

# Investigations épidémiologiques et microbiologiques à propos de deux cas de **septicémie hémorragique virale** en Moselle survenus en 2011

Sophie Le Bouquin (1) (sophie.lebouquin-leneveu@anses.fr), Peggy Rasquin (2), Laurent Bigarré (1), Joëlle Cabon (1), Gwenola Lefevre (3), Thierry Morin (1), Jeannette Castric (1), Thibaud Roman (4)

(1) Anses, Laboratoire de Ploufragan - Plouzané, France

(2) DDPP de la Moselle, Metz, France

(3) DDCSPP de la Meuse, Bar-le-Duc, France

(4) DGAL/SDSPA/BSA et DRAAF Basse-Normandie, service régional de l'alimentation, Caen, France

## Résumé

La septicémie hémorragique virale (SHV) est une maladie de poissons d'eau froide répartie mondialement. Si de nombreuses espèces peuvent être porteuses, les salmonidés et plus particulièrement la truite arc-en-ciel sont les plus sensibles. Lors d'un épisode survenu dans deux piscicultures de l'Est de la France en 2011, des investigations épidémiologiques et virologiques approfondies ont été menées conjointement afin de tenter d'identifier l'origine de ces foyers, la période et les zones à risque. S'il n'existe aucune certitude quand à l'origine de la contamination, les investigations ont permis de mettre en évidence une forte similitude entre les deux isolats mosellans indiquant soit une contamination par une source de virus commune, soit une contamination successive des piscicultures. Même si les données épidémiologiques ne permettent pas d'établir avec certitude quel était le cas index, des hypothèses peuvent être émises.

## Mots clés

Salmonidés, septicémie hémorragique virale, rhabdovirus, investigation épidémiologique, génotype

## Abstract

**Epidemiological and microbiological investigations of two outbreaks of Viral haemorrhagic septicemia, in Mosel, in 2011**

*Viral haemorrhagic septicemia (VHS) is a worldwide fish disease. Several species can be carriers, but salmonids and particularly rainbow trout are susceptible. A recent episode occurred in two fish farms of Eastern France in 2011. Epidemiological and virological investigations were conducted jointly, in order to identify the origin of these outbreaks, period and areas at risk. If there is no certainty about the source of the contamination, investigations have allowed to show a strong similarity between the two isolates, indicating either contamination by a common source of virus or successive contamination of the fish farms. Even if epidemiological data are not sufficient to establish with certainty what the index case was, hypotheses can be made.*

## Keywords

Salmonids, viral haemorrhagic septicemia, rhabdovirus, epidemiological investigation, genotype

La septicémie hémorragique virale est l'une des principales maladies des poissons réglementées en France. Présente essentiellement dans l'hémisphère nord, dans les eaux froides fréquentées par les salmonidés, elle touche près de 80 espèces de poissons d'élevage ou sauvages et est à l'origine de très lourdes pertes économiques pour les élevages affectés (EFSA, 2008; OIE, 2009). C'est une maladie dite d'eau froide, causée par un novirhabdovirus, le VSHV (Tordo *et al.*, 2005). Les signes cliniques s'expriment généralement quand la température de l'eau se situe entre 4 °C et 14 °C et la mortalité est la plus élevée entre 8 °C et 12 °C. Les individus asymptomatiques représentent des réservoirs potentiels du virus et peuvent contribuer à la propagation de la maladie. La truite arc-en-ciel (TAC) (*Oncorhynchus mykiss*) est une espèce particulièrement sensible. Depuis 2008, un agrément zoosanitaire des fermes aquacoles met en application les exigences sanitaires fixées par la réglementation européenne et favorise une détection précoce des nouveaux foyers. Dans ce cas, la prise d'un arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APDI) permet de mettre en place dans la pisciculture infectée des mesures de police sanitaire. Cette maladie est présente en Europe mais aucun cas n'avait été déclaré en France depuis 2009 (Mancho et Castric, 2011).

## Contexte et description des cas

En avril 2011, un pisciculteur de Moselle (pisciculture A) déclare à la Direction départementale de la protection des populations (DDPP) de son département une mortalité brutale et massive de TAC (8 tonnes en 15 jours). Un vétérinaire spécialisé en aquaculture intervient sur le site concerné. Il suspecte l'apparition d'un foyer de maladie réputée contagieuse (MRC) et effectue des prélèvements pour recherche

virale pendant que la DDPP prend un arrêté préfectoral de mise sous surveillance (APMS). Le laboratoire national de référence de l'Anses de Ploufragan - Plouzané (LNR) confirme la présence du virus VSHV. Un APDI est alors pris, instaurant une zone de confinement sur le site de la pisciculture, dans laquelle est exigée la destruction des animaux morts ou malades. L'APDI définit également un périmètre de surveillance suivant les limites des communes mitoyennes de celle du foyer et susceptibles d'être contaminées. Dans ce périmètre de surveillance, il existe une autre pisciculture qui fait l'objet de prélèvements, bien qu'aucune mortalité anormale n'y ait été déclarée. Le LNR confirme la présence du virus dans cette deuxième pisciculture, ce qui conduit à une modification de l'APDI pour inclure les deux établissements dans la zone de confinement.

Début mai 2011, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) sollicite l'assistance de l'Anses dans le cadre de l'enquête épidémiologique concernant ces deux foyers de SHV afin de déterminer la période et les zones à risque et pour tenter d'identifier l'origine de ces foyers.

## Matériels et méthodes

Une enquête épidémiologique complète a été conduite lors d'un déplacement sur site courant mai 2011. La méthodologie employée est basée sur celle proposée par le groupe de travail « épidémiologie d'intervention » d'experts de l'Anses sur l'investigation d'épisodes épidémiques en santé animale. Elle s'appuie sur les données issues de la DDPP de Moselle, elle-même assistée d'un vétérinaire de la DRAAF<sup>(1)</sup>, du référent national aquacole de la DGAL, d'agents de l'ONEMA<sup>(2)</sup>, d'une épidémiologiste et d'une virologue de l'Anses et du vétérinaire sanitaire désigné pour l'enquête.

(1) Direction régionale de l'alimentation, de l'agriculture et de la forêt; (2) Office national de l'eau et des milieux aquatiques.

Des autopsies sur les TAC ont été réalisées dans ces deux piscicultures par le vétérinaire sanitaire et des prélèvements ont été transmis au LNR.

### Mise en évidence du virus VSHV

La recherche du virus VSHV a été effectuée selon les recommandations de la norme NF U47-220 (Norme NF U47-220, 2010). Les organes (rein antérieur, rate, cerveau) prélevés sur dix TAC présentant des signes cliniques ont été broyés, dilués puis inoculés sur deux lignées cellulaires permissives (RTG-2 et EPC) à 14 °C. Le développement d'effets cytopathiques a été observé régulièrement après la mise en culture. L'identification du virus a été réalisée par immunofluorescence en utilisant des anticorps monoclonaux anti-VSHV (BioX, Belgique), puis confirmée par neutralisation à l'aide d'un sérum de référence spécifique.

### Recherche d'anticorps anti-VSHV par séroneutralisation (SN) et ELISA

Une recherche d'anticorps spécifiques du VSHV a été effectuée à partir de sérums de TAC par ELISA sandwich indirect selon une méthode développée par le LNR. Après lecture au spectrophotomètre à une densité optique de 492 nm, les résultats obtenus après transformation ont été comparés à la valeur du seuil de positivité (SE). Les échantillons présentant une valeur de DO égale ou supérieure à (SE + 15 %) ont été déclarés positifs. Les titres en anticorps neutralisants ont également été déterminés selon les recommandations de la norme XP U47-023 (Norme XP U47-023, 2009). Un sérum est considéré positif si son titre neutralisant est égal ou supérieur à 80.

**Tableau 1. Isolats ayant servi aux comparaisons de séquences**

Isolat	Espèce d'origine	Provenance	Année
G2192	Inconnue	Doubs	1997
L59x	Civelles	Loire-Atlantique	1987
N11298	Brochet	Transport B*	2003
N14165-1	Brochet	Puy-de-Dôme	2004
R374	Truite arc-en-ciel	Haut-Rhin	2005
R5509	Truite arc-en-ciel	Ain	2005
1565	Inconnue	Seine-Maritime	2007
4439	Truite arc-en-ciel	Puy-de-Dôme	2007
FF57	Truite arc-en-ciel	Doubs	2007
GG57	Truite arc-en-ciel	Pas-de-Calais	2007
680401	Truite arc-en-ciel	Aude	2009
JJ39	Truite arc-en-ciel	Moselle	2011
JJ40	Truite arc-en-ciel	Moselle	2011

\* Échantillon provenant d'un transport de la pisciculture B de Moselle.

**Tableau 2. Récapitulatif des analyses virologiques et sérologiques effectuées**

Méthode d'analyse	Date	Nombre, nature et origine des échantillons	Résultats
Virologie (IF + neutralisation)	13/04/11	1 échantillon : organes TAC* – pisciculture A	VHSH +
	28/04/11	3 échantillons : organes TAC et/ou Fario – pisciculture B	1 lot TAC VHSV +
	29/04/11	3 échantillons TAC et/ou Fario – étangs livrés par pisciculteur B	Négatif
	09/05/11	12 échantillons TAC – étangs dans zone sous surveillance	Négatif
Sérologie (ELISA)	09/05/11	18 sérums pisciculture A	1 positif et 1 douteux/18
	09/05/11	12 sérums pisciculture B	3 positifs/12

\* TAC: truite arc-en-ciel.

### Virologie moléculaire

L'ARN total a été extrait à partir de milieu de culture cellulaire infectée par l'un ou l'autre des deux isolats mosellans et soumis à une reverse-transcription suivie d'une réaction d'amplification en chaîne (PCR) ciblant la totalité du gène viral de la glycoprotéine d'enveloppe (~1500 paires de bases) (Einer Jensen *et al.*, 2004). Les produits PCR ont été clonés et séquencés. Les séquences obtenues ont été alignées et comparées entre elles et avec d'autres séquences d'isolats du génogroupe « la » du VSHV conservées dans les banques de données (Tableau 1).

## Résultats

### Résultats d'analyses

L'ensemble des résultats obtenus en culture cellulaire est présenté dans le Tableau 2. Les analyses virales réalisées suite à l'APMS à partir d'organes de TAC provenant de la pisciculture A, puis suite à l'APDI au niveau de la pisciculture B se sont révélées positives. D'autres analyses virologiques effectuées dans des étangs localisés dans le périmètre de surveillance ou ayant reçu des livraisons récentes du pisciculteur B se sont révélées négatives.

Les analyses sérologiques effectuées à partir de sérums de truites prélevés dans les deux piscicultures infectées ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-VSHV, avec une prévalence de 25 % pour la pisciculture B (IC<sub>95%</sub> [0,5-49,5]) contre 5,5 % (IC<sub>95%</sub> [0-16,1]) pour la pisciculture A. Le nombre limité d'animaux analysés ne permet néanmoins pas de conclure quant à une différence significative de prévalence entre ces deux piscicultures. Les titres en anticorps neutralisants n'ont pas pu être déterminés par séroneutralisation (SN) du fait d'une hémolyse forte de la quasi-totalité des échantillons.

Un arbre de distance a été déduit du pourcentage de similitude entre les séquences virales (Tableau 3). Les deux isolats mosellans JJ39 (pisciculture A) et JJ40 (pisciculture B) sont strictement identiques et appartiennent au génogroupe « la », souvent rencontré sur le territoire européen. Quand ces deux isolats sont comparés à d'autres d'origines différentes, trois groupes de séquences très similaires se distinguent. Ces trois groupes sont centrés sur trois séquences, 680401 (Aude, 2009, TAC), R374 (Haut-Rhin, 2005, TAC) et 4439 (Puy-de-Dôme, 2007, TAC), qui présentent respectivement 95, 96 et 99 % de similitude avec les séquences JJ39 et JJ40. Les similitudes les plus faibles (95 et 96 %) avec les séquences des isolats mosellans suggèrent des origines virales différentes. En revanche trois séquences virales semblent très similaires aux isolats mosellans (99 %) et se rangent dans le même groupe. Parmi celles-ci, l'isolat N11298 provient d'un brochet analysé en 2003 et provenant d'un transport de la pisciculture B.

### Investigations épidémiologiques

Les deux piscicultures concernées sont situées sur un affluent de la Moselle. Leurs prises d'eau se font directement dans la rivière. Aucune autre pisciculture ne se situe ni en amont ni en aval. La pisciculture B possède trois sites échelonnés sur la même rivière, B1 à B3, de l'amont vers l'aval. L'élevage A et le site B1 se situent sur des bras confluent de la rivière mais ne sont distants que de trois à quatre km à vol d'oiseau. Aucun des deux élevages n'est qualifié indemne vis-à-vis de la SHV. La pêche récréative est importante dans ce département et beaucoup de particuliers possèdent des étangs privés dont le recensement est difficile à réaliser.

La pisciculture A produit chaque année 80 tonnes de truites (TAC, fario). L'exploitation comprenant neuf bassins en parallèle, est grillagée et équipée d'un pédiluve; cependant elle n'est pas équipée contre l'intrusion d'oiseaux piscivores. Un étang de pêche ouvert au public est situé en aval des bassins. Les mortalités ont démarré simultanément dans plusieurs bassins et ont évolué très rapidement. Depuis le début des mortalités, environ 22 tonnes de TAC ont été envoyées à l'équarrissage. Aucune mortalité n'a été constatée sur les truites fario. L'enquête de traçabilité réalisée par la DDPF de Moselle a mis en évidence l'absence d'entrée de poissons depuis plusieurs

**Tableau 3. Groupes de similitude obtenus à partir de comparaison de séquences de gènes de la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la SHV du génogroupe « la »**

	1565	680401	G2192	L59x	N14165-1	R374	R5509	JJ39	JJ40	4439	FF57	GG57	N11298
1565	100 %												
680401	99	100 %											
G2192	98	98	100 %										
L59x	90	89	90	100 %									
N14165-1	96	95	96	90	100 %								
R374	95	95	96	90	100	100 %							
R5509	95	95	96	90	100	100	100 %						
JJ39	95	95	96	89	97	96	97	100 %					
JJ40	95	95	96	89	97	96	97	100	100 %				
4439	95	95	96	89	97	96	96	99	99	100 %			
FF57	95	95	96	89	97	97	97	100	100	100	100 %		
GG57	95	95	96	89	97	96	97	99	99	99	100	100 %	
N11298	95	95	96	89	97	96	97	99	99	99	100	100	100 %

mois. Les sorties au cours du mois précédant le début des mortalités concernaient des opérations d'alevinage auprès des associations de pêche, la livraison de piscicultures et de restaurants. Aux dires du pisciculteur, aucun échange de matériel n'a eu lieu entre piscicultures au cours de cette période et les véhicules ont été nettoyés et désinfectés à chaque transport. Des TAC ont été observées dans la rivière, en amont de la pisciculture.

L'activité du pisciculteur B consiste essentiellement en une activité de négoce de poissons, plus que d'élevage *sensu stricto*. Le site principal B1, le plus en amont, est entièrement clos, mais n'est pas protégé contre les oiseaux piscivores. Il est constitué de onze bassins. Des mortalités et des signes cliniques de SHV ont été observés sur les animaux le jour de la visite, ainsi que des restes de cadavres de poissons incinérés. Le pisciculteur a l'habitude de nourrir des sangliers avec ses poissons morts. Ceux-ci sont nombreux dans la région, ce que confirment le grillage soulevé par endroits et la présence de quantité de traces d'onglons. Il est difficile de connaître précisément la date d'apparition des premières mortalités, mais les TAC prélevées fin avril présentaient déjà des signes cliniques et ont été détectées positives pour le VSHV. Les espèces présentes sur le second site B2 ne présentent pas de signes cliniques. Ce sont des espèces non sensibles (saumons de fontaine, esturgeons, carpes et silures), néanmoins elles peuvent être vectrices du virus. Quelques grosses TAC sont toutefois présentes et plusieurs cadavres sont observés. Le dernier site B3 se situe 25 km en aval des deux précédents et n'est pour le moment pas exploité. Il a toutefois été inclus dans le périmètre de l'APDI pour éviter le transfert éventuel de poissons des sites amont vers celui-ci. La traçabilité des mouvements d'animaux, de personnes et de véhicules entre les sites de la pisciculture B est impossible à établir. Au cours de la période précédant l'épisode de SHV, des importations d'espèces sensibles ou vectrices au sens de l'annexe I de la directive 2006/88/CE ont été recensées. Le listing de fournisseurs reconstitué par la DDPP met en évidence des achats d'espèces sensibles ou vectrices en provenance de 10 départements différents. Au cours de cette même période, des livraisons de poissons sont recensées dans au moins onze départements différents. Les DDPP de ces départements ont été alertées mais aucune mortalité anormale n'y a été déclarée.

## Discussion

Il n'existe à ce jour aucune certitude quant à l'origine de la contamination, néanmoins, un certain nombre d'hypothèses peuvent être émises.

Une étude de la diversité d'une souche de VSHV dans la région des Grands Lacs nord-américains a montré une très forte similarité (99 %) entre plus de 100 isolats provenant de 37 sites et concernant 31 espèces, entre 2003 et 2009 (Thomson *et al.*, 2011). Dans ce cas,

le virus de la SHV s'est donc peu diversifié après son introduction dans une région. L'identité de séquence des deux isolats mosellans, constatée lors des alignements, indique soit que l'infection d'une des piscicultures est à l'origine de l'autre, soit que les deux piscicultures ont été contaminées par une source de virus commune.

La forte similitude (99 % à 100 %) entre les isolats 4439, N11298, JJ39 et JJ40 indique une origine commune entre ces quatre virus. Deux de ces virus proviennent de l'élevage B où ils ont été prélevés à huit ans d'intervalle sur deux espèces différentes, le brochet et la TAC. Une hypothèse serait donc un maintien du virus sur le site entre 2003 et 2011 avec un passage inter-espèces sur des TAC au cours de cette période. Un scénario alternatif supposerait deux entrées distinctes du même virus, en 2003 puis en 2011, à partir de poissons d'espèces et d'origines différentes, ce qui est plus improbable.

Il existe un lien épidémiologique entre les deux piscicultures, mais il n'est pas possible de déterminer quel a été le cas index. La date de début des mortalités dans la pisciculture B n'est pas connue avec certitude, cependant, la présence d'anticorps anti-VSHV chez les poissons analysés indique que l'infection remonte à plusieurs semaines. L'absence d'observations de mortalité début avril, alors que le virus était déjà présent dans l'élevage, pourrait faire penser à une infection chronique, qui aurait même pu précéder l'infection de la pisciculture A.

L'apparition simultanée de la maladie dans quatre bassins de la pisciculture A permet de suspecter une contamination venant de l'amont de la rivière. Cette observation exclut le rôle vecteur d'oiseaux piscivores, voire même l'hypothèse d'une introduction par le personnel ou par du matériel contaminé. S'il n'y a pas eu contact entre les deux élevages infectés par échanges de poissons ou de matériel au cours du mois qui a précédé l'apparition de signes cliniques, l'hypothèse d'un déversement de poissons infectés dans les deux cours d'eau ne peut être exclue. Les TAC ne sont normalement pas présentes à l'état sauvage dans ces cours d'eau (pas de reproduction). De fait, leur présence résulte probablement d'une intervention humaine. Enfin, les sangliers pourraient avoir joué un rôle de vecteurs passifs (onglons, pelage...) étant donné la faible distance entre les deux piscicultures.

## Conclusion

Depuis 2009, aucun cas de SHV n'avait été officiellement constaté en France. Les deux cas survenus dans des piscicultures de TAC de l'Est de la France en 2011 ont fait l'objet d'investigations épidémiologiques et analytiques, approfondies et complémentaires. Sans permettre d'identifier précisément l'origine de la contamination, elles ont permis d'établir des liens épidémiologiques entre les deux élevages et d'identifier une seule et même souche virale. Les pertes économiques sont conséquentes pour ces deux professionnels. Si la mise sur le marché des produits *via* un abattoir agréé, a été autorisée, une partie

non commercialisable de la production a été équarrie. L'APDI a été levé en février dernier, toutes les mesures prescrites (élimination des poissons sensibles, observation de mesures de quarantaine des poissons vecteurs, mise à sec et désinfection des bassins) ayant été réalisées sur l'ensemble des sites. Un protocole de suivi des poissons vecteurs par des truites sentinelles a été réalisé. Afin de prévenir une recontamination, des mesures de cloisonnement des différentes activités ont été prescrites: les sites A et B1 en amont sont des sites d'élevage exclusif de TAC. Le site médian B2 est réservé à l'élevage des espèces non sensibles. Enfin le site aval B3, le plus distant accueille les activités de négoce. Les échanges de matériels entre ces sites sont proscrits ou soumis à désinfection préalable. Les deux pisciculteurs souhaitent s'engager dans une démarche de qualification. Ils sont soutenus dans ce sens par la profession aquacole et les autorités sanitaires pour tenter de maîtriser au maximum les risques de propagation de maladies contagieuses. Enfin un système d'information géographique aquacole concernant l'ensemble du territoire métropolitain est en construction.

## Remerciements

Les auteurs remercient Marine Baud, Claire de Boisséson, François Lamour et Chiraz Talbi (Anses) pour les travaux de laboratoire ayant permis l'identification précise des virus.

## Références bibliographiques

EFSA, 2008. Aquatic species susceptible to diseases listed in Directive 2006/88/EC Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). The EFSA J. 808, 1-144.

Einer-Jensen, K., Ahrens, P., Forsberg, R., Lorenzen, N, 2004 Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. J. Gen. Virol. 85, 1167-1179.

Mancho, P., Castric, J., 2011. Surveillance des principales maladies réputées contagieuses des poissons en 2010: la septicémie hémorragique virale (SHV) et la nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI). *Bulletin épidémiologique Santé animale, Anses-DGAL*.46, 56-57.

Norme NF U 47-220. Isolement sur culture cellulaire et identification par immunofluorescence du virus de la septicémie hémorragique virale des poissons. Octobre 2010.

Norme XP U47-023. Recherche d'anticorps contre la septicémie hémorragique virale des salmonidés par la technique de neutralisation virale. Novembre 2009.

OIE, 2009. Manual of diagnostic tests for aquatic animals. 279-298.

Thompson, T.M., Batts, W.N., Faisal, M., Bowser, P., Casey, J.W., Phillips, K., Garver, K.A., Winton, J., Kurath, G., 2011. Emergence of viral haemorrhagic septicaemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. Dis. Aquat. Org. 96, 29-43.

Tordo, N., Benmansour, A., Calisher, A., Dietzgen, R.G., Fang, R.-X., Jackson, A.O., Kurath, G., Nadin-Davis, S., Tesh, R.B., Walker, P.J., 2005. Rhabdoviridae in Virus taxonomy 8<sup>th</sup> report. Editors Fauquet, C., Mayp, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A : 1258pp.