summer, and Autumn respectively. Birds from these flocks were sampled within the period of five days after the onset of the respiratory signs. Out of these flocks, 93% (277/300) were broilers and 8% (23/300) were turkeys. The numbers of flocks sampled from Morocco, Algeria and Tunisia were 142, 81 and 77 respectively. The age was recorded for 274 of the 277 broiler flocks studied and was above three weeks in 93% (254/274) and above four weeks of age in 69% (189/274) of the cases. For turkeys, 30% of the flocks were under nine weeks of age and 70% were above. Respiratory signs like sneezing, coughing, dyspnoea, and rales were observed in all flocks. Nonspecific respiratory lesions like conjunctivitis, tracheitis and pneumonia and specific lesions like fibrinous tracheitis (48%), petechial proventriculitis (8%) and nephritis (37%) were recorded. Mortality was recorded in 191 cases out of the total 300 flocks. The collected mortality data represented the mortality between the onset of the clinical signs and the day of sampling. As the duration of mortality was variable between flocks, we calculated the daily mortality during the outbreak based of the data collected. The daily mortality rate in the five first days of the outbreak was under 1%, between 1 and 2% and above 2% respectively in 80%, 14% and 6% of the flocks. The highest daily mortality recorded during the outbreaks was 11.8%. The vaccination status was recorded for 226/300 flocks. 72/226 (32%) of these flocks received an inactivated H9N2 vaccine between day old and 12 days old. 162/226 (72%) of the flocks were vaccinated against NDV with a vector virus vaccine in addition of several live virus vaccines. For IBV, almost all the broiler flocks for which the vaccination status was recorded (204/277) received at least one IB live virus vaccine. Most of these flocks (82%) received a vaccination with Mass and 793B vaccine-types combination (Jbenyeni et al., 2023.b). In broilers, aMPV live virus vaccines were used only in Algeria and were administered in 19 flocks. The median number of live virus vaccines administered in broiler flocks was four vaccines.

Viral infection frequencies

A least one viral pathogen was detected in 99% (297/300) of the tested flocks and only one flock was negative for the eight pathogens. The detection rates of the screened pathogens per country and per year were detailed in Table 2. During the two-year study, the detection rate of H9N2 in the respiratory episodes was 88% (264/299). Considering the three countries together, H9N2 detection

rate has slightly declined in 2022 (79%) compared to 2021 (95%). Per country, H9N2 detection rates were 97%, 85%, and 75% in Morocco, Algeria, and Tunisia, respectively. Between 2021 and 2022, the levels of H9N2 detection rates were stable in Morocco but dropped from 96% to 61% and from 90% to 58% respectively in Algeria and Tunisia (Table 2). If we consider only turkeys, H9 detection rate was 95%. LPAIV H9N2 was detected in Winter, Spring, Summer, and Autumn in 81, 92, 58, and 33 flocks respectively. The second most detected respiratory pathogen was IBV. If we consider only broiler flocks, the detection rate of IBV in acute respiratory cases was 56% (156/277). Per country, the detection rate of IBV was 70%, 67%, and 45%, respectively in Algeria, Tunisia, and Morocco. Surprisingly, in one turkey flock in Morocco, IBV wild-type strain (Italy-02) was detected with high viral shedding level (Ct 27). The third most detected respiratory pathogen was aMPV in 21% (64/299) of the cases. In 2021, aMPV detection rates were the lowest in Morocco (3%) and the highest in Tunisia (37%). Although the detection rates of aMPV increased in the three countries in 2022, aMPV rate remain the lowest in Morocco (19%) and became the highest in Algeria. aMPV detection rates increased by 33%, 16% and 5% in 2022 compared with 2021respectively in Algeria, Morocco and Tunisia. aMPV was detected in 35% and 20% of the turkey and broiler flocks respectively. Samples with high aMPV viral loads were genotyped and classified as subtype B. The detection rate of aMPV was the highest in Tunisia (39%), followed by Algeria (24%) and Morocco (11%). The fourth most detected viral pathogen was NDV in 7% (20/299) of the studied flocks. The detection of commercially available NDV vaccine strains were not considered positive for NDV. When genotyped, these detected NDVs were of either the subgenotype VII.2 (velogenic) or of a wild-type genotype II (lentogenic). The velogenic NDV was detected only in Algeria in 12% (n=10) of the flocks from this country. The daily mortality rate in positive vNDV flocks during the outbreak was between 0.2% and 11.8 % and under 1% in half of these cases. The genotype II lentogenic NDV was detected in ten flocks from both Tunisia and Morocco. ILTV was detected in 3% (9/300) of the tested flocks and only in 2021. Per country, ILTV was detected in Algeria (one flock) and Morocco (eight flocks). One of these ILTV positive flocks was a turkey production. ILTV was not detected from respiratory outbreaks in Tunisia during the 2021-2022 period.

Bacterial infection frequencies

Of the 299 respiratory outbreaks, MG, MS, and ORT were detected in 11% (34/300), 39% (118/300), and 33% (99/300) of the cases, respectively. By 2022, the detection rate of MG, MS

and ORT dropped by around 40% for each bacterial pathogen compared to 2021. Per country, the detection rate of MS was the highest in Algeria (57%) followed by Morocco (39%) and Tunisia (21%). The detection rate of ORT was almost the same in the three countries and ranged between 32%-35%. The detection rate of MG in Morocco and Algeria was 17% and 12% respectively; however, in Tunisia MG was not detected in any flock.

Co-infections and pathogens mixing patterns

Of the 300 flocks, 82% (247/300) were co-infected. These co-infections involved two (n= 112), three (n= 75), four (n= 42), five (n= 12) or six (n= 6) pathogens. Pathogens' pairing was detailed in Table 3. Considering viruses only, viral co-infections were present in 58% of the cases (175/300). A total of 258 viral pairs were detected in the 175 viral co-infection cases; most of them involved two viruses (n= 135) and the remaining involved three (n= 39) and four (n= 1) viruses. The major combinations between viruses were H9+ IBV (n= 94), H9+ aMPV (n= 25), H9+ IBV+ aMPV (n= 23), H9+ NDV (n= 8), aMPV+ IBV (n= 7), H9+ NDV+ IBV (n= 6), H9+ IBV+ ILTV (n= 6) and H9+ NDV+ ILTV (n= 2) (Figure 1). The major simultaneous detection of H9N2 was with IBV (n= 130), aMPV (n= 50) and bacterial pathogens (n= 161). H9N2 was paired with MS, ORT, and MG in 105, 91, and 32 flocks respectively (Figure 2).

These mixed co-infections were observed in 178 flocks and included either one (n= 71), two (n= 82) or three (n= 25) viruses respectively. Of the 71 mixed co-infections with one virus, we detected H9N2 (n= 59), IBV (n= 10) and aMPV (n= 2) (Figure 3). In we consider only bacteria, co-infections were recorded in 24 flocks. Combinations between MG+MS, MG+MS+ORT, MS+ORT, and MG+ORT were found in 11, 8, 3, and 2 flocks respectively. Of the 52 (17%) mono-infected flocks, 39 were positive for H9N2 followed by IBV (n= 8) and aMPV (n= 3). Bacterial mono-infections were recorded in only two flocks and were either MG or MS (Table 4). Flocks under four weeks of age were frequently positive for IBV (51/85) and 80% of them were co-infected with H9N2.

Discussion

This study aimed at describing the epidemiology of the major respiratory pathogens in North African meat poultry by screening a panel of five viruses and three bacteria. Previous North African studies only reported the individual circulation of LPAIV H9N2 and other viruses in poultry [184, 185, 225]. Several experimental studies have shown an increase in the severity of LPAIV H9N2 clinical signs when co-infected with another respiratory pathogen, underlining the importance of

looking for possible co-infections [143, 159]. For the first time, our study described co-infection patterns between LPAIV H9N2 and seven other respiratory pathogens utilizing data generated by qPCR from clinically diseased meat-type poultry in North Africa for two years.

The samples collected were almost all positive for at least one viral pathogen, showing a good match between the inclusion criteria (acute respiratory signs and first five days of the outbreak) and the objectives of the study. We have deliberately avoided attributing the term 'prevalence' to the frequency of pathogens' detection, as our study is clinically based, and we cannot therefore generalise these data to the poultry population as a whole [226]. However, this study was perfectly suited to assess the detection rate of the main respiratory pathogens and the contribution of LPAIV H9N2 to the respiratory disease complex, and its role in co-infections. The number of broiler flocks sampled for our study was higher than the number of turkey flocks. This may be explained by the smaller size of the total turkey population in the countries studied thus a more difficult recruitment of flocks from this type of production. This could also be related to a better application of biosafety and prevention measures in this type of production as they are in their majority integrated farms.

Our study showed that H9N2 was by far the most detected pathogen in respiratory episodes (88%) in Algeria, Morocco and Tunisia suggesting an endemic circulation in poultry farms with a high viral pressure. In Morocco, the detection rate of H9N2 (97%) has increased comparing to 2018-2019 period (58%) in clinically diseased broilers [185]. These results suggested that in Morocco, the endemicity H9N2 was increasing over the year since its emergence in 2016 and reached its highest levels in 2022. In Tunisia, the study showed that the detection rate of H9N2 (75%) in the whole country was higher compared to its detection rate (54%) in the northeast region in 2018-2020 period in a previous study (Jbenyeni et al., 2023.a). In Algeria, this is the first study reporting the detection rate of LPAIV H9N2 after its introduction in 2017. Respiratory disease outbreaks were found to occur all year long; though, more cases were found in Spring and Winter than in Summer and Autumn. The detection rate of LPAIV H9N2 did not clearly vary depending on the season.

The detection of H9N2 alone suggests that this LPAIV may trigger the respiratory disease and cause clinical signs. Previous studies have shown that H9N2 -under controlled conditions- induces mild respiratory signs and spread between domestic poultry [38]. Non respiratory immunosuppressive pathogens or non-microbial factors (environment, stress, mycotoxin) could

play a role in increasing the susceptibility of chickens to H9N2 [227, 228]. These factors were not considered in this study and should be included in future studies.

The age of H9N2 infected flocks was in most of the cases above three weeks (89%). This could be explained by the decline in MDA-derived HI titres around three weeks of age in broilers [229] which increases the susceptibility of birds for H9N2 [230] . Similarly, the age of H9N2 co-infected flocks was also above three weeks (88%). If the role of MDAs is also true for these flocks, H9N2 could be considered as the origin of most of the respiratory disease outbreaks. Further studied are needed to elucidate the role of passive immunity to delay H9N2 infection in the field. Deterioration of environmental conditions [25], increase of bacterial infections [231] and stressors [232] are known to increase in the end of the rearing period which could also play a role in the increasing susceptibility of chickens for H9N2.

Overall, co-infections were detected in 82% of the respiratory outbreaks corroborating with previous studies [10, 165] showing that the respiratory disease is multicausal. If we had only screened H9N2 we would have thought that H9N2 was the unique cause of the respiratory outbreaks. However, the simultaneous screening of the major respiratory pathogens showed a more frequent detection of H9N2 in co-infections (n= 225, 85%) than alone (n= 39, 15%) suggesting that H9N2 is highly contributing in the multicausal respiratory disease complex. In similar studies, high co-infection rates of H9N2 were also observed regardless the endemicity of H9N2 [166, 233]. The high co-infection rate of H9N2 could be linked to its immunosuppressive capacity. Several studies have demonstrated that H9N2 infection downregulates host immune system by supressing immune response of chicken bone marrow-derived dendritic cells [154] or by inhibiting the T cell response [168]. Furthermore, as H9N2 has a marked tropism to the upper respiratory tract [234], its strong replication in the trachea may cause the deciliation of the respiratory epithelium then facilitating the co-infection of chickens with other respiratory pathogens. Therefore, we hypothesise that H9N2 plays an important role in the respiratory disease complex.

This survey identified co-infections of H9N2 with IBV, NDV, aMPV, ILTV, MG, MS and ORT. This clearly demonstrates the high capacity of H9N2 to interact with a broad spectrum of respiratory pathogens. The major co-infections of H9N2 were with bacterial pathogens, IBV, and aMPV. H9N2 was very frequently paired with IBV (n= 130) suggesting the presence of synergism between the two viruses. Previous experimental studies have shown that the co-infection between

H9N2 and wild-type or vaccine-type IBV enhanced the clinical signs of either pathogens [162, 223, 235]. In our study the co-infection between IBV and H9N2 was observed at all ages and in IBV completely and partially vaccinated flocks suggesting that both sequences of co-infections are possible. Flocks under three weeks of age and partially vaccinated were more probably infected first with IBV then complicated with H9N2; however flocks above three weeks of age and completely vaccinated for IBV were more probably infected first with H9N2 then complicated with IBV. Even though the latter category of flocks are correctly vaccinated, they were challenged with H9N2 and IBV and showed respiratory signs. This suggest that H9N2 paired vaccination efforts. The simultaneous infection with both pathogens cannot be excluded either. In a recent study, the different scenarios of co-infections between H9N2 and IBV were tested, and although clinical signs, mortality, and viral loads increase were observed in the three groups, the highest levels were recorded observed in the group challenged with IBV prior to H9N2. The authors of the aforementioned study supported the hypothesis that IBV induces a severe inflammatory response, increasing the pathogenicity of H9N2. Based on these observations we are tempted to put forward the hypothesis that under field conditions, the different orders of co-infections between H9N2 and IBV are possible; even though the first infection with IBV seems to have more severe outcomes. Factors promoting the different co-infection scenarios need to be further studied in spontaneous cases. Mathematic model based on the shedding duration and incubation period of the different pathogens could help elucidating the order of infections in spontaneous respiratory outbreaks.H9N2 was paired with a high proportion (78%) of positive aMPV showing also a very likely synergy between these two viruses. The co-infection between H9N2 and aMPV in broilers needs to be further studied, under controlled conditions. To the best of our knowledge no study has yet been carried on this subject. aMPV detection rates were higher in Algeria and Tunisia in both years than in Morocco. In addition, in Morocco aMPV was detected only in 2022 suggesting an earlier introduction in Algeria and Tunisia [211]. These observations recommend to take aMPV more into consideration in future health programs. Contrary to H9N2, IBV showed lower co-infections with aMPV suggesting a low interaction between both viruses [236]. However, IBV was more frequently found in H9N2+aMPV co-infections which suggests a likely role of H9N2 to increase the ability of IBV to co-infect with aMPV.

The simultaneous detection of H9N2 with overall bacterial pathogens was very frequent (n= 161). The co-infection of H9N2 with MS (65%) and ORT (57%) was more frequent than with MG (20%).

This was maybe linked to the respective detection rates of the three bacterial pathogens as MS and ORT were almost three times more detected than MG. A similar study in Jordan has shown lower detection rates of H9N2, MG and MS, yet a similar co-infection frequencies in broilers [178]. Out of all the pathogens, MG and MS showed the most significant drop in the detection rate comparing the two years of study. If we consider co-infections between H9N2 and bacteria only (n= 51), we suggest that H9N2 complicated a prior bacterial infection. In most of these cases, H9N2 and the bacterial pathogen showed low Ct values (13-28) and regarding the longer incubation period for bacteria [108], it is likely that the bacterial infection was prior and H9N2 infection was recent. Longitudinal monitoring of flocks positive for these pathogens to confirm this hypothesis is further needed. In a previous study, the challenge of chickens with a LPAIV (H3N8) inoculated seven days before increases the severity of MG infection alone and reduces the anti-mycoplasma antibody response [108]. Similarly, the challenge of broilers with LPAIV H9N2 inoculated three days before with ORT increases the mortality for either ORT or H9N2 [121]. These observations suggest that H9N2 might complicate bacterial respiratory infections.

The least pathogens paired with H9N2 were NDV and ILTV probably due to their low detection rates. However, the proportion of co-infection of these viruses with H9N2 was almost 100%. The low detection rate of NDV outbreaks may be explained by the long history of vaccination in these countries, by the widespread use of vector vaccines (72%) resulting probably in high vaccine coverage. Many studies have demonstrated the efficacy of NDV vector vaccines to protect against clinical signs and reduce virus shedding [237, 238].

Considering only flocks positive for velogenic NDV, they were in their majority co-infected with H9N2 (7/10) despite they were vaccinated against NDV (9/10); however the mortality in these flocks was not high in all of them as only half of them have more than 1% daily mortality. In addition, in these flocks, by comparing the viral loads of H9N2 (low) and vNDV (high), we highly suggest that H9N2 triggered the infection; hence, we are tempted to speculate that the co-infection of these flocks with H9N2 increased their susceptibility to vNDV. It was shown previously that in NDV vaccinated layer flocks, the co-infection of vNDV (genotypeXIII) by H9N2 exacerbates the clinical outcome [239]. According to an experimental study, the prior infection of non-vaccinated chickens with H9N2 increases their susceptibility to vNDV by lowering the minimum infectious dose. Chickens challenged with both H9N2 and vNDV showed higher mortality levels compared

to chickens challenged with vNDV alone [161]. The same authors have also shown that the degrees of interference or exacerbation of H9N2 depends on vNDV challenge dose [161]. In our study, also the flocks positive for the wild-type genotypeII NDV (n=10) were all co-infected with H9N2 although their majority was correctly vaccinated against NDV. The experimental co-infection between H9N2 and lentogenic NDV (Lasota strain) was studied in SPF chickens and commercial broilers. In both models authors concluded that NDV increases the viral shedding of H9N2 [175]; however, only in commercial broilers the mortality rate was increased [177].

Our study has several limitations. The detection of nucleic acid may not reflect an active infection with the respective pathogens, this could potentially introduce biases in the detection rates levels. Furthermore, given the possible sequential infection and the variation in shedding duration between the pathogens, co-infection patterns observed could be potentially biased. It would have been interesting to have two sampling time points per flock several days apart. A further consideration is that this clinical based survey cannot inform about the epidemiology of H9N2 in asymptomatic flocks.

Our study offers a comprehensive overview on the circulation of the main respiratory pathogens in broilers in Algeria, Morocco and Tunisia. In this study, we have demonstrated the high level of complexity of respiratory disease, confirming the multicausal nature of this disease and encouraging clinicians and researchers to considerate this. By adopting this multicausal approach in routine diagnosis of respiratory diseases, will provide higher disease awareness level. We have demonstrated also that LPAIV H9N2 is prone to co-infection, and it might induce or complicate respiratory diseases. This study has highlighted the main problems associated with respiratory diseases in the countries studied helping the authorities to adopt the right control strategies. Furthermore, given the dynamic nature of the viral population particularly in this context of co-infections, long-term epidemiologic surveillance should be maintained to detect any new emerging viruses.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All farms enrolled in the study followed their own management practices. No protocol approval from the ethics committee of Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) was required.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request. The dataset supporting the conclusions of this article is included within the article.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was performed in the framework of the PhD program of Adam Jbenyeni, hosted by the Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) and funded by Ceva Santé Animale S.A.

Authors' contributions

JLG, GC and CC: contributed to the conception and the design of the study. Samples collected by AJ. PCR analyses were conducted by AJ and were interpreted by AJ and GC. Data was curated by AJ. AJ drafted the first manuscript and all authors contributed to the proofreading of the manuscript and approved the submitted version.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ceva Santé Animale team in Algeria Morocco and Tunisia, especially Dr. Amal Essalah-Bennani, Dr. Hanan Balil, Dr. Mohamed-Amine Bouderbal, Dr. Riad Mennana, and Dr. Zied Chtioui for their help in collecting samples and flocks' data. We also thank Moncef Bouzouaia, DVM, Professor from Ecole Nationale Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisia for his help and effort dedicated to the project.

Tables

Table 1 Yearly number of sampled flocks in each of the three countries.

	Samples		
	2021	**2022**	**Total**
Algeria	**55**	**26**	**81**
Morocco	**72**	**70**	**142**
Tunisia	**41**	**36**	**77**
Total	**168**	**132**	**300**

415 **TABLE 2 Yearly detection of pathogens in the three countries.**

	2021			2022			
	Algeria	Morocco	Tunisia	Algeria	Morocco	Tunisia	**Total**
H9N2	53 (96%)	70 (97%)	37 (90%)	16 (61%)	67 (96%)	21 (58%)	**264 (88%)**
IBV*	37 (67%)	35 (53%)	19 (63%)	19 (72%)	25 (36%)	21 (72%)	**156 (56.3%)**
NDV	7 (13%)	4 (5%)	3 (7%)	3 (11%)	3 (4%)	0	**20 (6.7%)**
aMPV	7 (13%)	2 (3%)	15 (37%)	12 (46%)	13 (19%)	15 (42%)	**64 (21.3%)**
ILTV	1 (2%)	8 (11%)	0	0	0	0	**9 (3%)**
MG	7 (13%)	16 (22%)	0	3 (11%)	8 (11%)	0	**34 (11.3%)**
MS	34 (62%)	35 (49%)	11 (27%)	12 (46%)	21 (30%)	5 (14%)	**118 (39.3%)**
ORT	19 (34%)	29 (40%)	20 (49%)	8 (31%)	16 (23%)	7 (19%)	**99 (33%)**

416 *Broiler flocks only

417

418 **TABLE 3 Summary of paired pathogens in total studied farms.**

	H9N2	IBV	NDV	aMPV	MG	MS	ORT	ILTV
H9N2	**264**	0	0	0	0	0	0	0
IBV	130	**157**	0	0	0	0	0	0
NDV	17	9	**20**	0	0	0	0	0
aMPV	50	32	3	**64**	0	0	0	0
MG	32	21	3	4	**34**	0	0	0
MS	105	67	7	20	19	**118**	0	0
ORT	91	55	9	24	10	50	**99**	0
ILTV	9	6	2	1	7	9	7	**9**

419

420

421 **TABLE 4 Type of infection for each pathogen**.

	H9N2	IBV	NDV	aMPV	ILTV	MG	MS	ORT
Mono-infection	39	8	0	3	0	1	1	0
Co-infection	225	149	20	61	9	33	117	99
Total detection	**264**	**157**	**20**	**64**	**9**	**34**	**118**	**99**

422

423

TABLE S1 Oligonucleotides set used for the PCR screening of respiratory pathogens.

Pathogens	Target genes	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Ampli-cons size (bp)	References
Influenza A virus	M	**M52C:** CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	**M253R:** AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	250	Fouchier *et al.* [240]
NDV	F	**FIP1:** TACTTTGCTCACCCCCCTT	**FIP2:** CATCTTCCCAACTGCCACT	280	Kho *et al.* [241]
IBV	UTR	**GU391:** GCTTTTGAGCCTAGCGTT	**GL533:** GCCATGTTGTCACTGTCTATTG	143	Callison *et al*, [242]
aMPV	SH	**SH-f:** TAGTTTTGATCTTCCTTGTTGC	**SH-r:** GTAGTTGTGCTCAGCTCTGATA	200	Cecchinato *et al*. [243]
ILTV	UL15a	**UL15aF:** TTGCTGTGCTATTTCGCGTG	**UL15aR:** GTAAATCGTTTAGTGCGGCAT	113	Mahmoudian *et al*. [244]
MS	vlhA	**Vlha F:** CCATTGCTCCTGCTGTTAT	**Vlha R:** KMTKCTGTTGTAGTTGCTTCAA	295	Wetzel *et al.* [245]
MG	Mgc2	**Mgc2 F:** CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACA	**Mgc2 R:** TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTCC	300	García *et al.* [246]
ORT	*gyrA*	**ORT101F:** TGGGCAAGGGAACTTTGGTT	**ORT101R:** TGTCGGCAAGCATTTCCTCA	101	Croville *et al.* [190]

aMPV, Avian metapneumovirus; IBV, Infectious Bronchitis virus; ILTV, Infectious Laryngotracheitis virus; MG, *Mycoplasma gallisepticum*; MS, *Mycoplasma synoviae*; NDV, Newcastle Disease virus; ORT, *Ornithobacterium rhinotracheale*.

Figure 1 Viral co-infections' patterns.

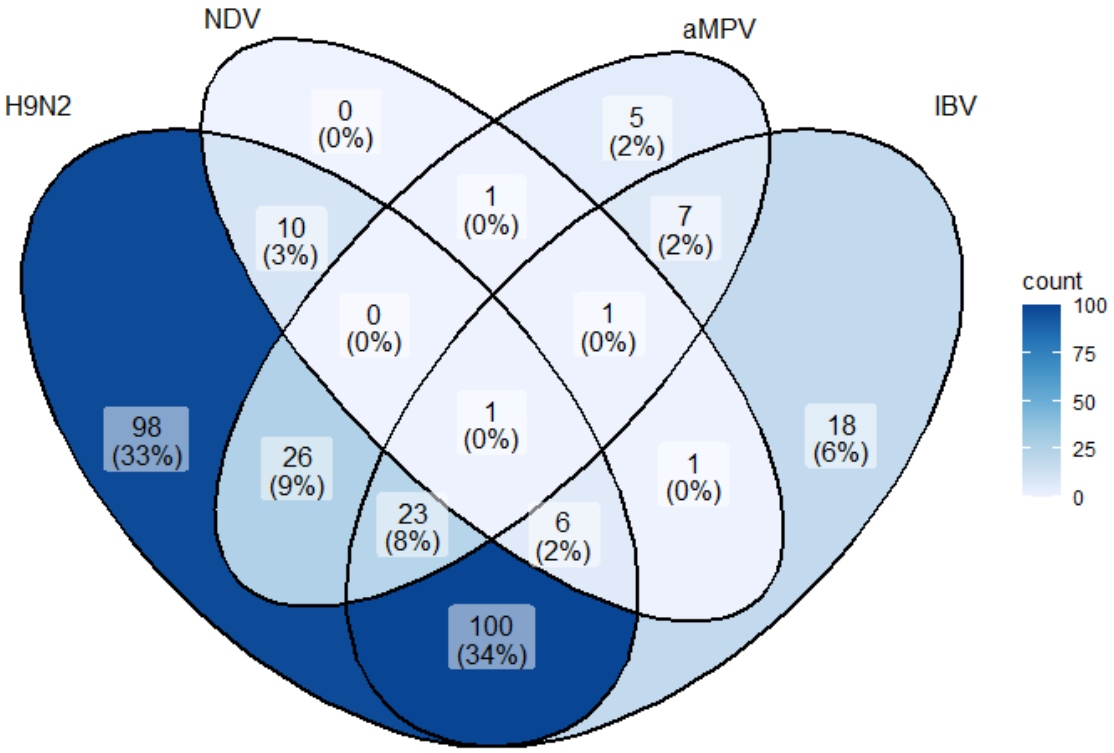


Figure 2 Respiratory pathogens' interactions.

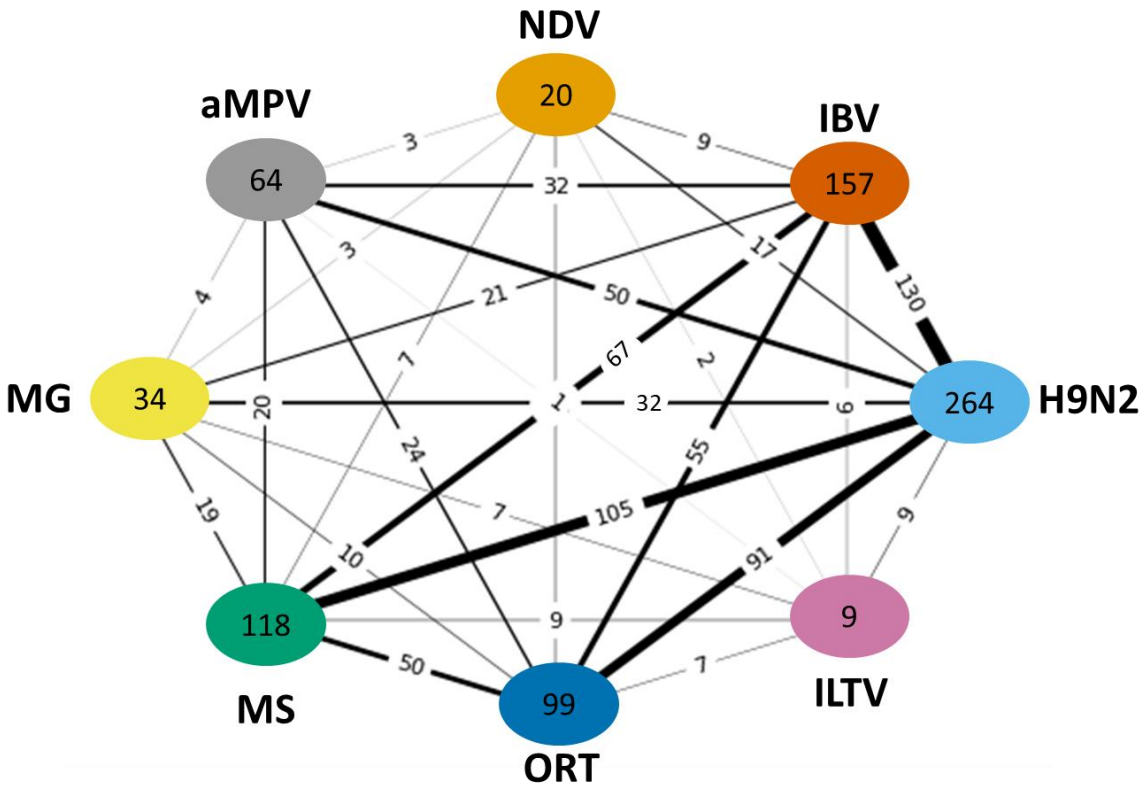
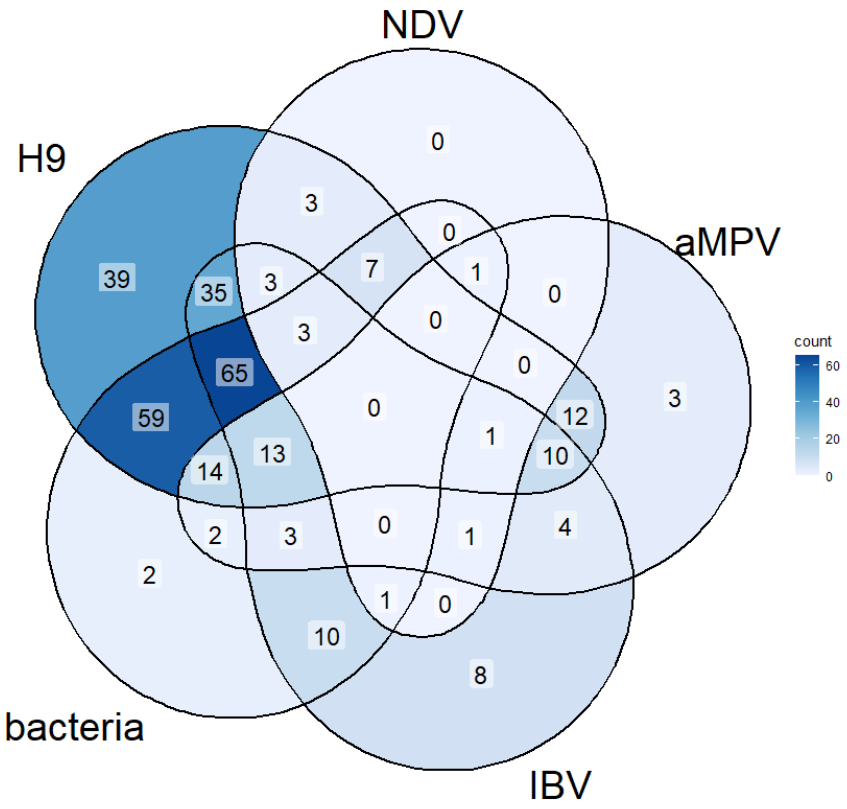


Figure 3 H9N2, IBV, NDV, aMPV and bacterial co-infections' patterns.



Troisième chapitre :

La caractérisation du virus de la bronchite infectieuse au Maghreb

1. Différenciation entre la souche vaccinale et la souche sauvage BI

Le contrôle du virus BI chez les poulets de chair repose principalement sur l'utilisation de vaccins à virus vivant. La combinaison entre une souche du groupe 793B et une souche Mass est très utilisée sur le terrain, car elle offre une protection contre un large éventail de souches. Hormis l'immunité humorale induite par ce type de vaccin, le virus vaccinal colonise la trachée et sature les récepteurs cellulaires, ce qui peut bloquer l'infection par des souches sauvages. Ces virus vaccinaux peuvent rester détectables par PCR dans la trachée pendant une longue période après leur administration. Il a été démontré qu'un virus du groupe 793B a été détecté jusqu'à huit semaines après son administration [247]. La persistance des souches vaccinales présente un grand frein à la détection et l'identification des souches sauvages et à l'établissement d'un diagnostic correct.

2. Les souches du virus BI au Maghreb

Le virus BI est connu par sa grande capacité à muter grâce à son génome d'ARN simple brin mais aussi à sa polymérase dont la capacité de relecture est limitée [248, 249]. Le virus de la bronchite infectieuse est connu aussi pour sa capacité à recombiner [250]. Il a été aussi démontré à plusieurs reprises que le virus BI peut parcourir de longues distances comme par exemple la souche QX chinoise retrouvée en Italie ou bien la souche Variant 02 israélienne retrouvée au Brésil [251, 252]. Le rôle des oiseaux migrateurs dans la diffusion du virus BI est faible mais n'est pas à écarter [253]. Du fait de cette grande dynamique du virus BI, la surveillance doit être maintenue. Néanmoins, les études de surveillance de la BI au Maghreb, à l'exception du Maroc sont très sporadiques.

Résumé de l’article :

Le virus de la bronchite infectieuse (BI) est un coronavirus aviaire responsable de troubles respiratoires, reproductifs et rénaux chez la volaille. En Afrique du Nord, le virus de la BI a été détecté pour la première fois au début des années 1980 et depuis, différentes variantes ont été identifiées. Ces variantes ont été décrites dans différentes régions du monde y compris l'Afrique du Nord. Dans le cadre d'une enquête de deux ans, 280 troupeaux de poulets de chair présentant des signes respiratoires aigus en Algérie, au Maroc et en Tunisie ont été testés pour la BI. Des écouvillons trachéaux ont été prélevés, étalés sur des cartes FTA® et testés par RT-qPCR contre le virus de la BI. Cette étude longitudinale sur le terrain a montré que le virus de la BI contribuait à 55,7% des épidémies respiratoires, avec des variations entre les pays et les périodes. L'analyse phylogénétique basée sur les séquences partielles du gène S1 a montré la co-circulation de sept lignées dans les pays d'Afrique du Nord avec au moins deux lignées par pays. Ces lignées sont GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 et la lignée "nord-africaine" (non classifiée). Le GI-21 n'a été détecté au Maroc seulement et s'est avéré former une nouvelle sous-lignée au sein du GI-21 historique. La lignée appelée provisoirement "nord-africaine" a été trouvée au Maroc et en Algérie et suggère que ce virus était déjà signalé en Algérie (2012), au Maroc (2014) et en Tunisie (2016), mais qui n'a pas été classé jusqu'à présent. Cette étude suggère que le virus de la BI est en effet un problème de santé majeur pour les élevages commerciaux de poulet de chair en Afrique du Nord, et qu'il nécessite une surveillance en continue comme de nouveaux variants sont toujours susceptibles d’émerger.

Co-circulation of multiple infectious bronchitis virus lineages in broiler flocks in Algeria, Morocco, and Tunisia, 2021-2022

(Running title: Infectious bronchitis virus lineages in North Africa)

Adam Jbenyeni[1,2], Guillaume Croville[1], Christophe Cazaban[2] & Jean-Luc Guérin[1#]

[1] IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

[2] Ceva Santé Animale S.A., Libourne, France

[#]**Corresponding author:**

Jean-Luc Guérin

IHAP, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Toulouse, France

jean-luc.guerin@envt.fr

Abstract

Infectious bronchitis virus (IBV) is an avian coronavirus that is responsible for respiratory, reproductive, and renal health disorders in poultry. In North Africa, IBV was detected for the first time in early 1980s and since then different variants were reported. These variants were either described previously elsewhere or specific to North Africa. In a two-year survey, 280 broiler flocks showing acute respiratory signs from Algeria, Morocco and Tunisia were tested for IBV. Tracheal swabs were collected, smeared into FTA® cards and screened by RT-qPCR for IBV. This longitudinal field study showed that IBV contributed to 55.7% of the respiratory outbreaks, with variations between countries and periods. The phylogenetic analysis based on the partial S1 gene sequences showed the co-circulation of seven lineages in the North African countries and of at least two lineages per country. These lineages were GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 and the “North

African" (unclassified) lineage. The GI-21 was detected only in Morocco and was found to form a sub-lineage within the historical GI-21. The tentative "North African" lineage was found in Morocco and Algeria and suggested to be similar to the virus already reported in Algeria (2012), Morocco (2014) and Tunisia (2016) which remained unclassified until now. This study suggests that IB is indeed a serious health problem for the broiler industry in North Africa, and it requires a continuous surveillance of emerging variants.

KEYWORDS:

avian coronavirus, infectious bronchitis, surveillance, phylogenetic analysis, north Africa

INTRODUCTION

Infectious bronchitis (IB) is one of the major respiratory diseases in poultry. It is caused by an avian gammacoronavirus, infectious bronchitis virus (IBV). Since the first identification of IBV in early 1940s [254], this virus has spread globally. In Africa, IBV was isolated first in the 1950s in Egypt and then in Southern Africa [55] and Morocco in the 1980s [56]. A Moroccan IB virus isolated in 1983 was identified as closely related to the 793B type and it shared 96% identity with the 4/91 virus which suggested that it is the ancestor of the 793B genotype [57]. Between 1997 and 2002, nephropathogenic IBVs were detected and characterized as different from Mass and 4/91 strains by restriction fragment length polymorphism analysis [58]. In 2010, the Italy02 genotype was detected for the first time in Morocco [59]. In the early 2010s, the prevalence rate of IBV in Morocco was shown to be 51% [225]. In Algeria, novel nephropathogenic IBV variant was detected in 2012 [60] and in 2013 [11]. In Tunisia, unique IBV variants were characterized during the periods 2000-2001 and 2007-2010 [61, 62]. In 2016 an IBV variant closely related to the Algerian nephropathogenic virus was isolated from two Tunisian broiler flocks. In 2019-2020 period, the GI-23 lineage (Variant 2) was detected in two broiler flocks in northeast Tunisia (Jbenyeni et al., 2023.a). The GI-23 lineage was reported earlier in Libya in 2012 [255]. Besides these sporadic studies, little is known

about the epidemiology of IBV in North Africa. Due to the absence of a unified nomenclature for IBV classification before 2016, it was not possible to know the relationship between IB viruses reported in the different North African countries or even in the same country. In 2016, Valastro et al. (2016) suggested to classify IB viruses based on the complete S1 gene into six genotypes (GI to GVI) and 32 lineages. Since then, new IBV genotypes and lineages have been described including, GI-28 and GI-29 in China, GI-31 in Ivory Coast, GII-2 in the Netherlands, GVII-1 in China, GVIII-1 in the United States and GVIII-2 in Europe [256–262]. The new nomenclature starts also creating confusions as now system exists to centralise the attribution of new lineages numbers. For example the GI-30 was attributed to two different viruses one detected in Trinidad and Tobago and the other in Mexico [257, 263]. This shows the rapid evolution of IBV which can be explained by the high mutation rate, the high recombination frequency and host selection pressure [250, 264].

Except Morocco, no longitudinal study was conducted in North African countries to assess the prevalence of IBV or its contribution to the respiratory diseases. In a two-year survey, we collected samples from broiler flocks with acute respiratory signs in three North African countries, aiming to evaluate the contribution of IBV to the respiratory diseases. The present survey showed the detection of IBV in half of the acute respiratory outbreaks in North African broilers. This survey also showed the circulation of seven IBV lineages in North Africa. Multiple IBV lineages showed a co-circulation within and between countries. An unclassified "North African" lineage was detected and was shown to circulating in the three North African countries.

MATERIALS AND METHODS

Samples collection

Between December 2020 and December 2022, commercial broiler flocks showing acute respiratory disease signs were sampled from Algeria, Morocco, and Tunisia. Flocks were sampled no more than five days after the onset of respiratory signs. To respect this narrow sampling window, we invited several field veterinarians to collaborate with us, as they

are the first to be alerted to new outbreaks. We were helped in implementing and maintaining this network by Ceva local teams in the three countries. Twelve tracheal swabs were collected from each flock and were smeared immediately onto the four circles of the FTA® card (Qiagen , Hilden, Germany) with three swabs per circle. FTA® cards were dried for at least five minutes, labelled, placed in a Ziploc bag and stored at +4°C [198]. FTA® cards were shipped to the laboratory of the virology department of the veterinary school of Toulouse (ENVT), France for molecular analysis. A written form including age, date of the onset of clinical signs, daily mortality during the outbreak and IBV vaccination program was provided with each sample.

FTA cards preparation and RNA extraction

For each FTA® card, three disks of 6 mm diameter were punched out from each of the four circles of the card using a Whatman Harris Uni-Core™ puncher. The puncher was cleaned using pure ethanol between the circles and the cards. Disks from each circle were pooled together in 2 ml microcentrifuge tube. 800 µl of TE Buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0) were added to the microcentrifuge tubes and left at +4°C for 15 min to soak, then briefly vortexed and centrifuged. RNA was extracted from 200 µl of the supernatant using MagFast RNA Virus extraction kit (IDSolution, Montpellier, France) according to manufacturer's instructions and eluted in 80 µl. We therefore obtained four samples per flock, which were tested separately.

5'UTR RT-qPCR and S1 gene HVR 3 sequencing

All the samples were duplicated and screened for IBV using a universal real-time reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) assay targeting the 5' UTR of IBV genome [242]. The 5' UTR RT-qPCR assay was performed using Sybr®Green chemistry, so only forward and reverse primers were used. One sample per flock was selected to be used for the partial S1 gene sequencing if its Ct value was under 32 (hence, if virus load was in sufficient amount to be eligible for sequencing). A sequence overlapping the hypervariable region 3 (HVR3) located between positions 820 and 1161 of the S1 gene was amplified [45]. This amplification was performed on a nested PCR assay using two primer pairs

(SX1+/SX2-, SX3+/SX4-) as described by Worthington et al. (2008). Random primers were used in place of SX2- primer for the reverse transcription (RT) using RevertAid reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) according to manufacturer's instructions. An amplicon of 350 base pairs (bp) size was purified and Sanger sequenced in one direction using SX4- primer. The quality of the sequences was inspected based on the chromatogram profile and edited using BioEdit software. Sequences with high background noise or flattened nucleotides peaks were removed. Mixed sequences were excluded from the phylogenetic analysis.

Phylogeny and classification

The IB viruses sequences were classified based on two parameters: the nucleotide identity and the topology of the phylogenetic tree [45]. The nucleotide identity was determined using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®) from the NCBI database. If the BLAST result showed a nucleotide identity of 95% or less with other sequences in GenBank, the lineage of this latter sequence was attributed to the query sequence. If not, the lineage was determined based on the phylogenetic tree. The sequences that blasted with our sequences were retrieved from GenBank to be included in the phylogenetic analysis along with the reference sequence of existing IBV lineages. Sequences alignment was performed online using the Multiple Alignment, Fast Fourier Transform (MAAFT) method. Both complete and partial S1 sequences were included in the phylogenetic analysis to infer phylogenetic relationships with viruses for which HVR1 or 2 are available. Pairwise similarity between nucleotide sequences and phylogenetic relationship tree were inferred using the Maximum Likelihood method and General Time Reversible model and pairwise deletion parameter on Mega X software.

Detection of IBV multiple infections

IBV vaccine strains are largely used and they able to colonise the trachea for a long period, they may hinder the detection of the wild-type strains. As the 5'UTR RT-qPCR is universal, it will detect both vaccine and wild-type 5'UTR genes. These wild-type strains may not be amplified by HVR3 targeting primers as they may be competing with

the vaccine strain; thus hide the wild-type strain. In order to verify the presence or absence of a multiple infection with this 793B-type vaccine (1/96 strain), we used a specific RT-qPCR assay targeting S1 gene [247]. Samples genotyped with this vaccine strain were tested using both the specific RT-qPCR and the universal RT-qPCR assays on the same plate in order to see Ct difference. A serial 10-fold viral RNA dilution ranging from the undiluted 1/96 vaccine to 10^{-4} dilution was used as a standard and targeted by both assays on the same plate and replicated five times.

Results

Characteristics of sampled flocks

During this two-year study, 280 clinically diseased broiler flocks were sampled. All these flocks were showing acute respiratory signs like coughing, sneezing, nasal discharge, dyspnoea, and increased mortality. The most frequently reported lesions were tracheitis (93.9%) and nephritis (28.6%). The number of flocks sampled in Morocco, Algeria, and Tunisia were 136, 81, and 63 respectively. Information about vaccination was lacking for 74 flocks. Among the 206 flocks with a well-documented vaccination history, 99.5% received a Mass type (GI-1) vaccine, 81.5% received a 793B type vaccine (GI-13). QX type (GI-19) vaccine was used only in Algeria and was administered to 14 flocks in this country. Only one flock from Morocco was not vaccinated against IBV. Flocks were mostly vaccinated once or twice. 95 % of the flocks vaccinated with three or four vaccines were from Algeria and represented roughly half of its sampled flocks.

IBV detection rate in acute respiratory syndromes

Two criteria were used to decide if a flock is positive or negative for IBV. These criteria were Ct values, genotyping results, and vaccination program. For Ct values, a threshold was established based on the RT-qPCR Ct values of its four pools of swabs. A flock was considered positive if three out of four of its pool of swabs were RT-qPCR positive with at least one pool with a Ct value ≤ 28 as higher values are more likely to be linked to the detection of traces of the vaccine virus. The flocks failed the first selection criteria were still genotyped as samples with up to 32 Ct values were included in the genotyping

process. Only if classified as a wild-type virus, samples failed the first selection criteria were considered positive for IBV. Consequently, flocks classified as a vaccine type but have low Ct values (high viral shedding) several weeks after the last vaccination were considered positive. Based on these criteria, 55.7% (156/280) of the studied flocks were considered positive for IBV. Among the 124 negative flocks, 22% were RT-qPCR negative and 78% had a Ct > 28 among which only 22 were possible to genotyped and were classified as vaccine type strains. Positivity rate of IBV in Algeria, Tunisia, and Morocco was 69% (56/81), 64% (40/63) and 44% (60/136) of their studied respiratory cases, respectively. Between 2021 and 2022, IBV positivity rate declined from 53% to 36% in Morocco but increased slightly in Algeria and Tunisia.

Phylogeny

From the 156 positive flocks for IBV, 116 IBVs we genotyped. These 300 bp HVR3 sequences were located between the positions 710 and 1030 of the S1 sequence (Beaudette numbering). For the 40 remaining flocks, we were not able to amplify the partial S1 gene even though the viral RNA load was high enough. After the quality control 111 sequences were retained to be used in the phylogenetic analyse. 69% (76/111) of these sequences were identical to a commercially vaccine strain (p-distance <0.01). To avoid crowding the graph, only the 35 sequences with a p-distance higher than 0.01 compared to vaccine strains were included in the analysis. The phylogenetic tree was built using MegaX (**Figure 1**). The detected viruses were designated by the genotype and lineage numbers in which they fall according to the nomenclature suggested by Valastro et al. (2016). A first group of viruses found in Morocco shared 95% nucleotide identity with GI-21 viruses (Italy02). Despite these viruses clustered together within the GI-21 lineage they formed a new sub-lineage. A second group of viruses detected in Algeria and Morocco shared between 97 and 93% nucleotide identity with viruses from North Africa and less than 90% with GI-13 lineage viruses. These viruses were called here "North African" viruses as their lineage was not established yet. The phylogenetic analysis showed that the "North African" viruses formed a new branch within the Genotype I and grouped with other viruses from North Africa. The GI-19 (QX) viruses

were distanced from the QX type vaccine strains and clustered with European viruses from this lineage.

Lineages frequencies and geographic distribution

Seven different lineages were identified in North Africa among the 111 sequences. These lineages were GI-1, -12, -13, -19, -21, -23 and the "North African". The respective lineages frequencies per country were detailed in **Table 1**. The GI-13 viruses were identified in 62 flocks from the three countries and were identical or closely related to either 4/91 (31%) or 1/96 (69%) vaccine strains (p-distance < 0.01). The GI-13 lineage was the most dominant lineage in Algeria (25/44), followed by Morocco (19/43), and Tunisia (18/24). The GI-1 viruses were detected in 14 flocks from the three countries and were all identical to Mass vaccine strain. The GI-19 viruses were found in Algeria (11/44) and Tunisia (2/24). The "North African" viruses were found in Algeria (5/44) and Morocco (5/43). The GI-21 sub-lineage (10/43) and the GI-12 (1 flock) lineage were found only in Morocco. The GI-23 lineage (1 flock) was found only in Tunisia. The 40 non-sequenced positive flocks were from Algeria, Morocco and Tunisia in 12, 12 and 16 flocks respectively.

Vaccination programs and lineages

For the 205 flocks vaccinated for IBV, a wide range of vaccination programs were used. One or multiple live virus vaccine types were administered at one or different timepoints. The vaccination programs were classified based on these two criteria. Group 1 represented 74.6% **(**153/205) of the flocks and were vaccinated with both Mass and 793B type vaccines. Group 2 represented 6.8% (14/205**)** of the flocks and were vaccinated with three vaccine types: Mass and 793B at day one and QX between 10 and 15 days old. Group 3 represented 18.5% (38/205) of the flocks and were vaccinated with Mass type vaccine only (**Table 2**). As there are two strategies for the administration timepoints of the 793B and Mass type vaccines, the Group 1 was split into two subgroups; Subgroup 1.1 represented flocks (119/153) vaccinated with both 793B and Mass types at day one and subgroup 1.2 represented flocks (34/153) vaccinated with Mass type at day one and boosted by 793B type between 10 and 14 days old. Roughly half of the Group 1 flocks

(49%) were positive for an IBV strain other than any of the administered vaccine strains, whereas three-quarters of Group 3 flocks (78%) were positive for a strain other than Mass type.

Flocks of the vaccination Group 2 were either positive for GI-13 or for wild type GI-19 viruses but they were never found positive for the QX vaccine strain. Among the positive results of Group 1, the GI-21, GI-19 and the "North African" viruses represented 10%, 7% and 5% of detections, respectively. For Group 3, the GI-21, the GI-19 and the "North African" viruses represented 8%, 8% and 17% respectively. IBV lineages detected in each vaccination group were detailed in **Table 3**.

Multiple IBV infections

Both 5'UTR RT-qPCR and 793B-1/96 strain specific RT-qPCR were run on the same plate to know if there is a second hidden IBV strain. Based on both RT-qPCRs' Ct values results from the five standards' replications, the Ct difference between the two assays ranged from 1.1 to 2.2 Ct. So, we considered the presence of multiple IBV strain when at least one of the samples on the flock had a Δ Ct of 3 or above. On the other hand, the absence of a Δ Ct cannot definitely confirm the absence of multiple IBV infections since other 793B-like viruses could be present. However, the presence of a Δ Ct of three or more is the evidence of multiple IBV infections. Forty-five flocks identified with a 1/96 vaccine strain were further investigated. Among these 45 flocks, 18 showed discrepancies between the Ct values of the two assays giving insights about multiple IBV infections (**Table S1**). This method was not used for 4/91 positive samples as the vaccine and wild type 4/91 strains are very similar and their differentiation based on RT-qPCR assays is not possible.

Discussion

During this study we sampled clinically diseased broiler flocks showing acute respiratory signs with the aim of assessing the level of contribution of IBV in the respiratory diseases in North Africa. The detected viruses were genotyped to update the epidemiology of IBV in North Africa. In vaccinated flocks, it is always challenging to know if a detected IBV

is related to vaccination or to a field challenge. Here as the flocks were sampled early (first five days) after the onset of the respiratory signs, the viral loads were expected to be high. Therefore, we used the Ct values as a selection criterion to discard results that were most likely due to the vaccination. This selection process prevented increasing artificially the positivity rate of IBV. Through this study we found that IBV was responsible for more than half (55.7%) of the respiratory disease cases in the North African broiler flocks between 2020 and 2022. Per country, we found that this positivity rate is almost 20% lower in Morocco (44%) than in Algeria (69%) or in Tunisia (64%). In Morocco we noticed that this positivity decreased in 2022 (36%) comparing to 2021 (53%). Between 2010 and 2014, the positivity rate of IBV in Morocco was 8% higher than what we are reporting here [225]. This rate could be inflated by the detection of vaccine strains that were not excluded from this previous study. In addition, two-thirds of the studied flocks showed respiratory signs, so it is more insightful to compare the positivity rate with these flocks only. In Algeria and Tunisia, little is known about the epidemiology of IBV, so this study is the largest survey in these two countries as of today, up to the authors' knowledge.

The current study showed that the GI-13 was the most dominant genotype. The high circulation of this genotype was suspected to be related to the wide use of 793B type vaccine (81.5%). In the previous Moroccan survey between 2010 and 2014, the GI-13 lineage was detected in only 2% of the flocks whereas the GI-1 lineage (Mass) was the most prevalent (66%). This could be related to the vaccination strategy at that time as 73% of the studied flocks received a Mass type vaccine when only 3.6% received a 793B type vaccine [225]. Probably, in the period of the present study, the massive use of the 793B type vaccine masked the detection of Mass type even if the latter vaccine is still highly used (99.5%). Similarly in Poland, Legnardi et al. [265] found that the 793B vaccine type was significantly more detected than Mass type even though, both vaccines were equally used. This could be explained by the longer persistence and the higher titers reached by the 793B type vaccines compared to Mass type [247]. These findings stress the necessity to interpret the surveillance results in conjunction with the vaccination context. As we are dealing with clinically diseased flocks, the detection of the 793B

vaccine strain could be explained by different hypothesis. First, we know that between a pathogenic 4/91 and the 4/91 vaccine strain, the p-distance could be less than 0.01 based on the complete S1 sequence and zero based on our 300bp HVR3 sequence [266]. Second, the detected 793B could be linked to the spread of the vaccine strain in case of multi-age flocks or in an area with highly dense farms and/or suboptimal biosecurity standards. Third, depending on the specificity of the genotyping primers to the different viruses, the co-presence of the vaccine genome with a wild type strain can hinder the amplification of the latter virus due to specificity gap. In this case the flock could turn false positive for the vaccine strain. We were able to demonstrate this by using simultaneously two RT-qPCR assays. The first assay targeted a highly conserved sequence within IBV genome and the second assay was strain specific as it targeted a specific sequence within the S1 gene. In case of the discrepancy between the Ct values of these normally comparable assays, insights about multiple IBV infections were recorded.

Thus, the use of a multiple genotyping primers sets, or the use of next generation sequencing could enable the detection of these multiple IB viruses in the same sample.

Based on the nucleotide pairwise distance and the IBV tree topology, the GI-21 Moroccan viruses reported in the present study were suspected to form a new GI-21 sub-lineage. These viruses were found to form a new branch within the GI-21 lineage. Neither the Moroccan nor the European GI-21 viruses clustered within this new branch except a Romanian virus detected in 2017. Bali et al. (2022) showed that this Romanian virus emerged from the recombination between the major parents GI-21, GI-19 and GI-1 and the minor parent GI-13. The GI-21 (Italy02) was originally, reported in Italy in 1999 but was later found in Russia [267]. In Morocco, the GI-21 lineage was detected for the first time in 2010 and was described to be distinct from the European one [59]. Between 2010 and 2014, the GI-21 lineage was found to be the most prevalent after the GI-1 (Mass type) [225]. Interestingly, during our two years of study, the Moroccan GI-21 virus of 2010 was not detected in any of the flocks. We hypothesized that the newly emergent GI-21 virus replaced the previous one. The first emergence of the GI-21 lineage in Morocco was suggested to be linked to the historical commercial relationships between Morocco and Spain [225]. Historically, the GI-21 was the predominant lineage in most of the European

countries until 2004. However, since 2004, the prevalence of this lineage has been declining except in Spain where this lineage remained predominant until 2011 [203, 268]. Regarding the newly reported GI-21 sub-lineage, it is very unlikely that this virus emerged from neighbouring countries or commercial exchange since it was not reported elsewhere before, except in Romania. No commercial exchange of poultry products was recorded between the two countries. Therefore, the hypothesis of the emergence of this new sub-lineage virus from recombination events is more plausible. It was already demonstrated through a field study in seven European countries that IBV is prone to recombination as 90% of field strains exhibited evidence of recombination events [256]. In addition, during this study we demonstrated the co-circulation of multiple IBV lineages in the same geographic area which would further increase the risk of recombination.

The "North African" viruses found in Algeria and Morocco formed a new branch within the genotype I and showed high p-distance (> 0.1) with any other GI- lineages. To establish a new lineage, Valastro et al. [45] recommended referring first to the topology of the tree and second to the nucleotide distance. Based on these two criteria, we suggest that the "North African" viruses created to a new lineage within genotype I. The "North African" viruses of the present study showed high nucleotide identity and close relationship with viruses previously reported from Algeria, Morocco, and Tunisia and seemed to belong to this lineage. The first virus in this lineage was detected in Algeria in 2012 [60] and was described as nephropathogenic IBV. This lineage was detected again in Algeria in 2013 [11]. In 2014, three viruses from this lineage were detected in Morocco but were not accurately identified. These sequences were not linked to any publication and were submitted to GenBank under the name of 4/91 (MF156217). In case this new lineage is becoming more established, it would be important to correct the name of these sequences to avoid creating confusion when referring to BLAST result. In 2016, two "North African" viruses were isolated from broiler farms in Tunisia and were considered as unique variant even if they were found closely related to the 2013 Algerian viruses [63]. Unfortunately, partial S1 gene sequence of 800bp overlapping HVR1 and 2 was produced for these two isolates and not the HVR3. The HVR1 and 2 are not the most abundant sequences in GenBank, so by blasting the HVR3 it is impossible to retrieve

these sequences or to know that they already exist in Tunisia. This is an additional reason to be encouraged to sequence the complete S1 gene instead of the HVRs [45]. The complete S1 gene is needed to conclusively establish this lineage.

The circulation of the GI-19 lineage (QX) in Algeria and Tunisia was not reported prior to this study. These GI-19 viruses were closely related between Tunisia and Algeria and were both different from the QX vaccine strains. In the studied countries, the QX type vaccines are commercially available only in Algeria and were used in 19% of the vaccinated flocks in this country. These viruses have close relationship with European GI-19 viruses. In Europe, the GI-19 lineage has been circulating since 2004 and today is considered as the most prevalent lineage in this continent [203, 269–271].

The GI-23 lineage was detected in one flock from Tunisia. In 2019 this lineage was detected for the first time in Tunisia, but its circulation was very low (Jbenyeni et al., 2023.a). It was suggested that the vaccine combination of Mass and 793B stopped probably this virus from spreading. We showed again that this lineage is insidiously circulating (one farm) in broiler farms.

In none of the flocks of the vaccination Group 2 the QX vaccine strain was detected and 4/14 of these flocks were positive for a wild type QX virus. The absence of the QX vaccine strain could be explained by its interference with the 793B vaccine strain administered 10 to 15 days earlier than the QX vaccine. It was stated by [247] that 793B-type live vaccine conferred protection against IBV field challenge by colonising the trachea for a long period (eight weeks). It is very likely that the QX vaccine was cleared by the birds soon after its administration as in 6/14 flocks the 793B was detected. The detection of field-challenge viruses in Group 1 and 2 could be due to improper vaccine administration or to other co-infection pathogens that could decrease immunity or destroy local protection barriers.

For this study we were limited to the partial S1 sequence, which reduced our ability to infer the most precise conclusions about the phylogenetic relationships, origin, and recombination events of the studied viruses. First, when blasting the HVR3 S1 sequence, only homologous viruses for which the HVR3 sequence or the complete S1 sequence is available in the database will appear. Homologous viruses for which HVR1 or 2 is

available in the database will not be recognised. Second, the use of partial S1 sequence for phylogenetic analysis, can only partially predict the phylogenetic relationships. In the case of recombination, partial and complete S1 sequences will not show the same phylogenetic relationships.

In this study we showed that approximately half of the respiratory cases in North Africa were positive for IBV. This study also showed the co-circulation of seven IBV lineages and allowed their characterization. A continuous surveillance of IBV is recommended to keep a high level of awareness about new emerging variants and ensure a persistent efficacy of the applied control strategy.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Ceva Santé Animale team in Algeria Morocco and Tunisia, especially Dr. Amal Essalah-Bennani, Dr. Hanan Balil, Dr. Mohamed-Amine Bouderbal, Dr. Riad Mennana, and Dr. Zied Chtioui for their help in collecting samples and flocks' data. We also thank Moncef Bouzouaia, DVM, Professor from Ecole Nationale Vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisia for his help and effort dedicated to the project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ETHICAL STATEMENT

This study includes swab samples obtained from poultry farms in Tunisia by the first author; thus, ethical statement or special permissions are not required.

Tables

Table 1 IBV lineages distribution among the countries

	GI-1	GI-12	GI-13	GI-19	GI-21	GI-23	« North African »	untyped	Total
Algeria	3	-	25	11	-	-	5	11	55
Morocco	8	1	19	-	12	-	5	16	61
Tunisia	3	-	18	2	-	1	-	16	40
Total	14	1	62	13	12	1	10	43	156

TABLE 2 IBV detection in vaccinated groups

	Groupe 1		Groupe 2	Groupe 3
	Group 1.2	Group 1.1		
IBV positive	19	69	10	24
IBV negative	15	50	4	14
Total	153		14	38
Algeria	49		14	12
Morocco	70			10
Tunisia	34			16

TABLE 3 IBV lineages in vaccinated groups

		GI-1	GI-12	GI-13	GI-19	GI-21	GI-23	« North African »	untyped	Total
Groupe 1	**1.1**	3	-	28	4	9	-	3	22	88
	1.2	2	-	12	2	-	-	1	2	
Groupe 2		-	-	6	4	-	-	-	-	10

Groupe 3	5	1	3	2	2	1	4	6	24

406

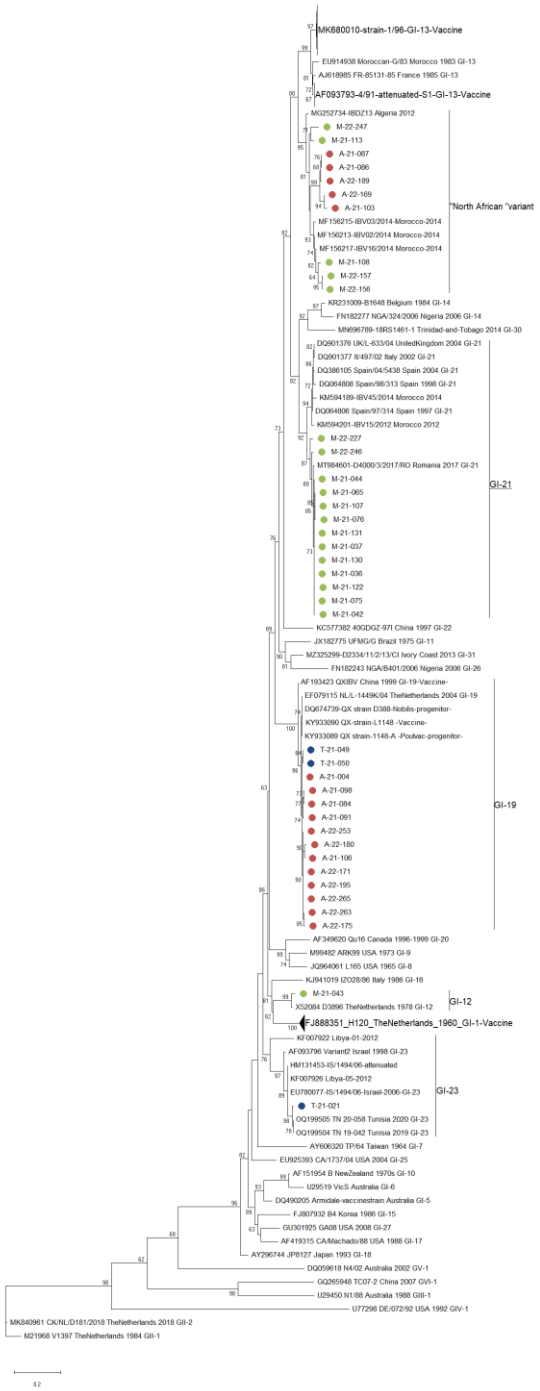


FIGURE 1 Phylogenetic tree based of S1 gene's HVR3 nucleotide sequences of 137 detected IBV viruses between 2021 and 2022 in the present study. Viruses detected in Morocco, Algeria

and Tunisia were labelled respectively with green, red, and blue circles. Reference sequences of other IBV lineages available in GenBank were also included. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with General Time Reversible model and 1000 bootstrap replications in MEGA X. There was a total of 322 positions in the final dataset. Only bootstrap values higher to 60 were conserved.

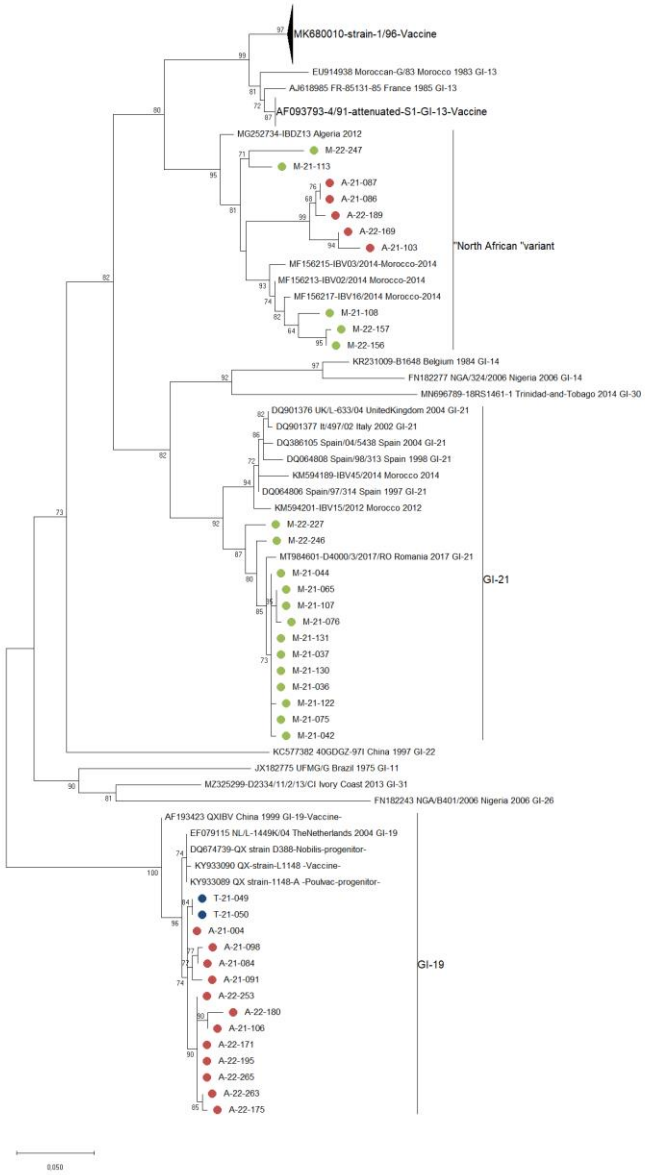


FIGURE 2 Phylogenetic tree based of S1 gene's HVR3 nucleotide sequences of 137 detected IBV viruses between 2021 and 2022 in the present study. Viruses detected in Morocco, Algeria and Tunisia were labelled respectively with green, red, and blue circles. Reference sequences of other IBV GI lineage available in GenBank were also included. The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method with General Time Reversible model and 1000

bootstrap replications in MEGA X. There was a total of 322 positions in the final dataset. Only bootstrap values higher to 60 were conserved.

Discussion générale et perspectives

Au cours des 20 dernières années, le secteur avicole au Maghreb a connu une croissance rapide. Les niveaux de production de volaille ont doublé et la viande blanche est ainsi devenue la source principale de protéines dans ces pays [3]. Cependant, la plus grande menace pour ce secteur est représentée par les maladies respiratoires, première cause de pertes économiques pour la volaille commerciale dans le monde. Ces maladies respiratoires reposent essentiellement sur des infections multiples, éventuellement associées à des facteurs de risque techniques, alors que l'infection avec un seul agent pathogène semblant être l'exception sur le terrain [164]. Plusieurs études ont déjà montré que la pathologie respiratoire était multi étiologique et que les signes cliniques observés sur le terrain étaient le résultat de co-infection [10, 11]. Les interactions entre les agents pathogènes peuvent aggraver les signes cliniques de l'infection par les mêmes agents séparés [14]. Le rôle des co-infections dans l'aggravation des signes cliniques semble s'appliquer en particulier au virus H9N2 qui, dans des conditions expérimentales chez les poulets, induit des signes cliniques faibles à modérés, alors que sur le terrain, il est associé à des signes cliniques graves et à une mortalité élevée [13, 39, 49]. Plusieurs infections expérimentales ont permis de reproduire les signes cliniques du virus H9N2 observés sur le terrain en le co-infectant avec d'autres pathogènes respiratoires.

Le virus H9N2 a été introduit en 2006 au Maghreb par la Libye [213] puis la Tunisie en 2009 [181]. Ce virus est resté limité à la Tunisie où il a circulé jusqu'en 2016 pour disparaitre ensuite [183]. Le virus H9N2 a été introduit une deuxième fois au Maghreb par le Maroc en 2016. Ce virus a rapidement diffusé vers plusieurs pays de l'Afrique de l'ouest [182, 187] et l'Algérie [186, 188]. Cette souche de H9N2 semblait aussi être plus pathogène que les souches précédemment décrites [39, 159]. En Tunisie, le statut épidémiologique actualisé concernant le virus H9N2 était inconnu.

L'objectif de la première étude était d'investiguer l'origine de la pathologie respiratoire en Tunisie et les éventuelles co-infections. Cette étude a visé aussi à confirmer la circulation du

virus H9N2 et de le génotyper. En deuxième temps ce volet du projet avait un objectif méthodologique pour valider le protocole, avant extension au Maroc et l'Algérie.

Cette étude a révélé la circulation de nombreux pathogènes respiratoires dans les élevages étudiés en Tunisie, pendant les trois années. Du fait de son caractère longitudinal, cette étude a permis de détecter trois épidémies virales dans les élevages de volailles commerciales de chair en Tunisie. L'agent responsable de la première épidémie qui est apparu en avril 2018 était le virus H9N2. Après cette première détection, le virus est devenu endémique et a été détecté à plusieurs reprises dans les fermes incluses dans cette étude durant les trois ans. Cependant, des phases d'interruption entre les vagues d'infection ont été remarquées. Il a été noté aussi que dans la même ferme, l'infection peut disparaitre d'un lot à un autre. Ces constatations suggèrent que l'infection par H9N2 et la manifestation des signes cliniques dépendent d'autres facteurs. Dans l'ensemble, le virus H9N2 était le pathogène respiratoire le plus détecté (54%) sur toute la période de l'étude. L'analyse phylogénétique a révélé que les virus H9N2 détectés pendant les vagues de 2018 et de 2020 étaient monophylétiques, suggérant qu'ils proviennent de la même introduction. Ces virus H9N2 sont par contre éloignés des souches introduites en Tunisie en 2009, ce qui suggère une nouvelle introduction virale. [181, 183]. Le nouveau virus introduit appartenait à la lignée G1 et partageait l'ancêtre commun le plus proche avec les virus qui circulaient en Afrique du Nord depuis 2016 [182]. Cette étude est la première à rapporter la circulation de cette souche de H9N2 dans les élevages de volailles commerciales en Tunisie. Il est intéressant de noter qu'une équipe de recherche qui effectue la surveillance chez les oiseaux sauvages Tunisie, a détecté le même virus (99% d'identité nucléotidique) dans un prélèvement environnemental d'une lagune dans la même région de notre étude. Cette détection ne renseigne pas sur l'origine du virus. La date de détection coïncidait aussi avec la date de notre première détection du virus H9N2 [193]. Nos résultats soutiennent l'hypothèse proposée par Larbi et al. (2022) selon laquelle la transmission du virus H9N2 se fait plutôt des élevages de volailles commerciales vers les oiseaux sauvages par la contamination de leur environnement. Compte tenu de l'étroite parenté phylogénétique entre le virus H9N2 introduit en Tunisie et les virus circulant dans les pays voisins au cours de la même période, nous supposons que l'origine de cette introduction peut avoir un lien avec les échanges commerciaux de volaille. De futures

études phylodynamiques sont nécessaires pour reconstruire les chaines de transmission du virus H9N2 au Maghreb.

Dans l'ordre chronologique, l'agent responsable de la deuxième épidémie qui est apparue en février 2019 était le virus de la maladie de Newcastle (MN). L'analyse phylogénétique des virus MN a montré que les virus détectés étaient identiques entre eux et appartiennent au génotype VII.2. Les virus MN de 2019 appartenaient au même génotype du virus qui a émergé en 2013 avec une certaine distance génétique qui suggère une nouvelle émergence.

La troisième épidémie était induite par le métapneumovirus aviaire (aMPV), en février 2020. Le aMPV est le troisième virus le plus détecté dans cette étude (28%) et il a été détecté dans les fermes surveillées dans le cadre de notre étude, mais aussi dans d'autres fermes hors surveillance et cela dans différents gouvernorats. Ces observations supposent l'émergence et la dissémination du aMPV dans les élevages de poulet de chair. Dans un travail de surveillance du aMPV de 2015 à 2019, une autre équipe de recherche a détecté l'apparition du métapneumovirus en 2019 [272]. L'analyse phylogénétique a regroupé les aMPV détectés en deux groupes différents au sein du sous-type B et en dehors du cluster des souches vaccinales, ce qui suggère la circulation de deux virus différents. Notre étude a permis de confirmer cette différence par la présence d'une signature génétique unique à chacun de ces deux virus dans la région non codante entre les gènes SH et G. Cette signature confirme que ces deux virus sont différents entre eux mais qu'ils diffèrent aussi des virus vaccinaux.

Une circulation endémique du virus de la bronchite infectieuse (BI) a également été identifiée dans notre étude. Le virus BI a été le deuxième virus détecté (53%) après le H9N2. La majorité des souches détectées sont apparentées aux souches vaccinales de la lignée GI-13 (groupe 793B). Cependant, un résultat original de cette étude est la détection pour la première fois, de virus appartenant à la lignée GI-23 (Variant 2). Ce virus, a été détecté à deux reprises à cinq mois d'intervalle et dans la même ferme. Cela représente le premier rapport officiel de la présence de ce variant en Tunisie. Néanmoins Chtioui et al. [273] avait déjà communiqué dans un congrès sur la détection de ce virus en 2018 en Tunisie. Ce virus qui circulait principalement au Moyen-Orient, a récemment diffusé dans plusieurs pays d'Europe [259] et d'Amérique du Sud [252].

Cette première étude a permis de montrer que plus de la moitié des lots étudiés (24/39) était co-infectée par deux agents pathogènes ou plus. Il est très difficile voire impossible de prédire la présence de co-infection sur la base des seuls signes cliniques observés sur les lots étudiés. Cela montre l'importance du recours à des analyses complémentaires qui permettent de cribler un large panel d'agents pathogènes. Ces résultats sont cohérents avec des études précédentes [11, 164]. Dans notre étude, les combinaisons entre pathogènes viraux les plus fréquemment observées étaient H9N2+BI (6/16) et H9N2+aMPV (8/16). Le virus H9N2 a été le principal contributeur (15/16) dans ces co-infections. Les co-infections avec H9N2 pourraient expliquer l'aggravation des signes cliniques et la mortalité dans ces lots.

Les résultats de cette première étude ont montré que la conception de notre étude, qui consistait à cibler un large panel d'agents pathogènes respiratoires et à échantillonner des oiseaux cliniquement malades au cours de la phase aigüe d'un épisode respiratoire, était adaptée pour instruire notre question de recherche. Cette conception nous a permis de détecter dans la quasi-totalité des cas un agent viral respiratoire (donc avant toute surinfection bactérienne opportuniste) ; de plus, cette étude aura permis d'identifier à plusieurs reprises le aMPV qui est généralement difficile à détecter à cause de sa période d'excrétion courte.

Cette première étude, même à une petite échelle, a montré le caractère dynamique des infections respiratoires, d'où l'importance d'une surveillance continue dans le temps et ciblée sur les cas aigus avec des signes respiratoires. Nos premières observations ont montré une fréquence élevée des co-infections et une contribution importante de H9N2. Pour mieux comprendre encore le rôle des co-infections dans l'infection H9N2 et la contribution de H9N2 dans le syndrome aigu respiratoire nous avons élargi la zone d'étude à trois pays du Maghreb à savoir, Algérie, Maroc et Tunisie (deuxième étude). La collection des échantillons était étalée sur deux années.

Durant la deuxième étude, 300 lots de volailles de chair (poulet et dinde) ont été prélevés sur deux ans. Il est à noter que les cas respiratoires ont été rapportés et échantillonnés tout au long de l'année, donc sans un effet clair de saisonnalité. Néanmoins, en valeurs absolues, un nombre plus élevé de cas a été collecté au printemps et en hiver. Ces résultats montrent que la pathologie

respiratoire est peu saisonnière au Maghreb comme on le croit souvent sur la base des données européennes.

Notre étude a montré que le H9N2 était de loin le pathogène le plus détecté dans les épisodes respiratoires (88 %) en Algérie, au Maroc et en Tunisie, ce qui montre une forte contribution de ce virus à la pathologie respiratoire. Cette forte détection du virus H9N2 suggère une circulation endémique et une pression virale élevée dans les élevages de volailles au Maghreb. Le taux de détection le plus élevé a été retrouvé au Maroc (97%) suivi par l'Algérie (85%) puis la Tunisie (75%). Les taux de détection de H9N2 ont montré une augmentation par rapport à un travail précédent au Maroc [185] et à notre première étude en Tunisie. Les niveaux de détection de H9N2 au Maroc ont atteint leurs niveaux maximums suggérant que les mesures de contrôle mises en place ne sont pas suffisantes. Le taux de détection du virus H9N2 n'a pas montré une variation claire entre les saisons. Même si dans cette étude, les critères d'inclusions n'étaient pas définis pour prioriser les élevages qui pratiquent la vaccination H9N2, 32% des lots étaient vaccinés contre H9N2 et la quasi-totalité d'entre eux étaient positifs et présentaient des signes cliniques. Plusieurs études ont mis en question l'efficacité des vaccins inactivés en raison de l'interférence entre le vaccin et les d'anticorps d'origine maternelle (AOM) [274]. D'autres solutions vaccinales sont nécessaires pour pallier ce problème. L'âge des oiseaux dans la majorité des cas prélevés dans le cadre de cette étude a été supérieur à trois semaines. Les AOM (dus à la vaccination et/ou l'infection des reproducteurs par le virus sauvage) dirigés contre H9N2 semblent influencer l'âge d'apparition des syndromes respiratoires, d'autant plus si H9N2 est considéré comme un facteur principal. L'âge d'apparition des syndromes respiratoires coïncide avec la diminution du taux d'AOM contre H9N2 sous le seuil de protection [230]. Le rôle de ces AOM nécessite d'être davantage étudié.

Dans l'ensemble, des co-infections ont été détectées dans 82 % des épisodes respiratoires, ce qui corrobore des études antérieures [10, 11] montrant que le syndrome aigu respiratoire est multi étiologique.

Le criblage simultané des principaux agents pathogènes respiratoires a montré que H9N2 est le plus souvent retrouvé en co-infection avec d'autres agents pathogènes (n= 225, 85 %) plutôt que seul (n= 39, 15 %). Cette observation suggère que H9N2 est moins susceptible d'induire

des signes cliniques seul mais plus souvent en co-infections. La fréquence élevée des co-infections avec H9N2 peut être expliquée par son effet immunosuppresseur, ce qui favorise les surinfections [154, 168]. Ces observations suggèrent que H9N2 contribue fortement au syndrome aigu respiratoire.

Le virus H9N2 a été impliqué dans des co-infections avec les sept autres pathogènes criblés, le plus souvent avec le virus BI, aMPV et les pathogènes bactériens. Le H9N2 était très souvent associé au virus de la BI (n= 130), ce qui amène à étudier plus spécifiquement une éventuelle synergie entre les deux virus. Des études expérimentales antérieures ont montré que la co-infection entre H9N2 et BI aggrave les signes cliniques des infections séparées de ces agents pathogènes [13, 14, 162]. L'ordre des infections entre ces deux virus semble avoir peu d'importance quant à l'aggravation des signes cliniques. Les résultats de notre étude suggèrent que l'ordre des co-infections varie en fonction de l'âge et le statut vaccinal contre H9N2 et BI. Au jeune âge, les poulets sont plus susceptibles d'être infectés par la BI en premier, qui facilite la co-infection par H9N2. Au-delà de trois semaines d'âge, les poulets deviennent plus susceptibles à l'infection par H9N2 à cause de la diminution des taux d'AOM et bien qu'ils aient été correctement vaccinés contre la BI, ils étaient dans plusieurs cas infectés par des souches sauvages de la BI. Dans plusieurs cas, H9N2 a été détecté avec des souches vaccinales de BI qui peuvent persister chez l'animal ou dans l'environnement. Par conséquence, le H9N2 pourrait compromettre la réponse vaccinale, principal moyen de contrôle de la BI. Comme les souches vaccinales sont omniprésentes dans la trachée et leur détection est inévitable, nous avons défini des critères pour différencier entre les souches vaccinales et les souches sauvages. L'analyse génétique des virus BI nous a permis de confirmer qu'au moins sept lignées différentes de BI sont en circulation plus ou moins concomitamment dans le Maghreb. Cette analyse a montré aussi que certaines lignées sont partagées entre les pays. La grande diversité des souches et la perméabilité des frontières représentent un risque majeur pour un virus qui est enclin aux recombinaisons et mutations [250]. Une surveillance continue dans le temps s'impose pour détection une éventuelle évolution des souches de virus BI et anticiper l'adaptation des stratégies vaccinales. Le génotypage basé sur les régions hyper variables du gène S1(HVR) a aussi montré ses limites face à la l'omniprésence des souches vaccinales et

l'émergence continue de nouveaux variants : la présence des souches vaccinales peut masquer la détection de souches sauvages en fonction de la spécificité des amorces de séquençage.

Une grande proportion de lots positifs pour le aMPV (78 %) étaient également positifs pour le H9N2. Seuls, ces deux virus sont peu susceptibles d'induire des signes cliniques sévères chez le poulet [30, 67] tandis que leur association semble aggraver les signes cliniques. Nos travaux sont les premiers à constater qu'il y a une probable synergie entre ces deux virus. Les résultats de cette étude consolident les hypothèses de la première concernant la fréquence de co-infection entre H9N2 et aMPV et la possible synergie entre les deux virus. A notre connaissance, il n'y a pas de travaux qui ont été faits auparavant sur cette co-infection. Des études supplémentaires sont nécessaires pour reproduire cette co-infection dans des conditions expérimentales et comprendre les mécanismes de synergies entre ces deux virus.

Les co-infections de H9N2 avec les trois bactéries MS (65%), ORT (57%) et MG (20%) ont été également très fréquentes. Il n'était pas attendu d'avoir des charges bactériennes aussi élevées pendant la phase aigüe des syndromes respiratoires. Les oiseaux peuvent être des porteurs asymptomatiques de mycoplasme et d'autres facteurs comme les co-infections virales déclenchent les signes cliniques [104]. Il est vraisemblable que le virus H9N2 joue un rôle majeur dans le déclenchement des signes cliniques chez les oiseaux porteurs de Mycoplasmes. A notre connaissance, la co-infection expérimentale des Mycoplasmes par H9N2 n'a pas été reproduite néanmoins, la co-infection entre MG et le virus IAFP H3N8 a montré une aggravation des signes cliniques de l'infection par les deux virus séparés [108]. La forte prévalence de MG, MS et ORT dans les élevages au Maghreb prédispose d'avantage les oiseaux au risque lié au virus H9N2. Des plans de lutte contre les Mycoplasmes sont nécessaires pour limiter l'impact du virus H9N2 et réduire les infections respiratoires. Le taux élevé de positivité des poulets de chair à l'ORT est également une donnée peu décrite. Cette bactérie est susceptible de jouer un rôle dans l'aggravation des signes cliniques de H9N2. Les travaux dans ce sens sont rares. Une étude chinoise a montré lors de co-infection expérimentale que la pré-infection de H9N2 par ORT augmente la mortalité des poulets de chair jusqu'à 80% [121]. Des études supplémentaires qui permettent d'évaluer la prévalence de l'ORT dans les élevages de poulet de chair au Maghreb sont nécessaires. La maîtrise d'ORT semble être importante et à ne pas

négliger dans un contexte où H9N2 est endémique. Des plans de surveillance et de contrôle de l'ORT sont aussi nécessaires.

Ce travail a dévoilé le niveau de complexité des syndromes respiratoires au Maghreb. Les huit pathogènes recherchés ont été détectés. Néanmoins, le virus H9N2 reste de loin le plus constant. En pratique, peu importe le rôle de H9N2 dans l'initiation ou l'aggravation des syndromes respiratoires, la lutte contre ce virus semble être nécessaire pour réduire le nombre de cas respiratoires et les pertes dues à la pathologie respiratoire dans ce secteur important pour l'économie de ces pays. Le plan de lutte doit comporter l'utilisation de solutions de prévention plus efficaces suivies par des programmes de surveillance à long terme. La surveillance orientée vers les cas aigus respiratoires donnera une vraie estimation de l'efficacité des méthodes mises en place.

Conclusion

Notre étude apporte des données récentes et détaillées pour comprendre l'étiologie des syndromes respiratoires dans les trois pays du Maghreb : Algérie, Maroc et Tunisie. Les résultats de ce travail ont confirmé que l'origine des syndromes respiratoires est dans la majorité des cas multi-étiologique. Plusieurs profils de co-infection ont été identifiés pendant cette étude, ce qui a permis de confirmer des combinaisons déjà décrites entre agents pathogènes mais aussi de découvrir des nouvelles qui mériteront d'être plus étudiées.

Même si les huit pathogènes majeurs recherchés ont été détectés pendant ce travail, le virus H9N2 reste de loin le plus fréquent. Ce travail a confirmé la grande implication du virus H9N2 dans les cas respiratoires au Maghreb. La détection de H9N2 dans les cinq premiers jours du syndrome respiratoire et son implication très fréquente dans les co-infections montre son rôle pivot dans l'apparition des signes cliniques. Il est vraisemblable que H9N2 a un rôle dans l'initiation mais aussi dans l'aggravation des syndromes respiratoires. La lutte contre le H9N2 est donc une priorité pour maitriser les syndromes respiratoires et leur impact économique sur le secteur avicole. Le plan de lutte doit comporter l'utilisation de solutions de prévention plus efficaces suivies de programmes de surveillance à long terme. La surveillance orientée vers les cas aigus respiratoires semble être informative et donnera une vraie estimation de l'efficacité des moyens de lutte.

Ce travail a montré la dynamique épidémiologique des virus respiratoires et leurs génotypes, ce qui montre l'importance des travaux de surveillance pour adapter les programmes de vaccination dans les élevages de volailles à la situation du terrain. Les résultats ont montré que le aMPV a été récemment introduit dans la région et que sa fréquence dans les syndromes respiratoires est en train d'augmenter année après année. Ce virus a été fortement associé à H9N2. Pratiquer la vaccination contre le aMPV peut être aussi la solution. Pour la bronchite infectieuse la surveillance permet le suivi épidémiologique d'un virus très changeant ce qui est primordial pour adapter les méthodes de lutte. La détection précoce de nouveaux variants

permet de les isoler et les utiliser dans des épreuves virulentes sur des oiseaux vaccinés pour tester l'efficacité des vaccins utilisés.

Ce travail a montré l'importance d'aborder la gestion des pathologies respiratoires à travers le criblage simultané d'un panel d'agents pathogènes respiratoires. Il est judicieux d'adopter cette approche dans les recherches cliniques sur les maladies respiratoire et pour le diagnostic des syndromes respiratoires sur le terrain. Les outils de biologie moléculaire sont devenus de plus en plus accessibles aux laboratoires de terrain, avec des coûts réduits, ce qui devrait permettre une meilleure connaissance des agents impliqués dans les syndromes respiratoires en aviculture.

Références bibliographiques

1. FAO, (2020) http://www.fao.org/faostat/en/#data

2. Ben Hammouda W, Faidi O (2017) Secteur avicole : Recensement des établissements avicoles 2015-2016

3. World Bank (2011) World Livestock Disease Atlas: A Quantitative Analysis of Global Animal Health Data (2006-2009). World Bank and TAFS forum

4. Hinz KH, Heffels-Redmann U, Pöppel M (1992) [Multicausal infectious respiratory tract disease of young fattening turkeys]. Dtsch Tierarztl Wochenschr 99:75–78

5. Kleven SH (1998) Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. Poult Sci 77:1146–1149. https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1146

6. Arya PL, Sautter JH, Pomeroy BS (1971) Pathogenesis and Histopathology of Airsacculitis in Turkeys Produced by Experimental Inoculation of Day-Old Poults with Mycoplasma Meleagridis. Avian Diseases 15:163–176. https://doi.org/10.2307/1588401

7. Ginns CA, Browning GF, Benham ML, Whithear KG (1998) Development and application of an aerosol challenge method for reproduction of avian colibacillosis. Avian Pathol 27:505–511. https://doi.org/10.1080/03079459808419375

8. Kleven SH, King DD, Anderson DP (1972) Airsacculitis in Broilers from Mycoplasma synoviae: Effect on Air-Sac Lesions of Vaccinating with Infectious Bronchitis and Newcastle Virus. Avian Diseases 16:915–924. https://doi.org/10.2307/1588772

9. Nakamura K, Imai K, Tanimura N (1996) Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. J Comp Pathol 114:11–21. https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80058-2

10. Roussan DA, Haddad R, Khawaldeh G (2008) Molecular Survey of Avian Respiratory Pathogens in Commercial Broiler Chicken Flocks with Respiratory Diseases in Jordan. Poultry Science 87:444–448. https://doi.org/10.3382/ps.2007-00415

11. Sid H, Benachour K, Rautenschlein S (2015) Co-infection with Multiple Respiratory Pathogens Contributes to Increased Mortality Rates in Algerian Poultry Flocks. Avian Dis 59:440–446. https://doi.org/10.1637/11063-031615-Case.1

12. Parvin R, Kabiraj CK, Hossain I, Hassan A, Begum JA, Nooruzzaman M, Islam MdT, Chowdhury EH (2022) Investigation of respiratory disease outbreaks of poultry in Bangladesh using two real-time PCR-based simultaneous detection assays. Frontiers in Veterinary Science 9:

13. Kong L, You R, Zhang D, Yuan Q, Xiang B, Liang J, Lin Q, Ding C, Liao M, Chen L, Ren T (2021) Infectious Bronchitis Virus Infection Increases Pathogenicity of H9N2 Avian Influenza Virus by Inducing Severe Inflammatory Response. Front Vet Sci 8:824179. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.824179

14. Belkasmi SFZ, Fellahi S, Touzani CD, Faraji FZ, Maaroufi I, Delverdier M, Guérin J-L, Fihri OF, El Houadfi M, Ducatez MF (2020) Co-infections of chickens with avian influenza virus H9N2 and Moroccan Italy 02 infectious bronchitis virus: effect on pathogenesis and protection conferred by different vaccination programmes. Avian Pathology 49:21–28. https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1656328

15. Kirbaş G, Takci İ (2018) Anatomy of respiratory system in poultry. MAEU Vet Fak Derg 3:141–147. https://doi.org/10.24880/maeuvfd.433946

16. Knowles TG, Kestin SC, Haslam SM, Brown SN, Green LE, Butterworth A, Pope SJ, Pfeiffer D, Nicol CJ (2008) Leg disorders in broiler chickens: prevalence, risk factors and prevention. PLoS One 3:e1545. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001545

17. Wilson JB, Julian RJ, Barker IK (1988) Lesions of right heart failure and ascites in broiler chickens. Avian Dis 32:246–261

18. Brain JD (1996) Conference Summary: Environmental Lung Disease: Exposures and Mechanisms. Chest 109:74S-78S. https://doi.org/10.1378/chest.109.3_Supplement.74S

19. Shen D, Wu S, Dai PY, Li YS, Li CM (2018) Distribution of particulate matter and ammonia and physicochemical properties of fine particulate matter in a layer house. Poultry Science 97:4137–4149. https://doi.org/10.3382/ps/pey285

20. Fernández A Peña, Demmers TGM, Tong Q, Youssef A, Norton T, Vranken E, Berckmans D (2019) Real-time modelling of indoor particulate matter concentration in poultry houses using broiler activity and ventilation rate. Biosystems Engineering 187:214–225. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2019.09.004

21. Dai P, Shen D, Tang Q, Huang K, Li C (2020) PM2.5 from a broiler breeding production system: The characteristics and microbial community analysis. Environmental Pollution 256:113368. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113368

22. Schulz J, Ruddat I, Hartung J, Hamscher G, Kemper N, Ewers C (2016) Antimicrobial-Resistant Escherichia coli Survived in Dust Samples for More than 20 Years. Front Microbiol 7:866. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00866

23. Naseem S, King AJ (2018) Ammonia production in poultry houses can affect health of humans, birds, and the environment—techniques for its reduction during poultry production. Environ Sci Pollut Res 25:15269–15293. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2018-y

24. Nagaraja KV, Emery DA, Jordan KA, Sivanandan V, Newman JA, Pomeroy BS (1984) Effect of ammonia on the quantitative clearance of Escherichia coli from lungs, air sacs, and livers of turkeys aerosol vaccinated against Escherichia coli. Am J Vet Res 45:392–395

25. Ellen HH, Bottcher RW, von Wachenfelt E, Takai H (2000) Dust levels and control methods in poultry houses. J Agric Saf Health 6:275–282. https://doi.org/10.13031/2013.1910

26. Wood DJ, Van Heyst BJ (2016) A Review of Ammonia and Particulate Matter Control Strategies for Poultry Housing. TransASABE 59:329–344. https://doi.org/10.13031/trans.59.10836

27. Swayne DE, Suarez DL, Sims LD (2020) Influenza. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 210–256

28. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 56:152–179. https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992

29. Deng G, Tan D, Shi J, Cui P, Jiang Y, Liu L, Tian G, Kawaoka Y, Li C, Chen H (2013) Complex Reassortment of Multiple Subtypes of Avian Influenza Viruses in Domestic Ducks at the Dongting Lake Region of China. Journal of Virology 87:9452–9462. https://doi.org/10.1128/jvi.00776-13

30. Parvin R, Schinkoethe J, Grund C, Ulrich R, Bönte F, Behr KP, Voss M, Samad MA, Hassan KE, Luttermann C, Beer M, Harder T (2020) Comparison of pathogenicity of subtype H9 avian influenza wild-type viruses from a wide geographic origin expressing mono-, di-, or tri-basic hemagglutinin cleavage sites. Veterinary Research 51:48. https://doi.org/10.1186/s13567-020-00771-3

31. Carnaccini S, Perez DR (2020) H9 Influenza Viruses: An Emerging Challenge. Cold Spring Harb Perspect Med 10:a038588. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038588

32. Alexander DJ (2000) A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol 74:3–13. https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00160-7

33. Bouvier NM, Palese P (2008) The biology of influenza viruses. Vaccine 26 Suppl 4:D49-53. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039

34. Liu S, Ji K, Chen J, Tai D, Jiang W, Hou G, Chen J, Li J, Huang B (2009) Panorama Phylogenetic Diversity and Distribution of Type A Influenza Virus. PLOS ONE 4:e5022. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005022

35. Xu C, Ye H, Qiu W, Lin H, Chen Y, Zhang H, Liao M (2018) Phylogenetic classification of hemagglutinin gene of H9N2 avian influenza viruses isolated in China during 2012–

2016 and evaluation of selected candidate vaccine strains. Poult Sci 97:3023–3030. https://doi.org/10.3382/ps/pey154

36. Chen J-M, Sun Y-X, Chen J-W, Liu S, Yu J-M, Shen C-J, Sun X-D, Peng D (2009) Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza viruses based on their six internal gene sequences. Virology Journal 6:137. https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-137

37. Peacock TP, James J, Sealy JE, Iqbal M (2019) A Global Perspective on H9N2 Avian Influenza Virus. Viruses 11:. https://doi.org/10.3390/v11070620

38. Iqbal M, Yaqub T, Mukhtar N, Shabbir MZ, McCauley JW (2013) Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds. Veterinary Research 44:100. https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-100

39. EL Houadfi M, Fellahi S, Nassik S, Guérin J-L, Ducatez MF (2016) First outbreaks and phylogenetic analyses of avian influenza H9N2 viruses isolated from poultry flocks in Morocco. Virol J 13:140. https://doi.org/10.1186/s12985-016-0596-1

40. Collett SR, Smith JA, Boulianne M, Owen RL, Gingerich E, Singer RS, Johnson TJ, Hofacre CL, Berghaus RD, Stewart-Brown B (2020) Principles of Disease Prevention, Diagnosis, and Control. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 1–78

41. Dong J, Zhou Y, Pu J, Liu L (2022) Status and Challenges for Vaccination against Avian H9N2 Influenza Virus in China. Life 12:1326. https://doi.org/10.3390/life12091326

42. Cavanagh D (2003) Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. Avian Pathol 32:567–582. https://doi.org/10.1080/0307945031000162119 8

43. JinLing S, ZuTao Z, ZiSheng G, QingRong X, YunCai X, ZiLi L, DeShi S, DingRen B (2012) Identification of five bronchitis virus (IBV) strains isolated in China and phylogenetic analysis of the S1 gene. African Journal of Microbiology Research 6:2194–2201

44. Casais R, Dove B, Cavanagh D, Britton P (2003) Recombinant Avian Infectious Bronchitis Virus Expressing a Heterologous Spike Gene Demonstrates that the Spike Protein Is a Determinant of Cell Tropism. Journal of Virology 77:9084. https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.9084-9089.2003

45. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I (2016) S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. Infection, Genetics and Evolution 39:349–364. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.015

46. Wickramasinghe INA, de Vries RP, Gröne A, de Haan C a. M, Verheije MH (2011) Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. J Virol 85:8903–8912. https://doi.org/10.1128/JVI.05112-11

47. Cavanagh D (2007) Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet Res 38:281–297. https://doi.org/10.1051/vetres:2006055

48. Najimudeen SM, Abd-Elsalam RM, Ranaweera HA, Isham IM, Hassan MSH, Farooq M, Abdul-Careem MF (2023) Replication of infectious bronchitis virus (IBV) Delmarva (DMV)/1639 variant in primary and secondary lymphoid organs leads to immunosuppression in chickens. Virology 587:109852. https://doi.org/10.1016/j.virol.2023.109852

49. Nili H, Asasi K (2002) Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathology 31:247–252. https://doi.org/10.1080/03079450220136567

50. Matthijs MGR, van Eck JHH, Landman WJM, Stegeman JA (2003) Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. Avian Pathol 32:473–481. https://doi.org/10.1080/0307945031000154062

51. Landman WJM, Feberwee A (2004) Aerosol-induced Mycoplasma synoviae arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. Avian Pathology 33:591–598. https://doi.org/10.1080/03079450400013170

52. Nakamura K, Narita M, Imai K, Matsumura T, Maeda M, Tanimura T (1992) The effect of mixed live vaccines of Newcastle disease and infectious bronchitis on the chicken respiratory tract. J Comp Pathol 106:341–350. https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90020-u

53. Jackwood MW, de Wit S (2020) Infectious Bronchitis. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 167–188

54. Cumming RB (1969) The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia. Aust Vet J 45:200–203. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1969.tb01930.x

55. Morley AJ, Thomson DK (1984) Swollen-Head Syndrome in Broiler Chickens. Avian Diseases 28:238–243. https://doi.org/10.2307/1590147

56. El Houadfi M, Jones RC (1985) Isolation of avian infectious bronchitis viruses in Morocco including an enterotropic variant. Veterinary Record 116:445–445. https://doi.org/10.1136/vr.116.16.445-a

57. Jones RC, Savage CE, Naylor CJ, Cook JKA, El-Houadfi M (2004) A possible North African progenitor of the major European infectious bronchitis virus variant (793B, 4/91,

CR88, etc.). In: IV. International symposium on avian corona-and pneumovirus infections, Rauischholzhausen, Germany, 20-23 June 2004. VVB Laufersweiler Verlag, pp 105–111

58. El Bouqdaoui M, Mhand RA, Bouayoune H, .Ennaji MM (2005) Genetic Grouping of Nephropathogenic Avian Infectious Bronchitis Virus Isolated in Morocco. International Journal of Poultry Science 4:721–727. https://doi.org/10.3923/ijps.2005.721.727

59. Fellahi S, EL Harrak M, Ducatez M, Loutfi C, Koraichi SIS, Kuhn JH, Khayi S, EL Houadfi M, Ennaji MM (2015) Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus S1 glycoprotein regions reveals emergence of a new genotype in Moroccan broiler chicken flocks. Virol J 12:116. https://doi.org/10.1186/s12985-015-0347-8

60. Lounas A, Oumouna-Benachour K, Medkour H, Oumouna M (2018) The first evidence of a new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and unvaccinated broiler flocks in Algeria. Vet World 1630–1636. https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1630-1636

61. Bourogâa H, Miled K, Gribâa L, Behi IE, Ghram A (2009) Characterization of New Variants of Avian Infectious Bronchitis Virus in Tunisia. Avian Diseases 53:426–433. https://doi.org/10.1637/8666-022609-Reg.1

62. Bourogâa H, Hellal I, Hassen J, Fathallah I, Ghram A (2012) S1 gene sequence analysis of new variant isolates of avian infectious bronchitis virus in Tunisia. Veterinary Medicine: Research and Reports 41. https://doi.org/10.2147/VMRR.S32498

63. Lachheb J, Turki A, Nsiri J, Fathallah I, El behi I, Larbi I, Ghram A (2019) Molecular characterization of a unique variant of avian infectious bronchitis virus in Tunisia. Poultry Science 98:4338–4345. https://doi.org/10.3382/ps/pez384

64. Dimitrov KM, Abolnik C, Afonso CL, Albina E, Bahl J, Berg M, Briand F-X, Brown IH, Choi K-S, Chvala I, Diel DG, Durr PA, Ferreira HL, Fusaro A, Gil P, Goujgoulova GV, Grund C, Hicks JT, Joannis TM, Torchetti MK, Kolosov S, Lambrecht B, Lewis NS, Liu H, Liu H, McCullough S, Miller PJ, Monne I, Muller CP, Munir M, Reischak D, Sabra M, Samal SK, Servan de Almeida R, Shittu I, Snoeck CJ, Suarez DL, Van Borm S, Wang Z, Wong FYK (2019) Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. Infection, Genetics and Evolution 74:103917. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103917

65. Lamb RA, Parks GD (2007) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DN, Howley PM (eds) Fields virology. Lippincott, Williams, and Wilkins, pp 1449–1496

66. Homma M, Ohuchi M (1973) Trypsin Action on the Growth of Sendai Virus in Tissue Culture Cells III. Structural Difference of Sendai Viruses Grown in Eggs and Tissue Culture Cells. J Virol 12:1457–1465

67. Suarez DL, Miller PJ, Koch G, Mundt E, Rautenschlein S (2020) Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 109–166

68. Czeglédi A, Ujvári D, Somogyi E, Wehmann E, Werner O, Lomniczi B (2006) Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. Virus Res 120:36–48. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.009

69. Diel DG, da Silva LHA, Liu H, Wang Z, Miller PJ, Afonso CL (2012) Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. Infection, Genetics and Evolution 12:1770–1779. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.012

70. Miller PJ, Haddas R, Simanov L, Lublin A, Rehmani SF, Wajid A, Bibi T, Khan TA, Yaqub T, Setiyaningsih S, Afonso CL (2015) Identification of new sub-genotypes of virulent Newcastle disease virus with potential panzootic features. Infect Genet Evol 29:216–229. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.032

71. van Eck JH, Goren E (1991) An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. Avian Pathol 20:497–507. https://doi.org/10.1080/03079459108418787

72. ICTV (2023) Genus: Metapneumovirus | ICTV. https://ictv.global/report/chapter/pneumoviridae/pneumoviridae/metapneumovirus. Accessed 11 Aug 2023

73. Van de Zande S, Nauwynck H, De Jonghe S, Pensaert M (1999) Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. Avian Pathol 28:239–244. https://doi.org/10.1080/03079459994722

74. Hutton S, Bettridge J, Christley R, Habte T, Ganapathy K (2017) Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in poultry in Ethiopia. Trop Anim Health Prod 49:317–322. https://doi.org/10.1007/s11250-016-1195-2

75. Zuo ZH, Zhang TY, Guo YX, Chu J, Qu GG, Miao LZ, Shen ZQ, He C (2018) Serosurvey of Avian metapneumovirus, Orithobacterium rhinotracheale, and Chlamydia psittaci and Their Potential Association with Avian Airsacculitis. Biomed Environ Sci 31:403–406. https://doi.org/10.3967/bes2018.053

76. Giovanardi D, Lupini C, Pesente P, Rossi G, Ortali G, Catelli E (2014) Longitudinal field studies of Avian Metapneumovirus and Turkey Hemorrhagic Enteritis Virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. Vet Res Commun 38:129–137. https://doi.org/10.1007/s11259-014-9596-z

77. Jirjis FF, Noll SL, Halvorson DA, Nagaraja KV, Martin F, Shaw DP (2004) Effects of Bacterial Coinfection on the Pathogenesis of Avian Pneumovirus Infection in Turkeys. Avian Dis 48:34–49. https://doi.org/10.1637/7017

78. Marien M, Decostere A, Martel A, Chiers K, Froyman R, Nauwynck H (2005) Synergy between avian pneumovirus and Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys. Avian Pathology 34:204–211. https://doi.org/10.1080/03079450500096414

79. Naylor CJ, Al-Ankari AR, Al-Afaleq AI, Bradbury JM, Jones RC (1992) Exacerbation of Mycoplasma gallisepticum infection in turkeys by rhinotracheitis virus. Avian Pathol 21:295–305. https://doi.org/10.1080/03079459208418844

80. Turpin EA, Perkins LEL, Swayne DE (2002) Experimental infection of turkeys with avian pneumovirus and either Newcastle disease virus or Escherichia coli. Avian Dis 46:412–422. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0412:EIOTWA]2.0.CO;2

81. Loock MV, Loots K, Zande SV de, Heerden MV, Nauwynck H, Goddeeris BM, Vanrompay D (2006) Pathogenic interactions between Chlamydophila psittaci and avian pneumovirus infections in turkeys. Veterinary Microbiology 112:53–63. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.013

82. Cook J (2000) Avian rhinotracheitis. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 19:. https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1233

83. Lu YS, Shien YS, Tsai HJ, Tseng CS, Lee SH, Lin DF (1994) Swollen head syndrome in Taiwan-isolation of an avian pneumovirus and serological survey. Avian Pathol 23:169–174. https://doi.org/10.1080/03079459408418985

84. Davison AJ, Eberle R, Ehlers B, Hayward GS, McGeoch DJ, Minson AC, Pellett PE, Roizman B, Studdert MJ, Thiry E (2009) The order Herpesvirales. Arch Virol 154:171–177. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4

85. McGeoch DJ, Dolan A, Ralph AC (2000) Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. J Virol 74:10401–10406. https://doi.org/10.1128/jvi.74.22.10401-10406.2000

86. Lee S-W, Markham PF, Markham JF, Petermann I, Noormohammadi AH, Browning GF, Ficorilli NP, Hartley CA, Devlin JM (2011) First complete genome sequence of infectious laryngotracheitis virus. BMC Genomics 12:197. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-197

87. Piccirillo A, Lavezzo E, Niero G, Moreno A, Massi P, Franchin E, Toppo S, Salata C, Palù G (2016) Full Genome Sequence-Based Comparative Study of Wild-Type and Vaccine Strains of Infectious Laryngotracheitis Virus from Italy. PLoS One 11:e0149529. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149529

88. Knipe DM, Howley PM (2007) Fields' Virology. Lippincott Williams & Wilkins

89. Bagust TJ, Jones RC, Guy JS (2000) Avian infectious laryngotracheitis. Rev Sci Tech 19:483–492. https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1229

90. Bagust TJ (1986) Laryngotracheitis (Gallid-1) herpesvirus infection in the chicken. 4. Latency establishment by wild and vaccine strains of ILT virus. Avian Pathol 15:581–595. https://doi.org/10.1080/03079458608436317

91. Crawshaw GJ, Boycott BR (1982) Infectious laryngotracheitis in peafowl and pheasants. Avian Dis 26:397–401

92. García M, Spatz S (2020) Infectious Laryngotracheitis. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 189–209

93. Jones RC (2010) Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? Br Poult Sci 51:1–11. https://doi.org/10.1080/00071660903541378

94. Ou S-C, Giambrone JJ (2012) Infectious laryngotracheitis virus in chickens. World J Virol 1:142–149. https://doi.org/10.5501/wjv.v1.i5.142

95. Hughes CS, Williams RA, Gaskell RM, Jordan FT, Bradbury JM, Bennett M, Jones RC (1991) Latency and reactivation of infectious laryngotracheitis vaccine virus. Arch Virol 121:213–218. https://doi.org/10.1007/BF01316755

96. Hughes CS, Gaskell RM, Jones RC, Bradbury JM, Jordan FT (1989) Effects of certain stress factors on the re-excretion of infectious laryngotracheitis virus from latently infected carrier birds. Res Vet Sci 46:274–276. https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31158-5

97. Bagust TJ, Johnson MA (1995) Avian infectious laryngotracheitis: virus-host interactions in relation to prospects for eradication. Avian Pathol 24:373–391. https://doi.org/10.1080/03079459508419079

98. Blacker HP, Kirkpatrick NC, Rubite A, O'Rourke D, Noormohammadi AH (2011) Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. Aust Vet J 89:89–94. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2010.00665.x

99. Gowthaman V, Kumar S, Koul M, Dave U, Murthy TRGK, Munuswamy P, Tiwari R, Karthik K, Dhama K, Michalak I, Joshi SK (2020) Infectious laryngotracheitis: Etiology, epidemiology, pathobiology, and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. Vet Q 40:140–161. https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1759845

100. Razin S, Yogev D, Naot Y (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 62:1094–1156. https://doi.org/10.1128/MMBR.62.4.1094-1156.1998

101. Stipkovits L, Kempf I (1996) Mycoplasmoses in poultry. 15:1495. https://doi.org/10.20506/rst.15.4.986

102. Nascimento ER, Pereira VLA, Nascimento MGF, Barreto ML (2005) Avian mycoplasmosis update. Braz J Poult Sci 7:1–9. https://doi.org/10.1590/S1516-635X2005000100001

103. Ferguson-Noel N, Armour NK, Noormohammadi AH, El-Gazzar M, Bradbury JM (2020) Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 907–965

104. Bradbury JM (1984) Avian mycoplasma infections: Prototype of mixed infections with mycoplasmas, bacteria and viruses. Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie 135:83–89. https://doi.org/10.1016/S0769-2609(84)80062-9

105. Gaunson JE, Philip CJ, Whithear KG, Browning GF (2006) Age related differences in the immune response to vaccination and infection with Mycoplasma gallisepticum. Vaccine 24:1687–1692. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.045

106. Rodriguez R, Kleven SH (1980) Pathogenicity of two strains of Mycoplasma gallisepticum in broilers. Avian Dis 24:800–807

107. Gross WB (1990) Factors Affecting the Development of Respiratory Disease Complex in Chickens. Avian Diseases 34:607–610. https://doi.org/10.2307/1591252

108. Stipkovits L, Egyed L, Palfi V, Beres A, Pitlik E, Somogyi M, Szathmary S, Denes B (2012) Effect of low-pathogenicity influenza virus H3N8 infection on Mycoplasma gallisepticum infection of chickens. Avian Pathology 41:51–57. https://doi.org/10.1080/03079457.2011.635635

109. Edward DG, Kanarek AD (1960) Organisms of the pleuropneumonia group of avian origin: their classification into species. Ann N Y Acad Sci 79:696–702. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb42744.x

110. Cummings TS, Kleven SH (1986) Evaluation of protection against Mycoplasma gallisepticum infection in chickens vaccinated with the F strain of M. gallisepticum. Avian Dis 30:169–171

111. Jordan FT, Horrocks BK (1996) The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae and a comparison of their efficacy in the control of Mycoplasma gallisepticum infection in broiler chicks. Avian Dis 40:326–334

112. Boulianne M, Blackall PJ, Hofacre CL, Ruiz JA, Sandhu TS, Hafez HM, Chin RP, Register KB, Jackwood MW (2020) Pasteurellosis and Other Respiratory Bacterial Infections. In: Diseases of Poultry. John Wiley & Sons, Ltd, pp 831–889

113. Van Empel PCM (1997) Ornithobacterium rhinotracheale: an up date. Proc 52th Meet Fachgruppe'Geflugelkrank' DeutVet-med Gesellschaft, Hannover, 1997 20–25

114. Back A, Rajashekara G, Jeremiah RB, Halvorson DA, Nagaraja KV (1998) Tissue distribution of Ornithobacterium rhinotracheale in experimentally infected turkeys. Vet Rec 143:52–53. https://doi.org/10.1136/vr.143.2.52

115. Travers AF (1996) Concomitant Ornithobacterium rhinotracheale and Newcastle Disease Infection in Broilers in South Africa. Avian Diseases 40:488–490. https://doi.org/10.2307/1592252

116. Canal CW, Leão JA, Rocha SLS, Macagnan M, Lima-Rosa C a. V, Oliveira SD, Back A (2005) Isolation and characterization of Ornithobacterium rhinotracheale from chickens in Brazil. Res Vet Sci 78:225–230. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.10.003

117. Sakai E, Tokuyama Y, Nonaka F, Ohishi S, Ishikawa Y, Tanaka M, Taneno A (2000) Ornithobacterium rhinotracheale infection in Japan: preliminary investigations. Vet Rec 146:502–503. https://doi.org/10.1136/vr.146.17.502

118. El-Sukhon SN, Musa A, Al-Attar M (2002) Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in northern and middle Jordan with special reference to Escherichia coli, Ornithobacterium rhinotracheale, and Bordetella avium. Avian Dis 46:605–612. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0605:SOTBEO]2.0.CO;2

119. Erbeck DH, McMurray BL (1998) Isolation of Georgia variant (Georgia isolate 1992) infectious bronchitis virus but not Ornithobacterium rhinotracheale from a Kentucky broiler complex. Avian Dis 42:613–617

120. Bano S, Naeem K, Malik SA (2003) Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. Avian Dis 47:817–822. https://doi.org/10.1637/0005-2086-47.s3.817

121. Pan Q, Liu A, Zhang F, Ling Y, Ou C, Hou N, He C (2012) Co-infection of broilers with Ornithobacterium rhinotracheale and H9N2 avian influenza virus. BMC Vet Res 8:104. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-104

122. Morales-Erasto V, Falconi-Agapito F, Luna-Galaz GA, Saravia LE, Montalvan-Avalos A, Soriano-Vargas E E, Fernández-Díaz M (2016) Coinfection of Avibacterium paragallinarum and Ornithobacterium rhinotracheale in Chickens from Peru. Avian Dis 60:75–78. https://doi.org/10.1637/11265-082015-ResNote.1

123. Zorman-Rojs O, Zdovc I, Bencina D, Mrzel I (2000) Infection of turkeys with Ornithobacterium rhinotracheale and Mycoplasma synoviae. Avian Dis 44:1017–1022

124. Van Loock M, Geens T, De Smit L, Nauwynck H, Van Empel P, Naylor C, Hafez HM, Goddeeris BM, Vanrompay D (2005) Key role of Chlamydophila psittaci on Belgian

turkey farms in association with other respiratory pathogens. Vet Microbiol 107:91–101. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.01.009

125. De Boeck C, Kalmar I, Dumont A, Vanrompay D (2015) Longitudinal monitoring for respiratory pathogens in broiler chickens reveals co-infection of Chlamydia psittaci and Ornithobacterium rhinotracheale. Journal of Medical Microbiology 64:565–574. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000047

126. Edwards PR, Ewing WH (1986) Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. Elsevier, New York

127. Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G (2006) The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. FEMS Microbiol Rev 30:382–403. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x

128. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol 2:123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818

129. Droual R, Woolcock PR (1994) Swollen head syndrome associated with E. coli and infectious bronchitis virus in the Central Valley of California. Avian Pathol 23:733–742. https://doi.org/10.1080/03079459408419042

130. Gross WB (1961) The development of" air sac disease". Avian Diseases 5:431–439

131. Al-Ankari AR, Bradbury JM, Naylor CJ, Worthington KJ, Payne-Johnson C, Jones RC (2001) Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with Escherichia coli at different time intervals. Avian Pathol 30:257–267. https://doi.org/10.1080/03079450120054686

132. Bakaletz LO (1995) Viral potentiation of bacterial superinfection of the respiratory tract. Trends in Microbiology 3:110–114. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88892-7

133. Wilson R, Dowling RB, Jackson AD (1996) The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa. Eur Respir J 9:1523–1530

134. Engelich G, White M, Hartshorn KL (2002) Role of the respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza A virus and Escherichia coli. J Med Microbiol 51:484–490. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-6-484

135. Navarini AA, Recher M, Lang KS, Georgiev P, Meury S, Bergthaler A, Flatz L, Bille J, Landmann R, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM (2006) Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses. Proc Natl Acad Sci U S A 103:15535–15539. https://doi.org/10.1073/pnas.0607325103

136. Chu J, Guo Y, Xu G, Zhang Q, Zuo Z, Li Q, Wang Y, He C (2020) Chlamydia psittaci Triggers the Invasion of H9N2 Avian Influenza Virus by Impairing the Functions of Chicken Macrophages. Animals (Basel) 10:. https://doi.org/10.3390/ani10040722

137. Tashiro M, Ciborowski P, Reinacher M, Pulverer G, Klenk H-D, Rott R (1987) Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. Virology 157:421–430. https://doi.org/10.1016/0042-6822(87)90284-4

138. Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H (2004) Co-infection of Staphylococcus aureus or Haemophilus paragallinarum exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. Arch Virol 149:2095–2104. https://doi.org/10.1007/s00705-004-0372-1

139. Shun K, Ying-Li S, Zhi-Juan L, Jian-Liang L, Feng X, Lu-Jiao D, Peng Y, Jiang S, Zhi-Jing X (2023) Stimulation of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa following H9N2 IAV infection exacerbates inflammatory responses of alveolar macrophages and decreases virus replication. Microb Pathog 106254. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106254

140. Akaike T, Molla A, Ando M, Araki S, Maeda H (1989) Molecular mechanism of complex infection by bacteria and virus analyzed by a model using serratial protease and influenza virus in mice. J Virol 63:2252–2259. https://doi.org/10.1128/JVI.63.5.2252-2259.1989

141. Scheiblauer H, Reinacher M, Tashiro M, Rott R (1992) Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. J Infect Dis 166:783–791. https://doi.org/10.1093/infdis/166.4.783

142. Callan RJ, Hartmann FA, West SE, Hinshaw VS (1997) Cleavage of influenza A virus H1 hemagglutinin by swine respiratory bacterial proteases. J Virol 71:7579–7585. https://doi.org/10.1128/JVI.71.10.7579-7585.1997

143. Chu J, Zhang Q, Zhang T, Han E, Zhao P, Khan A, He C, Wu Y (2016) Chlamydia psittaci infection increases mortality of avian influenza virus H9N2 by suppressing host immune response. Sci Rep 6:29421. https://doi.org/10.1038/srep29421

144. Sid H, Hartmann S, Petersen H, Ryll M, Rautenschlein S (2016) Mycoplasma gallisepticum modifies the pathogenesis of influenza A virus in the avian tracheal epithelium. Int J Med Microbiol 306:174–186. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.04.001

145. Chu C-J, Lee S-D (2008) Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection: epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment. J Gastroenterol Hepatol 23:512–520. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05384.x

146. Du Y, Wang C, Zhang Y (2022) Viral Coinfections. Viruses 14:2645. https://doi.org/10.3390/v14122645

147. Dianzani F (1975) Viral interference and interferon. Ric Clin Lab 5:196–213. https://doi.org/10.1007/BF02908284

148. Haller O (2015) Jean Lindenmann: from viral interference to interferon and beyond (1924-2015). J Interferon Cytokine Res 35:239–241. https://doi.org/10.1089/jir.2015.1500

149. Polacino P, Kaplan G, Palma EL (1985) Homologous interference by a foot-and-mouth disease virus strain attenuated for cattle. Arch Virol 86:291–301. https://doi.org/10.1007/BF01309833

150. Adams RH, Brown DT (1985) BHK cells expressing Sindbis virus-induced homologous interference allow the translation of nonstructural genes of superinfecting virus. J Virol 54:351–357. https://doi.org/10.1128/JVI.54.2.351-357.1985

151. Zebovitz E, Brown A (1968) Interference Among Group A Arboviruses. Journal of Virology 2:1283–1289. https://doi.org/10.1128/jvi.2.11.1283-1289.1968

152. Xing Z, Cardona CJ, Adams S, Yang Z, Li J, Perez D, Woolcock PR (2009) Differential regulation of antiviral and proinflammatory cytokines and suppression of Fas-mediated apoptosis by NS1 of H9N2 avian influenza virus in chicken macrophages. Journal of General Virology 90:1109–1118. https://doi.org/10.1099/vir.0.007518-0

153. Hao X, Li Y, Chen H, Chen B, Liu R, Wu Y, Xiao X, Zhou P, Li S (2022) Canine Circovirus Suppresses the Type I Interferon Response and Protein Expression but Promotes CPV-2 Replication. International Journal of Molecular Sciences 23:6382. https://doi.org/10.3390/ijms23126382

154. Qin T, Chen Y, Huangfu D, Miao X, Yin Y, Yin Y, Chen S, Peng D, Liu X (2023) PA-X protein of H9N2 subtype avian influenza virus suppresses the innate immunity of chicken bone marrow-derived dendritic cells. Poultry Science 102:102304. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102304

155. Li L, Zhuang P, Cheng Z, Yang J, Bi J, Wang G (2020) Avian leukosis virus subgroup J and reticuloendotheliosis virus coinfection induced TRIM62 regulation of the actin cytoskeleton. J Vet Sci 21:e49. https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e49

156. Liu DX, Brierley I, Brown TDK (1995) Identification of a Trypsin-Like Serine Proteinase Domain Encoded by ORF la of the Coronavirus IBV. In: Talbot PJ, Levy GA (eds) Corona- and Related Viruses: Current Concepts in Molecular Biology and Pathogenesis. Springer US, Boston, MA, pp 405–411

157. DaPalma T, Doonan BP, Trager NM, Kasman LM (2010) A systematic approach to virus-virus interactions. Virus Res 149:1–9. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.002

158. Eladl AH, Alzayat AA, Ali HS, Fahmy HA, Ellakany HF (2019) Comparative molecular characterization, pathogenicity and seroprevalence of avian influenza virus H9N2 in commercial and backyard poultry flocks. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 64:81–89. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.011

159. Awuni JA, Bianco A, Dogbey OJ, Fusaro A, Yingar DT, Salviato A, Ababio PT, Milani A, Bonfante F, Monne I (2019) Avian influenza H9N2 subtype in Ghana: virus characterization and evidence of co-infection. Avian Pathology 0:1–65. https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1624687

160. Banet-Noach C, Perk S, Simanov L, Grebenyuk N, Rozenblut E, Pokamunski S, Pirak M, Tendler Y, Panshin A (2007) H9N2 Influenza Viruses from Israeli Poultry: A Five-Year Outbreak. Avian Diseases 51:290–296. https://doi.org/10.1637/7590-040206R1.1

161. Bonfante F, Cattoli G, Leardini S, Salomoni A, Mazzetto E, Davidson I, Haddas R, Terregino C (2017) Synergy or interference of a H9N2 avian influenza virus with a velogenic Newcastle disease virus in chickens is dose dependent. Avian Pathology 46:488–496. https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1319904

162. Haghighat-Jahromi M, Asasi K, Nili H, Dadras H, Shooshtari AH (2008) Coinfection of avian influenza virus (H9N2 subtype) with infectious bronchitis live vaccine. Arch Virol 153:651–655. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0033-x

163. El Zowalaty ME, Chander Y, Redig PT, Abd El Latif HK, El Sayed MA, Goyal SM (2011) Selective isolation of Avian influenza virus (AIV) from cloacal samples containing AIV and Newcastle disease virus. J Vet Diagn Invest 23:330–332. https://doi.org/10.1177/104063871102300222

164. Hassan KE, Shany SAS, Ali A, Dahshan A-HM, El-Sawah AA, El-Kady MF (2016) Prevalence of avian respiratory viruses in broiler flocks in Egypt. Poultry Science 95:1271–1280. https://doi.org/10.3382/ps/pew068

165. Hassan KE, El-Kady MF, EL-Sawah AAA, Luttermann C, Parvin R, Shany S, Beer M, Harder T (2021) Respiratory disease due to mixed viral infections in poultry flocks in Egypt between 2017 and 2018: Upsurge of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 since 2018. Transboundary and Emerging Diseases 68:21–36. https://doi.org/10.1111/tbed.13281

166. Amin F, Mukhtar N, Aslam A, Sheikh AA, Sultan B, Hussain M, Shehzad R, Ali M, Shahid MF, Aziz MW, Azeem S, Aslam HB, Yaqub T (2022) Rate of Multiple Viral and Bacterial CoInfection(s) in Influenza A/H9N2–Infected Broiler Flocks. Avian Diseases 66:. https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-21-00114

167. Xing Z, Cardona CJ, Li J, Dao N, Tran T, Andrada J (2008) Modulation of the immune responses in chickens by low-pathogenicity avian influenza virus H9N2. J Gen Virol 89:1288–1299. https://doi.org/10.1099/vir.0.83362-0

168. Zhang Q, Mu X, Dong H, Hu G, Zhang T, He C, Siddique N (2020) Pulmonary endothelium-derived PD-L1 induced by the H9N2 avian influenza virus inhibits the immune response of T cells. Virol J 17:. https://doi.org/10.1186/s12985-020-01341-x

169. Ismail ZM, EL-Deeb AH, EL-Safty MM, Hussein HA (2018) Enhanced pathogenicity of low-pathogenic H9N2 avian influenza virus after vaccination with infectious bronchitis live attenuated vaccine. Vet World 11:977–985. https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.977-985

170. Aouini R, Laamiri N, Ghram A (2018) Viral interference between low pathogenic avian influenza H9N2 and avian infectious bronchitis viruses in vitro and in ovo. J Virol Methods 259:92–99. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.011

171. Aouini R, Nacira L, Jihene N, Said S, Khaled M, Ahmed R, Abdeljelil G (2019) Viral interference between H9N2-low pathogenic avian influenza virus and avian infectious bronchitis virus vaccine strain H120 in vivo. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 65:219–225. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.06.004

172. Suzuki Y (2001) [Receptor and molecular mechanism of the host range variation of influenza viruses]. Uirusu 51:193–200

173. Sánchez-Felipe L, Villar E, Muñoz-Barroso I (2012) α2-3- and α2-6- N-linked sialic acids allow efficient interaction of Newcastle Disease Virus with target cells. Glycoconj J 29:539–549. https://doi.org/10.1007/s10719-012-9431-0

174. Dortmans JCFM, Koch G, Rottier PJM, Peeters BPH (2011) Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? Vet Res 42:122. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-122

175. Fazel P, Mehrabanpour MJ (2018) Evaluation of the Viral Interference between Lentogenic Newcastle Disease Virus (Lasota) and Avian Influenza Virus (H9N2) using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in SPF Chicken. Braz J Poult Sci 20:537–546. https://doi.org/10.1590/1806-9061-2017-0717

176. Ge S, Zheng D, Zhao Y, Liu H, Liu W, Sun Q, Li J, Yu S, Zuo Y, Han X, Li L, Lv Y, Wang Y, Liu X, Wang Z (2012) Evaluating viral interference between Influenza virus and Newcastle disease virus using real-time reverse transcription–polymerase chain reaction in chicken eggs. Virology Journal 9:128. https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-128

177. Ellakany HF, Gado AR, Elbestawy AR, Abd El-Hamid HS, Hafez HM, Abd El-Hack ME, Swelum AA, Al-Owaimer A, Saadeldin IM (2018) Interaction between avian influenza subtype H9N2 and Newcastle disease virus vaccine strain (LaSota) in chickens. BMC Vet Res 14:358. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1689-4

178. Roussan DA, Khawaldeh G, Shaheen IA (2015) A survey of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synovaie with avian influenza H9 subtype in meat-type chicken in Jordan between 2011-2015. Poult Sci 94:1499–1503. https://doi.org/10.3382/ps/pev119

179. Azizpour A, Goudarzi H, Charkhkar S, Momayez R, Hablolvarid MH EXPERIMENTAL STUDY ON TISSUE TROPISM AND DISSEMINATION OF H9N2 AVIAN INFLUENZA VIRUS AND ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE CO- INFECTION IN SPF CHICKENS. J Anim Plant Sci

180. van Empel PC, Hafez HM (1999) Ornithobacterium rhinotracheale: A review. Avian Pathol 28:217–227. https://doi.org/10.1080/03079459994704

181. Tombari W, Nsiri J, Larbi I, Guerin JL, Ghram A (2011) Genetic evolution of low pathogenecity H9N2 Avian influenza viruses in Tunisia: acquisition of new mutations. Virol J 8:467. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-467

182. Zecchin B, Minoungou G, Fusaro A, Moctar S, Ouedraogo-Kaboré A, Schivo A, Salviato A, Marciano S, Monne I (2017) Influenza A(H9N2) Virus, Burkina Faso. Emerg Infect Dis 23:2118–2119. https://doi.org/10.3201/eid2312.171294

183. Arbi M, Souiai O, Rego N, Larbi I, Naya H, Ghram A, Houimel M (2020) Historical origins and zoonotic potential of avian influenza virus H9N2 in Tunisia revealed by Bayesian analysis and molecular characterization. Arch Virol. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04624-4

184. Kaboudi K, Nciri J, Amara A, Laarbi I, Moalla N, Bouzouaia M, Ghram A (2016) Histopathological and molecular diagnosis of infectious laryngotracheitis in Tunisia: First report. International Journal of Livestock Research 1. https://doi.org/10.5455/ijlr.20160818084248

185. Sikht F-Z, Ducatez M, Touzani CD, Rubrum A, Webby R, El Houadfi M, Tligui N-S, Camus C, Fellahi S (2022) Avian Influenza a H9N2 Viruses in Morocco, 2018–2019. Viruses 14:529. https://doi.org/10.3390/v14030529

186. Jeevan T, Darnell D, Gradi EA, Benali Y, Kara R, Guetarni D, Rubrum A, Seiler PJ, Crumpton JC, Webby RJ, Derrar F (2019) A(H9N2) influenza viruses associated with chicken mortality in outbreaks in Algeria 2017. Influenza Other Respir Viruses 13:622–626. https://doi.org/10.1111/irv.12675

187. Fusade-Boyer M, Djegui F, Batawui K, Byuragaba DK, Jones JC, Wabwire-Mangeni F, Erima B, Atim G, Ukuli QA, Tugume T, Dogno K, Adjabli K, Nzuzi M, Adjin R, Jeevan T, Rubrum A, Go-Maro W, Kayali G, McKenzie P, Webby RJ, Ducatez MF (2021) Antigenic and Molecular Characterization of Low Pathogenic Avian Influenza A(H9N2) Viruses in Sub-Saharan Africa from 2017 through 2019. Emerging Microbes & Infections 0:1–32. https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1908097

188. Barberis A, Boudaoud A, Gorrill A, Loupias J, Ghram A, Lachheb J, Alloui N, Ducatez MF (2020) Full-length genome sequences of the first H9N2 avian influenza viruses isolated in the Northeast of Algeria. Virology Journal 17:108. https://doi.org/10.1186/s12985-020-01377-z

189. WAHIS (2022) WAHIS, H5N1 Algeria. https://wahis.woah.org/#/in-review/4641?fromPage=event-dashboard-url. Accessed 2 Aug 2023

190. Croville G, Foret C, Heuillard P, Senet A, Delpont M, Mouahid M, Ducatez MF, Kichou F, Guerin J-L (2018) Disclosing respiratory co-infections: a broad-range panel assay for avian respiratory pathogens on a nanofluidic PCR platform. Avian Pathology 47:253–260. https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1430891

191. Iqbal M, Yaqub T, Reddy K, McCauley JW (2009) Novel Genotypes of H9N2 Influenza A Viruses Isolated from Poultry in Pakistan Containing NS Genes Similar to Highly Pathogenic H7N3 and H5N1 Viruses. PLoS One 4:. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005788

192. Pusch E, Suarez D (2018) The Multifaceted Zoonotic Risk of H9N2 Avian Influenza. Veterinary Sciences 5:82. https://doi.org/10.3390/vetsci5040082

193. Larbi I, Ghedira K, Arbi M, Butcher GD, Rego N, Naya H, Tougorti H, Lachhab J, Behi IE, Nsiri J, Ghram A (2022) Phylogenetic analysis and assessment of the pathogenic potential of the first H9N2 avian influenza viruses isolated from wild birds and Lagoon water in Tunisia. Virus Research 322:198929. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198929

194. Jallow MM, Fall A, Barry MA, Diop B, Sy S, Goudiaby D, Fall M, Enouf V, Niang MN, Dia N (2020) Genetic characterization of the first detected human case of low pathogenic avian influenza A/H9N2 in sub-Saharan Africa, Senegal. Emerging Microbes & Infections 9:1092–1095. https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1763858

195. Gowthaman V, Singh SD, Dhama K, Srinivasan P, Saravanan S, Murthy TRGK, Ramakrishnan MA (2017) Molecular Survey of Respiratory and Immunosuppressive Pathogens Associated with Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Subtype and Virulent Newcastle Disease Viruses in Commercial Chicken Flocks. The Journal of Poultry Science 54:179–184. https://doi.org/10.2141/jpsa.0160032

196. Hassan KE, El-Kady MF, EL-Sawah AAA, Luttermann C, Parvin R, Shany S, Beer M, Harder T (2019) Respiratory disease due to mixed viral infections in poultry flocks in Egypt between 2017 and 2018: Upsurge of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 since 2018. Transboundary and Emerging Diseases 0: https://doi.org/10.1111/tbed.13281

197. Barbour EK, Mastori FA, Nour AMA, Shaib HA, Jaber LS, Yaghi RH, Sabra A, Sleiman FT, Sawaya RK, Niedzwieck A, Tayeb IT, Kassaify ZG, Rath M, Harakeh S, Barbour

KE (2009) Standardisation of a new model of H9N2/ Escherichia coli challenge in broilers in the Lebanon. Vet Ital 45:6

198. Sakai T, Ishii A, Segawa T, Takagi Y, Kobayashi Y, Itou T (2015) Establishing conditions for the storage and elution of rabies virus RNA using FTA® cards. The Journal of Veterinary Medical Science 77:461–465. https://doi.org/10.1292/jvms.14-0227

199. Shabat M, Meir R, Haddas R, Lapin E, Shkoda I, Raibstein I, Perk S, Davidson I (2010) Development of a real-time TaqMan RT-PCR assay for the detection of H9N2 avian influenza viruses. Journal of virological methods 168:72–7. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.04.019

200. Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. Archives of Virology 146:2275–2289. https://doi.org/10.1007/s007050170002

201. Esmaelizad M, Mayahi V, Pashaei M, Goudarzi H (2017) Identification of novel Newcastle disease virus sub-genotype VII-(j) based on the fusion protein. Arch Virol 162:971–978. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3189-9

202. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M, Naylor CJ (2010) Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. Veterinary Microbiology 146:24–34. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.04.014

203. Worthington KJ, Currie RJW, Jones RC (2008) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. Avian Pathol 37:247–257. https://doi.org/10.1080/03079450801986529

204. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

205. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Brief Bioinform 20:1160–1166. https://doi.org/10.1093/bib/bbx108

206. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I (2016) S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. Infection, Genetics and Evolution 39:349–364. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.015

207. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ (2003) A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathology 32:239–257. https://doi.org/10.1080/030794503100009783

208. Jackwood MW, Lee D-H (2017) Different evolutionary trajectories of vaccine-controlled and non-controlled avian infectious bronchitis viruses in commercial poultry. PLOS ONE 12:e0176709. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176709

209. Cook JK, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB (1999) Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathol 28:477–485. https://doi.org/10.1080/03079459994506

210. de Wit JJ, Boelm GJ, van Gerwe TJWM, Swart W a. JM (2013) The required sample size in vaccination-challenge experiments with infectious bronchitis virus, a meta-analysis. null 42:9–16. https://doi.org/10.1080/03079457.2012.751485

211. Lachheb J, Bouslama Z, Nsiri J, Badr C, al Gallas N, Souissi N, Khazri I, Larbi I, Kaboudi K, Ghram A (2022) Phylogenetic and phylodynamic analyses of subtype-B metapneumovirus from chickens in Tunisia. Poultry Science 102253. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102253

212. Tycowski KT, Guo YE, Lee N, Moss WN, Vallery TK, Xie M, Steitz JA (2015) Viral noncoding RNAs: more surprises. Genes Dev 29:567–584. https://doi.org/10.1101/gad.259077.115

213. Kammon A, Heidari A, Dayhum A, Eldaghayes I, Sharif M, Monne I, Cattoli G, Asheg A, Farhat M, Kraim E (2015) Characterization of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses from Poultry in Libya. Avian Diseases 59:422–430. https://doi.org/10.1637/11068-032215-ResNote.1

214. Chaidez-Ibarra MA, Velazquez DZ, Enriquez-Verdugo I, Castro del Campo N, Rodriguez-Gaxiola MA, Montero-Pardo A, Diaz D, Gaxiola SM (2022) Pooled molecular occurrence of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in poultry: A systematic review and meta-analysis. Transboundary and Emerging Diseases 69:2499–2511. https://doi.org/10.1111/tbed.14302

215. Al-Hasan BA, Alhatami AO, Abdulwahab HM, Bustani GS, Alkuwaity EAW (2021) The first isolation and detection of Ornithobacterium rhinotracheale from swollen head syndrome-infected broiler flocks in Iraq. Veterinary World 14:2346. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2346-2355

216. Bhuiyan ZA, Ali MZ, Moula MM, Bary MA, Arefin N, Giasuddin M, Khan ZUM (2019) Seroprevalence of major avian respiratory diseases in broiler and sonali chicken in selected areas of Bangladesh. J Adv Vet Anim Res 6:561–566. https://doi.org/10.5455/javar.2019.f383

217. Chansiripornchai N, Wanasawaeng W, Sasipreeyajan J (2007) Seroprevalence and identification of Ornithobacterium rhinotracheale from broiler and broiler breeder flocks

in Thailand. Avian Dis 51:777–780. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)51[777:SAIOOR]2.0.CO;2

218. Ng LFP, Liu DX (2000) Further Characterization of the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus 3C-like Proteinase and Determination of a New Cleavage Site. Virology 272:27–39. https://doi.org/10.1006/viro.2000.0330

219. Hosseini H, Ziafati Kafi Z, Malekan M, Ghafouri SA, Fallah Mehrabadi MH, Sadri N, Hojabr Rajeoni A, Ghalyanchilangeroudi A (2021) Molecular characterization of circulating avian metapneumovirus, subgroup B, in broiler chickens, Iran, 2016-2018. Iran J Vet Res 22:217–221. https://doi.org/10.22099/ijvr.2021.38859.5660

220. Slomka MJ, Hanna A, Mahmood S, Govil J, Krill D, Manvell RJ, Shell W, Arnold ME, Banks J, Brown IH (2013) Phylogenetic and molecular characteristics of Eurasian H9 avian influenza viruses and their detection by two different H9-specific RealTime reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. Veterinary Microbiology 162:530–542. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.013

221. Wang K, Shen D, Dai P, Li C (2023) Particulate matter in poultry house on poultry respiratory disease: a systematic review. Poult Sci 102:102556. https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102556

222. Bo-Shun Z, Li L-J, Qian Z, Zhen W, Peng Y, Guo-Dong Z, Wen-Jian S, Xue-Fei C, Jiang S, Zhi-Jing X (2020) Co-infection of H9N2 influenza virus and Pseudomonas aeruginosa contributes to the development of hemorrhagic pneumonia in mink. Vet Microbiol 240:108542. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108542

223. Hassan KE, Ali A, Shany SAS, El-Kady MF (2017) Experimental co-infection of infectious bronchitis and low pathogenic avian influenza H9N2 viruses in commercial broiler chickens. Research in Veterinary Science 115:356–362. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.024

224. AboElkhair MA, Hasan ME, Mousa A, Moharam I, Sultan H, Malik Y, Sakr MA (2021) In-silico evidence for enhancement of avian influenza virus H9N2 virulence by modulation of its hemagglutinin (HA) antigen function and stability during co-infection with infectious bronchitis virus in chickens. VirusDis 32:548–558. https://doi.org/10.1007/s13337-021-00688-1

225. Fellahi S, Ducatez M, Harrak ME, Guérin J-L, Touil N, Sebbar G, Bouaiti EA, khataby K, Ennaji MM, El-Houadfi M (2015) Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in Africa. Avian Pathology 44:287–295. https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1044422

226. Setia MS (2016) Methodology Series Module 3: Cross-sectional Studies. Indian Journal of Dermatology 61:261. https://doi.org/10.4103/0019-5154.182410

227. Khalil NW, Elshorbagy MA, Elboraay EM, Helal AM (2023) Live IBD vaccine exacerbates disease and pathological effects of Asian lineage H9N2 LPAIV in chickens. Avian Pathology 0:1–11. https://doi.org/10.1080/03079457.2023.2236994

228. Wang C, Bing A, Liu H, Wang X, Zhao J, Lin H, Jiao H (2022) High ambient humidity aggravates ammonia-induced respiratory mucosal inflammation by eliciting Th1/Th2 imbalance and NF-κB pathway activation in laying hens. Poult Sci 101:102028. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102028

229. Shrestha A, Sadeyen J-R, Lukosaityte D, Chang P, Smith A, Van Hulten M, Iqbal M (2021) Selectively targeting haemagglutinin antigen to chicken CD83 receptor induces faster and stronger immunity against avian influenza. NPJ Vaccines 6:90. https://doi.org/10.1038/s41541-021-00350-3

230. Mahmoud SIA, Zyan KA, Hamoud MM, Khalifa E, Dardir S, Khalifa R, Kilany WH, Elfeil WK (2022) Effect of Co-infection of Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Virus and Avian Pathogenic E. coli on H9N2-Vaccinated Commercial Broiler Chickens. Frontiers in Veterinary Science 9:

231. Van Limbergen T, Sarrazin S, Chantziaras I, Dewulf J, Ducatelle R, Kyriazakis I, McMullin P, Méndez J, Niemi JK, Papasolomontos S, Szeleszczuk P, Van Erum J, Maes D, on behalf of the PROHEALTH consortium (2020) Risk factors for poor health and performance in European broiler production systems. BMC Veterinary Research 16:287. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02484-3

232. Malila Y, Sanpinit P, Thongda W, Jandamook A, Srimarut Y, Phasuk Y, Kunhareang S (2022) Influences of Thermal Stress During Three Weeks Before Market Age on Histology and Expression of Genes Associated With Adipose Infiltration and Inflammation in Commercial Broilers, Native Chickens, and Crossbreeds. Frontiers in Physiology 13:

233. Hassan KE, El-Kady MF, EL-Sawah AAA, Luttermann C, Parvin R, Shany S, Beer M, Harder T (2019) Respiratory disease due to mixed viral infections in poultry flocks in Egypt between 2017 and 2018: Upsurge of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 since 2018. Transboundary and Emerging Diseases 0: https://doi.org/10.1111/tbed.13281

234. Bóna M, Kiss I, Dénes L, Szilasi A, Mándoki M (2023) Tissue Tropism of H9N2 Low-Pathogenic Avian Influenza Virus in Broiler Chickens by Immunohistochemistry. Animals 13:1052. https://doi.org/10.3390/ani13061052

235. Belkasmi SFZ, Fellahi S, Touzani CD, Faraji FZ, Maaroufi I, Delverdier M, Guérin J-L, Fihri OF, Houadfi ME, Ducatez MF (2019) Co-infections of chickens with avian influenza virus H9N2 and Moroccan Italy 02 infectious bronchitis virus: effect on pathogenesis and protection conferred by different vaccination programmes. Avian Pathology 0:1–8. https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1656328

236. Cook JKA, Huggins MB, Orbell SJ, Mawditt K, Cavanagh D (2001) Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. Avian Pathology 30:233–242. https://doi.org/10.1080/03079450120054640

237. Morgan RW, Gelb J, Schreurs CS, Lütticken D, Rosenberger JK, Sondermeijer PJ (1992) Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. Avian Dis 36:858–870

238. Palya V, Kiss I, Tatár-Kis T, Mató T, Felföldi B, Gardin Y (2012) Advancement in vaccination against Newcastle disease: recombinant HVT NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reactions. Avian Dis 56:282–287. https://doi.org/10.1637/9935-091511-Reg.1

239. Gowthaman V, Singh SD, Dhama K, Ramakrishnan MA, Malik YPS, Gopala Krishna Murthy TR, Chitra R, Munir M (2019) Co-infection of Newcastle disease virus genotype XIII with low pathogenic avian influenza exacerbates clinical outcome of Newcastle disease in vaccinated layer poultry flocks. VirusDis 30:441–452. https://doi.org/10.1007/s13337-019-00533-6

240. Fouchier RAM, Bestebroer TM, Herfst S, Van Der Kemp L, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME (2000) Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. J Clin Microbiol 38:4096–4101

241. Kho CL, Mohd-Azmi ML, Arshad SS, Yusoff K (2000) Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. Journal of Virological Methods 86:71–83. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00185-8

242. Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW (2006) Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. Journal of Virological Methods 138:60–65. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.018

243. Cecchinato M, Lupini C, Pogoreltseva OSM, Listorti V, Mondin A, Drigo M, Catelli E (2013) Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. Avian Pathology 42:283–289. https://doi.org/10.1080/03079457.2013.788130

244. Mahmoudian A, Kirkpatrick NC, Coppo M, Lee S-W, Devlin JM, Markham PF, Browning GF, Noormohammadi AH (2011) Development of a SYBR Green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus. Avian Pathology 40:237–242. https://doi.org/10.1080/03079457.2011.553582

245. Wetzel AN, Lefevre KM, Raviv Z (2010) Revised Mycoplasma synoviae vlhA PCRs. avdi 54:1292–1297. https://doi.org/10.1637/9349-033010-ResNote.1

246. García M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH (2005) Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of Mycoplasma gallisepticum Infection in Chickens. avdi 49:125–132. https://doi.org/10.1637/7261-0812204R1

247. Tucciarone CM, Franzo G, Berto G, Drigo M, Ramon G, Koutoulis KC, Catelli E, Cecchinato M (2018) Evaluation of 793/B-like and Mass-like vaccine strain kinetics in experimental and field conditions by real-time RT-PCR quantification. Poult Sci 97:303–312. https://doi.org/10.3382/ps/pex292

248. Minskaia E, Hertzig T, Gorbalenya AE, Campanacci V, Cambillau C, Canard B, Ziebuhr J (2006) Discovery of an RNA virus 3′→5′ exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:5108–5113. https://doi.org/10.1073/pnas.0508200103

249. McKinley ET, Hilt DA, Jackwood MW (2008) Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. Vaccine 26:1274–1284. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.006

250. Bali K, Bálint Á, Farsang A, Marton S, Nagy B, Kaszab E, Belák S, Palya V, Bányai K (2021) Recombination Events Shape the Genomic Evolution of Infectious Bronchitis Virus in Europe. Viruses 13:535. https://doi.org/10.3390/v13040535

251. Beato MS, De Battisti C, Terregino C, Drago A, Capua I, Ortali G (2005) Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. Vet Rec 156:720. https://doi.org/10.1136/vr.156.22.720

252. Ikuta N, Fonseca ASK, Fernando FS, Filho TF, Martins NR da S, Lunge VR (2022) Emergence and molecular characterization of the avian infectious bronchitis virus GI-23 in commercial broiler farms from South America. Transboundary and Emerging Diseases 69:3167–3172. https://doi.org/10.1111/tbed.14724

253. Wille M, Holmes EC (2020) Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. FEMS Microbiology Reviews 44:631–644. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa026

254. Jia W, Mondal SP, Naqi SA (2002) Genetic and antigenic diversity in avian infectious bronchitis virus isolates of the 1940s. Avian Dis 46:437–441. https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0437:GAADIA]2.0.CO;2

255. Awad F, Baylis M, Ganapathy K (2014) Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. International Journal of Veterinary Science and Medicine 2:78–82. https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2014.01.001

256. Bali K, Kaszab E, Marton S, Hamdiou SH, Bentaleb RK, Kiss I, Palya V, Bányai K (2022) Novel Lineage of Infectious Bronchitis Virus from Sub-Saharan Africa Identified by Random Amplification and Next-Generation Sequencing of Viral Genome. Life (Basel) 12:475. https://doi.org/10.3390/life12040475

257. Brown Jordan A, Fusaro A, Blake L, Milani A, Zamperin G, Brown G, Carrington CVF, Monne I, Oura CAL (2020) Characterization of novel, pathogenic field strains of infectious bronchitis virus (IBV) in poultry in Trinidad and Tobago. Transboundary and Emerging Diseases 67:2775–2788. https://doi.org/10.1111/tbed.13637

258. Chen Y, Jiang L, Zhao W, Liu L, Zhao Y, Shao Y, Li H, Han Z, Liu S (2017) Identification and molecular characterization of a novel serotype infectious bronchitis virus (GI-28) in China. Vet Microbiol 198:108–115. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.017

259. Domanska-Blicharz K, Lisowska A, Sajewicz-Krukowska J (2020) Molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in Poland from 1980 to 2017. Infection, Genetics and Evolution 80:104177. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104177

260. Jiang L, Zhao W, Han Z, Chen Y, Zhao Y, Sun J, Li H, Shao Y, Liu L, Liu S (2017) Genome characterization, antigenicity and pathogenicity of a novel infectious bronchitis virus type isolated from south China. Infect Genet Evol 54:437–446. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.006

261. Ma T, Xu L, Ren M, Shen J, Han Z, Sun J, Zhao Y, Liu S (2019) Novel genotype of infectious bronchitis virus isolated in China. Vet Microbiol 230:178–186. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.020

262. Molenaar RJ, Dijkman R, de Wit JJ (2020) Characterization of infectious bronchitis virus D181, a new serotype (GII-2). Avian Pathology 49:243–250. https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1713987

263. Mendoza-González L, Marandino A, Panzera Y, Tomás G, Williman J, Techera C, Gayosso-Vázquez A, Ramírez-Andoney V, Alonso-Morales R, Realpe-Quintero M, Pérez R (2022) Research Note: High genetic diversity of infectious bronchitis virus from Mexico. Poultry Science 101:102076. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102076

264. Rohaim MA, El Naggar RF, Abdelsabour MA, Mohamed MHA, El-Sabagh IM, Munir M (2020) Evolutionary Analysis of Infectious Bronchitis Virus Reveals Marked Genetic Diversity and Recombination Events. Genes 11:605. https://doi.org/10.3390/genes11060605

265. Legnardi M, Franzo G, Koutoulis KC, Wiśniewski M, Catelli E, Tucciarone CM, Cecchinato M (2019) Vaccine or field strains: the jigsaw pattern of infectious bronchitis virus molecular epidemiology in Poland. Poultry Science 98:6388–6392. https://doi.org/10.3382/ps/pez473

266. Callison SA, Jackwood MW, Hilt DA (2001) Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus Isolates Foreign to the United States and Comparison with United States Isolates. Avian Diseases 45:492–499. https://doi.org/10.2307/1592994

267. Bochkov YA, Tosi G, Massi P, Drygin VV (2007) Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. Virus Genes 35:65–71. https://doi.org/10.1007/s11262-006-0037-0

268. Dolz R, Vergara-Alert J, Pérez M, Pujols J, Majó N (2012) New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. Vet Microbiol 156:256–264. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.001

269. Cortés V, Sevilla-Navarro S, García C, Marín C, Catalá-Gregori P (2022) Seroprevalence and prevalence of Infectious Bronchitis Virus in broilers, laying hens and broiler breeders in Spain. Poultry Science 101:101760. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101760

270. Legnardi M, Franzo G, Tucciarone CM, Catelli E, Menandro ML, Cecchinato M (2022) Effect of changes of vaccination strategies on IBV epidemiology, diagnosis and control: an Italian retrospective study. Vet Ital 58:41–45. https://doi.org/10.12834/VetIt.2084.11082.2

271. Vermeulen CJ, Dijkman R, de Wit JJS, Bosch B-J, Heesterbeek JAPH, van Schaik G (2023) Genetic analysis of infectious bronchitis virus (IBV) in vaccinated poultry populations over a period of 10 years. Avian Pathology 0:1–34. https://doi.org/10.1080/03079457.2023.2177140

272. Lachheb J, Bouslama Z, Nsiri J, Badr C, al Gallas N, Souissi N, Khazri I, Larbi I, Kaboudi K, Ghram A (2023) Phylogenetic and phylodynamic analyses of subtype-B metapneumovirus from chickens in Tunisia. Poultry Science 102:102253. https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102253

273. Chtioui Z, Bouzouaia M, Belhadj H (2018) First isolation of IBV variant 2 in Tunisia. In: 6th MPS – Torino - Italy - World's Poultry Science Journal. p 53

274. Pan X, Su X, Ding P, Zhao J, Cui H, Yan D, Teng Q, Li X, Beerens N, Zhang H, Liu Q, de Jong MCM, Li Z (2022) Maternal-derived antibodies hinder the antibody response to H9N2 AIV inactivated vaccine in the field. Animal Diseases 2:9. https://doi.org/10.1186/s44149-022-00040-0

Annexes

Annexe 1 : Ensemble d'amorces utilisés pour la détection des agents pathogènes respiratoires par qPCR.

Additional file 1

Pathogens	Target genes	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')	Ampli-cons size (bp)	References
Influenza A virus	M	**M52C:** CTTCTAACCGAGGTCGAAACG	**M253R:** AGGGCATTTTGGACAAAKCGTCTA	250	Fouchier *et al.* [240]
H9 subtype	HA	**H9-Shabat-Fm:** GGAAGAATTAATTATTATTGGTCRGTAC	**H9-Shabat-R:** GCCACCTTTTTCAGTCTGACATT	185	Shabat *et al.* [199]
NDV	F	**FIP1:** TACTTTGCTCACCCCCCTT	**FIP2:** CATCTTCCCAACTGCCACT	280	Kho *et al.* [241]
IBV	UTR	**GU391:** GCTTTTGAGCCTAGCGTT	**GL533:** GCCATGTTGTCACTGTCTATTG	143	Callison *et al,* [242]
aMPV	SH	**SH-f:** TAGTTTTGATCTTCCTTGTTGC	**SH-r:** GTAGTTGTGCTCAGCTCTGATA	200	Cecchinato *et al*. [243]
ILTV	UL15a	**UL15aF:** TTGCTGTGCTATTTCGCGTG	**UL15aR:** GTAAATCGTTTAGTGCGGCAT	113	Mahmoudian *et al*. [244]
MS	vlhA	**Vlha F:** CCATTGCTCCTGCTGTTAT	**Vlha R:** KMTKCTGTTGTAGTTGCTTCAA	295	Wetzel *et al.* [245]
MG	Mgc2	**Mgc2 F:** CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACA	**Mgc2 R:** TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTCC	300	García *et al.* [246]
ORT	*gyrA*	**ORT101F:** TGGGCAAGGGAACTTTGGTT	**ORT101R:** TGTCGGCAAGCATTTCCTCA	101	Croville *et al.* [190]

aMPV, Avian metapneumovirus; IBV, Infectious Bronchitis virus; ILTV, Infectious Laryngotracheitis virus; MG, *Mycoplasma gallisepticum*; MS, *Mycoplasma synoviae*; NDV, Newcastle Disease virus; ORT, *Ornithobacterium rhinotracheale*.

Annexe 2 : Informations sur les troupeaux enquêtés.

Additional file 2

Flocks ID	Sampling date	Governorate	Farm	Flock size (birds)	Age (days)
18-001	27/01/18	BenArous	farm D	11500	15
18-003	15/02/18	BenArous	farm D	18400	20
18-004	03/04/18	BenArous	farm B	9000	48
18-007	24/04/18	BenArous	farm D	12000	28
18-008	26/04/18	BenArous	farm D	10200	31
18-010	22/05/18	BenArous	farm F	11000	35
18-011	25/05/18	BenArous	farm B	5000	27
18-012	31/05/18	BenArous	farm B	7000	28
18-013	31/05/18	BenArous	farm B	7000	28
18-014	23/06/18	Nabeul	farm E	10000	30
18-015	02/07/18	BenArous	farm F	12000	25
18-016	14/07/18	BenArous	farm B	7500	18
18-017	01/08/18	BenArous	farm D	26000	28
18-019	03/08/18	BenArous	farm B	7500	38
18-020	03/08/18	BenArous	farm B	6200	36
18-021	13/10/18	BenArous	farm B	8000	33
18-022	13/10/18	BenArous	farm B	8500	33
18-023	13/10/18	BenArous	farm B	8500	33
18-026	31/10/18	Nabeul	farm E	10000	30
18-028	01/12/18	BenArous	farm B	8000	28
18-029	01/12/18	BenArous	farm B	8500	31
19-035	18/02/19	BenArous	farm D	16000	31
19-036	25/02/19	BenArous	farm D	33000	35
19-037	04/03/19	BenArous	farm D	19500	31
19-038	28/03/19	BenArous	external	15000	30
19-042	22/11/19	BenArous	farm D	18000	32
20-047	25/02/20	Manouba	external	23000	15
20-048	25/02/20	BenArous	farm B	7000	40
20-049	25/02/20	BenArous	farm B	6500	40
20-051	28/02/20	BenArous	farm B	7800	39
20-052	04/03/20	Bizerte	external	7000	28
20-053	10/03/20	Nabeul	farm E	8500	41
20-054	10/03/20	Nabeul	farm E	14500	40
20-055	11/03/20	Bizerte	external	3700	37
20-056	12/03/20	Nabeul	farm A	25500	50
20-057	16/03/20	Nabeul	farm C	18000	42
20-058	15/04/20	BenArous	farm D	12000	47
20-059	05/06/20	Nabeul	farm C	16000	40
20-060	26/06/20	Nabeul	external	7500	28

† Cumulative daily mortality during the first five days of the respiratory outbreak

Annexe 3 : Les valeurs de Ct des qPCR pour les agents pathogènes détectés.

Additinal file 3

Pathogen			Viral (Ct)[b]				Bacterial (Ct)		
Flocks ID	Age (day)	Mortality[a] (%)	H9N2	NDV	IBV	aMPV	MS	MG	ORT
18-001	15	1.8	-[c]	-	25.8	-	-	-	N.D
18-003	20	1	-	-	26.05	-	24.9	-	N.D
18-004	48	4	25.4	-	-	-	22.5	-	N.D
18-007	28	4.4	25.5	-	-	-	27.5	-	N.D
18-008	31	4	24.3	-	-	-	-	-	N.D
18-010	35	8.4	22.8	-	-	-	-	-	N.D
18-011	27	2	-	-	21.6	-	-	-	N.D
18-012	28	3.9	34.3	-	26.8	-	-	-	N.D
18-013	28	4.1	34.4	-	26.1	-	-	-	N.D
18-014	30	1.6	25.3	-	-	-	-	-	N.D
18-015	25	3.4	33.3	-	28.0	-	-	-	N.D
18-016	18	4.2	-	-	23.1	-	-	-	N.D
18-017	28	6.5	25.8	-	27.1	-	-	-	N.D
18-019	38	3.1	32.1	-	27.7	-	-	-	N.D
18-020	36	20.6	-	-	27.6	-	-	-	N.D
18-021	33	5.4	-	-	21.2	-	-	-	N.D
18-022	33	9.1	-	-	25.4	-	-	-	N.D
18-023	33	1.7	-	-	26.9	-	-	-	N.D
18-026	30	2.4	-	-	21.6	-	23.3	-	N.D
18-028	28	1.5	-	-	23.4	-	-	-	N.D
18-029	31	1.6	-	-	30.8	-	-	-	N.D
19-035	31	71.8	-	28.9	-	-	-	-	N.D
19-036	35	6.2	-	30	-	-	31.2	-	N.D
19-037	31	61.5	-	26.8	-	-	-	-	N.D
19-038	30	13.2	-	28.1	-	-	-	-	N.D
19-042	32	0.3	-	-	19.7	-	-	20.5	N.D
20-047	15	1.7	-	-	26.6	25.5	-	-	N.D
20-048	40	3.8	-	-	-	25.8	-	-	24.3
20-049	40	2.6	29.4	-	-	-	-	-	27.6
20-051	39	1.3	22.0	-	-	29.5	-	-	28.7
20-052	28	5	34.2	-	27.6	-	20.9	-	20.1
20-053	41	4.6	32.7	-	-	32.5	32.7	-	19.5
20-054	40	1.7	34.2	-	-	16.4	31.0	-	20.7
20-055	37	1.9	32.3	-	-	29.6	32.1	-	24.6
20-056	50	4.9	32.3	-	-	14.9	-	-	20.3
20-057	42	4.2	22.4	-	-	27.1	32.9	-	25.9
20-058	47	3	34.5	-	30.8	25.7	31.3	-	19.9
20-059	40	10.9	28.6	-	-	28.1	30.4	-	23.3
20-060	28	5.6	24.6	-	-	30.2	26.2	-	24.5

H9N2, low pathogenic avian influenza virus; aMPV, Avian metapneumovirus; IBV, Infectious Bronchitis virus; ILTV, Infectious Laryngotracheitis virus; MG, *Mycoplasma gallisepticum*; MS, *Mycoplasma synoviae*; NDV, Newcastle Disease virus; ORT, *Ornithobacterium rhinotracheale*

N.D: not done,
[b] Threshold Cycle.
[a] Cumulative daily mortality during the first five days of the respiratory outbreak
[c] Negative

Annexe 4 : Numéros d'accès à la base de données NCBI GenBank des séquences nucléotidiques générées au cours de cette étude.

Additional file 4

	GenBank accession number(s)			
Flocks ID	**H9N2**	**NDV**	**IBV**	**aMPV**
18-001			OQ199502	
18-004	OQ179925			
18-008	OQ179926			
18-010	OQ179927			
18-011			OQ199501	
18-013			OQ199500	
18-014	OQ179928			
18-016			OQ199499	
18-017	OQ179929			
18-019			OQ199498	
18-020			OQ199507	
18-021			OQ199497	
18-022			OQ199496	
18-023			OQ199495	
18-026			OQ199494	
19-037		OQ199524		
19-038		OQ199525		
19-042			OQ199504	
20-047			OQ199506	
20-048				OQ199508
20-051				OQ199509
20-052			OQ199503	
20-054				OQ199510
20-055				OQ199511
20-056				OQ199512
20-057	OQ179924			
20-058			OQ199505	OQ199513
20-059	OQ179930			OQ199514
20-060			OQ199502	OQ199515