

Le directeur général

NOTE
d'appui scientifique et technique
de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

relatif à

« Demande d'appui scientifique et technique relative à une septicémie hémorragique virale sur un lot de saumons dans le département des Hautes-Pyrénées » ; 2015-SA-0161

L'Anses a été saisie le 22/07/2015 par la Direction Générale de l'Alimentation - Bureau de la Santé Animale - pour la réalisation de l'appui scientifique et technique suivant : 2015-SA-0161 – Demande d'appui scientifique et technique relative à une septicémie hémorragique virale (SHV) sur un lot de saumons dans le département des Hautes-Pyrénées.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

Un prélèvement de routine pour maintien de qualification réalisé le 19/05/2015 a conduit à une suspicion analytique de septicémie hémorragique virale sur un lot de saumons atlantiques (*Salmo salar*) dans le département des Hautes-Pyrénées le 10/06/2015 (Arrêté Préfectoral de Mise sous Surveillance). La SHV est une rhabdovirose classée dans les dangers sanitaires de catégorie 1 au niveau national et réglementée au niveau Européen (Arrêté du 29/07/2013 ; Directive 2006/88/EC).

La pisciculture concernée est une exploitation de repeuplement avec programme de conservation (saumons atlantiques, cristivomers, ombles, et truites fario). L'établissement est le seul établissement d'un compartiment indemne en amont d'une vaste zone indemne du bassin versant de l'Adour où les exploitations sont toutes qualifiées.

Après confirmation de la positivité du lot par une méthode officielle (culture cellulaire couplée à identification par immunofluorescence), un Arrêté Préfectoral de Déclaration d'Infection a été pris en date du 19/06/15.

Au vu de la situation dangereuse en matière d'impact sanitaire et économique pour les fermes avales, l'abattage des animaux positifs (saumons Garonne) et des poissons les plus exposés (lien hydrique direct) a été effectué à partir du 22/06/15. Une enquête épidémiologique et une surveillance (amont/aval) ont également été mises en place.

Le 25 juin, le Laboratoire National de Référence (LNR) « Maladies réglementées des poissons » de l'Anses de Ploufragan-Plouzané a mis en évidence une homologie génétique quasi-totale au niveau de la séquence du gène codant la glycoprotéine entre l'isolat dénommé « XXX 2015 », de génotype Ia-2, et deux isolats de SHV isolés respectivement en 1971 (Truites arc en ciel) et en 1991 (Saumons atlantiques). Ce résultat a introduit un doute sur la réalité de la positivité et laissé envisager la possibilité d'une contamination croisée. Il a alors été décidé de mettre en place des animaux sentinelles pour s'assurer de la non contamination des animaux restant sur le site.

Dans ce contexte, la DGAL a saisi l'Anses afin d'obtenir un appui scientifique et technique visant :

- 1) A étayer chacune des deux hypothèses sur le résultat positif initial (réelle positivité ou erreur de laboratoire) en apportant des éléments bibliographiques adaptés au contexte et en prenant en compte toutes les analyses réalisées i) par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention et ii) par le LNR Maladies réglementées des poissons, qui a effectué des analyses de confirmation et de caractérisation.

- 2) A appuyer techniquement la DDCSPP des Hautes-Pyrénées dans la formalisation d'un protocole de truitelles sentinelles *ad hoc* adapté à la structure du site, avec l'objectif de confirmer la présence ou l'absence d'un virus de type SHV sur la pisciculture ; ce travail devant être mené en lien avec le travail effectué par les experts de la DGAL.

Limitations du champ d'appui :

Cet AST :

- est rendu sachant que le protocole « sentinelles » a été initié à la date du 19/08/2015. Il est actuellement toujours en cours. A ce jour, aucun signe clinique ou analyse positive n'ont été obtenus. Afin que les éléments contenus dans cet AST soient complets, il sera nécessaire d'intégrer les résultats définitifs du protocole sentinelle, notamment les résultats des analyses qui seront réalisées sur 150 poissons au terme du temps de contact sur site défini par les experts.
- est basé sur l'état des connaissances disponibles à ce jour.

Périmètre :

L'appui de l'Anses porte uniquement sur les deux éléments précités : il vise à apporter un soutien à la mise en place de mesures de surveillance adaptées à la détection d'un virus de type VSHV potentiellement présent sur le site piscicole et à proposer une analyse des données de laboratoire obtenues sur ce cas, étayée par une synthèse de l'état de l'art disponible.

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

Les travaux menés ont été organisés de façon indépendante pour chacun des deux points sur lesquels portait l'AST. La demande a été traitée par le personnel du LNR « Maladies réglementées des poissons » qui fait partie intégrante de l'unité Pathologie Virale des Poissons du Laboratoire de Ploufragan-Plouzané. Les actions réalisées, les appuis obtenus et les éléments pris en compte dans le cadre de cet AST sont listés ci-dessous.

1) Hypothèses sur le résultat positif initial :

➔ Examen des données de laboratoires :

- Commémoratifs et résultats des analyses virologiques réalisées par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention à partir de différentes espèces de poissons provenant du site XXX et de la zone sous surveillance ;
- Résultats des analyses virologiques et des séquençages réalisés par le LNR Maladies réglementées des poissons, avec l'appui de la plateforme nationale de séquençage de l'Anses ;
- Liens génétiques entre l'isolat détecté et d'autres isolats de VSHV.

➔ Analyse des données bibliographiques disponibles ;

➔ Echanges avec le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne pour les maladies des poissons (DTU, Danemark).

2) Protocole « truitelles sentinelles » :

Du fait de la nécessité de proposer en urgence un protocole permettant de gérer la situation sanitaire sur le terrain, l'Anses a :

➔ mis en place, via le LNR « Maladies réglementées des poissons », une communication continue par mail et téléphone, sur la période du 9 juillet au 7 août 2015, avec les personnes suivantes : Mme Christine DARROUY-PAU, Chef du service santé et protection animales à la DDCSPP des Hautes-Pyrénées ; Mme Corinne DAUBA, personne ressource aquacole à la DDCSPP des Landes ; Mr Thibaud ROMAN, référent national aquacole – DRAAF Normandie ; Mr Pierre JABERT, épidémiologiste – DRAAF Midi-Pyrénées ; Mme Séverine RAUTUREAU, SPRSPP / SDSPA / Bureau santé animale, DGAL ; Dr Alain LE BRETON, Cabinet Vet'Eau.

➔ apporté des éléments de précision sur le protocole qui a été proposé, notamment sur le choix et le nombre des sentinelles, le plan d'échantillonnage et le suivi analytique, et les modalités de traitement des effluents.

➔ participé à la réunion de présentation du protocole qui s'est tenue à la Préfecture de Tarbes le 24 juillet (visioconférence).

➔ réalisé les analyses virologiques visant i) à vérifier le statut sanitaire des truitelles utilisées comme sentinelles ; ii) à rechercher la présence potentielle de VSHV dans les poissons morts au cours du protocole et/ou sacrifiés à la fin de celui-ci (en cours).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

■ Point 1 de la saisine : Etude du cas et des hypothèses sur l'origine de la contamination

• Synthèse des résultats analytiques et de caractérisation génétique de l'isolat « XXX 2015 »

- Isolement par culture cellulaire et identification d'un virus de type VSHV à partir d'échantillons provenant de Saumons atlantiques analysés dans le cadre d'un maintien de qualification

Les éléments ci-dessous reprennent dans le détail l'ensemble des résultats analytiques disponibles.

➔ **Analyses réalisées par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention :**

Le 19/05/2015 : Contrôle réglementaire réalisé sur le site XXX (CSO) : prélèvement d'un lot de Saumons Atlantiques (bassin 5 Haut) et d'un lot de truites fario (bassin circulaire).

Le 20/05/2015 : Réception des lots au laboratoire et début de l'analyse SA-15-01109 : 1^{er} passage sur lignée cellulaire BF₂ et EPC (dilutions 10⁻¹ et 10⁻², 2 cupules / dilution ; plaque différente pour les témoins virus VSHV, Virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (VNHI) et virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (VNPI), virus ajoutés systématiquement lors de chaque processus analytique).

Lectures à Jour (J) 2, J6 et J7 : Résultat négatif (absence d'effet cytopathique (ECP)) pour le prélèvement ; résultat positif à J6 pour les témoins virus.

Le 28/05/2015 : 2^{ème} passage sur 2 lignées cellulaires : EPC et BF₂ (dilutions 10⁻¹ et 10⁻², 2 cupules / dilution ; témoins virus VSHV, VNHI inoculés sur la même plaque).

Lectures à J4, J5 et J7 : Résultat positif pour le prélèvement à J5 aux dilutions 10⁻¹ et 10⁻² sur la lignée BF₂. Résultat positif à J4 pour les témoins virus VSHV et VNHI sur EPC et positif à J5 pour le témoin virus VSHV sur lignée BF₂.

Le 05/06/2015 : 3^{ème} passage sur la lignée cellulaire BF₂ (avec intégration d'une étape de neutralisation du VNPI, potentiellement présent).

Le 10/06/2015 : Mail du laboratoire à la DDCSPP65, à la DDCSPP40 et au Groupement de Défense Sanitaire Aquacole d'Aquitaine (GDSAA) pour signifier une suspicion de VSHV. A la suite à ce mail, déclaration de la DDCSPP65 à la DGAL (prise en compte le 11/06 ; numéro attribué 2015/83).

Le 10/06/2015 : qPCR spécifique du VSHV (3^{ème} passage) positive (avec un Ct égal à 15).

Le 11/06/2015 : Inoculation du surnageant de 3^{ème} passage sur BF₂.

Le 12/06/2015 : Réaction d'immunofluorescence (IF ; inoculation du 3^{ème} passage sur BF₂) : positive à 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, et 10⁻⁴. qPCR VSHV sur le tube de garde : négative. LNR prévenu pour envoi de l'échantillon semaine 25.

Le 15/06/2015 : Envoi par transport spécial (TSE) du surnageant du 3^{ème} passage au LNR.

Le 18/06/2015 : Décongélation du tube de garde pour réaliser un 1^{er} passage sur BF₂ et EPC (dilutions 10⁻¹ et 10⁻², 2 cupules / dilution ; plaque différente pour les témoins virus VSHV, VNHI, et VNPI).

Lectures à J4, J6 et J7 : négatif (aucun ECP) pour le prélèvement ; positif à J6 pour les témoins virus.

Le 25/06/2015 : 2^{ème} passage sur lignée cellulaire BF₂ (dilutions 10⁻¹ et 10⁻², 2 cupules / dilution ; les témoins virus VSHV, VNHI inoculés sur une plaque différente).

Lectures à J4, J6 et J7 : positif pour le prélèvement à J7 à la dilution 10^{-1} sur la lignée BF₂. Positif à J6 pour les témoins virus VSHV et VNHI sur BF₂.

Le 03/07/2015 : Inoculation du 2^{ème} passage sur BF2 pour réaction IF.

Le 04/07/2015 : Fixation et congélation des plaques IF.

Le 06/07/2015 : Réaction d'IF positive (BF2) aux dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , et 10^{-4} .

En parallèle, des prélèvements supplémentaires ont été réalisés dans la pisciculture XXX et dans deux piscicultures voisines suite au premier résultat positif pour la présence de VSHV.

Le 10/06/2015 : Prélèvement de 4 lots de Truites Arc en Ciel : début d'analyses le 11/06/2015 ; résultat négatif après deux passages sur lignées cellulaires BF2 et EPC.

Le 11/06/2015 : 50 prélèvements réalisés sur les trois sites : 12 lots (TACs), et 38 lots à XXX (truites fario, ombles chevalier, ombles de fontaine, cristivomers, saumons atlantiques).

Les prélèvements ont tous été reçus le 12/06/2015 et les analyses ont débuté soit le 12/06 (n= 36) soit le 18/06 (n= 14) selon les lots (selon priorisation de la DDCSPP65). Tous les résultats se sont révélés négatifs après deux passages sur lignées cellulaires BF2 et EPC et réaction de RT-PCR VSHV réalisés sur 19 lots / 50 (sélection du GDSAA). Les rapports d'analyses en virologie cellulaire ont été émis le 02/07/2015.

A ce jour, aucun autre échantillon analysé dans la zone sous surveillance depuis la détection positive sur le lot de *Salmo salar* n'a permis de mettre en évidence un virus de type VSHV.

➔ Analyses réalisées par le LNR Maladies réglementées des poissons :

Identification Laboratoire de première intention _ date réception par le LNR	Identification simplifiée
SA-15-01109 3 ^{ème} passage BF ₂ _ 16/06/2015 (1 ^{ère} analyse débutée le 20/05/2015)	ECHANTILLON n°1
SA-15-01464 2 ^{ème} passage BF ₂ _ 09/07/2015 (2 ^{ème} analyse débutée le 18/06/2015)	ECHANTILLON n°2
SA-15-01109 tube de garde_ 09/07/2015	ECHANTILLON n°3

16/06/2015 : Réception du surnageant viral (3^{ème} passage sur lignée cellulaire BF₂) identifié SA-15-01109 (200-1) envoyé par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention (**ECHANTILLON N°1**). Début d'analyse (inoculation sur 2 lignées cellulaires : EPC et BF₂; extraction d'ARN).

17/06/2015 : RT-PCR conventionnelle ciblant le gène de la glycoprotéine (gène G) en vue d'un séquençage.

18/06/2015 : Réaction d'IF positive avec un sérum anti-VSHV.

19/06/2015 : Emission du Rapport n°15/153 confirmant la présence d'un virus infectieux de type VSHV dans le surnageant de culture envoyé par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention.

24/06/2015 : Mise en souchothèque de l'**ECHANTILLON N°1**.

25/06/2015 : Résultats de séquençage du gène G de l'isolat. Emission d'un rapport 15/153ter : souche de génotype Ia-2 identique à la souche 07/71, utilisée comme témoin positif dans les analyses de virologie cellulaire (séquence AY546616, Einer-Jensen *et al.*, 2004).

02/07/2015 : Emission d'une fiche d'alerte (2015-05-PVP) sur ce cas de VSHV regroupant tous les éléments disponibles à destination de la cellule alerte de l'Anses.

09/07/2015 : Réception des échantillons suivants envoyés par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention : i) un surnageant viral positif identifié SA-15-01464 (2^{ème} passage sur BF₂) obtenu après seconde analyse en culture cellulaire du broyat d'organes initial (**ECHANTILLON N°2**) ; ii) le tube de garde (broyat initial) (**ECHANTILLON N°3**). Inoculation sur lignées cellulaires EPC et BF₂ et analyse en RT-qPCR spécifique du VSHV (surnageant positif, broyat en limite de détection).

10/07/2015 : Réaction d'IF positive sur l'**ECHANTILLON N°2** sur EPC et BF₂ ; émission du rapport 15/175. RT-PCR conventionnelle ciblant le gène G du VSHV : séquençage du gène complet pour l'**ECHANTILLON N°2** et du gène partiel pour l'**ECHANTILLON N°3**.

13/07/2015 : Observation d'un effet cytopathique à **J4** sur le 1^{er} passage de l'**ECHANTILLON N°3** pur et dilué à 10¹. Réalisation d'un 2^{ème} passage.

15/07/2015 : ECP net à la dilution 10⁻³ pour l'**ECHANTILLON N°3** en 48 heures et réaction d'IF positive avec un sérum anti-SHV. Emission du rapport 15/174.

16/07/2015 : Mise en souchothèque de l'**ECHANTILLON N°2** et de l'**ECHANTILLON N°3**.

22/07/2015 : Résultats du séquençage des **ECHANTILLONS N°2 et 3**. Emission des rapports d'analyses 15/174 bis et 15/175bis.

- Caractérisation génétique du virus VSHV isolé et étude des homologies génétiques avec d'autres isolats

Les différents échantillons (identifiés **ECHANTILLONS n°1, 2 et 3** dans le paragraphe précédent) obtenus dans le cadre du processus analytique (isolement initial et confirmations) ont fait l'objet d'une caractérisation génétique à l'Anses selon les recommandations de l'OIE (2015a). Cette caractérisation a porté sur le gène codant pour la glycoprotéine virale, protéine transmembranaire impliquée dans les mécanismes d'attachement et de pénétration du virus dans la cellule hôte (Einer-Jensen *et al.*, 2004 et 2005).

L'analyse des différentes séquences obtenues a permis de déterminer :

- Que **le virus isolé**, dénommé isolat « XXX 2015 » dans la suite du document, **appartient au génotype I, sous-génotype a** (type 2, selon la classification proposée par Kahns *et al.*, 2012) ;
- Que **l'ensemble des séquences obtenues** est identique à 100% (aux erreurs de séquençage près) :
 - ✓ 99,9% d'identité entre l'**ECHANTILLON n°1** et la séquence de référence (soit 1 nucléotide qui diffère sur 1524) ;
 - ✓ 100% d'identité entre l'**ECHANTILLON n°2** et la séquence de référence (sur 1524 nucléotides) ;
 - ✓ 100% d'identité entre l'**ECHANTILLON n°3** et la séquence de référence (sur 286 nucléotides).

*NB : Quatre génotypes (I, II, III et IV), parfois associés à des sous-génotypes (Ia à Ie et IVa à IVc), ont été décrits à l'heure actuelle pour les virus de type VSHV (Einer-Jensen *et al.*, 2004 ; Snow *et al.*, 2004 ; Kahns *et al.*, 2012). Cette catégorisation est relativement bien corrélée avec les régions géographiques d'isolement des souches :*

- *génotype Ia : souches d'eau douce majoritairement isolées de TACs en Europe continentale ;*
- *génotype Ib : virus de la Mer Baltique et de la Mer du Nord ;*
- *génotype Ic : petit groupe d'isolats anciens de TACs ;*
- *génotype Id : isolats d'eau douce ou saumâtres de TACs ;*
- *génotype Ie : isolats de la Mer Noire ;*
- *génotype II : isolats de la Mer Baltique exclusivement ;*
- *génotype III : virus isolés de l'Atlantique nord ;*
- *génotype IV (subdivisé en sous-génotypes a, b et c) : isolats Nord-Américains et Est-Asiatiques.*

(He *et al.*, 2014 ; Figure n°1).

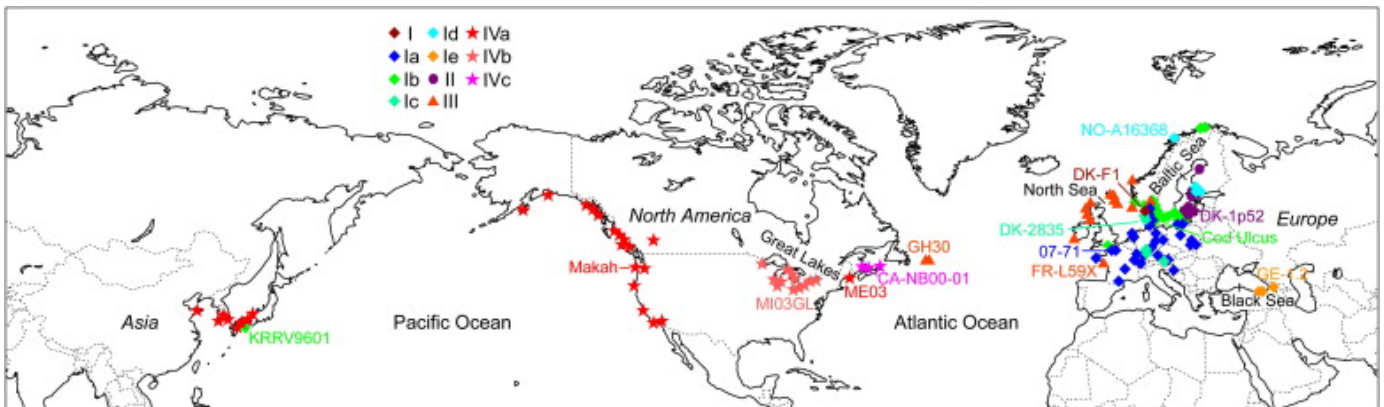


Figure n°1 : Distribution géographique des géotypes et sous-géotypes de VSHV (tiré de He et al., 2014).

La séquence totale du gène de la glycoprotéine (1524 nucléotides) de l'isolat « XXX 2015 » a été comparée à celles d'autres isolats issus de la souchothèque du LNR et/ou adressés par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention.

Une identité de séquences de 99,9% (**ECHANTILLON 1**) ou de 100% (**ECHANTILLON 2**) a été obtenue avec deux souches isolées sur le territoire :

- La souche n°4164-91 isolée par le laboratoire agréé en charge du diagnostic de première intention le 16/09/1991 (examen n°9109164164) à partir de saumons atlantiques au niveau de la pisciculture de Lau Balagnas, département 65, selon les informations fournies par le LPL (aucun document officiel disponible pour attester de cette localisation). Ces saumons auraient pour origine des œufs fournis par la pisciculture fédérale de Prechacq, département 64). Une mortalité de l'ordre de 150 individus par jour sur une période d'au moins un mois avait été rapportée à l'époque dans le bilan ichtyopathologique, avec une température d'eau de 19,5°C. Les analyses bactériologiques et parasitologiques effectuées sur les prélèvements s'étaient révélées négatives.
- La souche n°07/71 isolée de Truites Arc en Ciel en 1971. Cette souche fait partie des souches françaises (et Européennes) de référence et est utilisée comme témoin positif par le réseau de laboratoires agréés pour le diagnostic officiel des virus de type SHV.

L'arbre phylogénétique présenté en figure n°2 donne un aperçu des homologues entre les souches présentées ci-dessus.

Cet arbre comprend des souches représentatives des 4 géotypes de VSHV présents dans le monde et en France depuis 1971. La souche XXX 2015 et l'isolat 4164-91 sont clairement liés à la souche de référence 07/71 : l'alignement de séquences (Figure n°3) permet de visualiser l'identité parfaite de ces 3 isolats sur une zone partielle du gène G (286 nucléotides). Ces 3 souches diffèrent nettement des autres isolats appartenant au géotype Ia2, avec un pourcentage d'identité maximal de 98% pour la souche XXX 2015 avec un isolat allemand datant de 2002 (correspondant à 30 nucléotides de différence sur la séquence de 1524 nucléotides).

L'isolat XXX 2015 a révélé un minimum de 97,1% et un maximum de 97,5% d'homologie (équivalent à 44 et 38 nucléotides différents, respectivement) avec les souches isolées en 2013, 2014 et 2015 en France.

L'arbre phylogénétique de la figure n°2 permet de mettre en évidence l'évolution génétique naturelle des souches de VSHV sur le territoire français. Dans le département 57 par exemple, des souches de VSHV ont été isolées en 2014 puis en 2015. Malgré une même localisation géographique ainsi qu'un espace-temps réduit, des différences de séquence ont été observées (99,3% d'identité, soit une différence de 10 nucléotides sur 1524).

Les souches appartenant au géotype IV positionnées dans cet arbre et isolées sur saumon (coho ou salar) présentent au minimum 205 nucléotides de différence sur 1524 (86,5% d'identité) avec la souche XXX 2015.

Identité entre « XXX 2015 », 4164-91 et souche de référence 07/71 :

Max = 100%

Min = 99,9% (1 nucléotide différent)

Identité entre la souche « XXX 2015 » et les souches de génotype Ia2 :

Max = 98% (30 nucléotides différents)

Min = 97,1% (44 nucléotides différents)

Identité entre la souche « XXX 2015 » et les souches d'autres génotypes :

Génotype II : 88,8%

Génotype III : 90,6%

Génotype IV : 86,5%

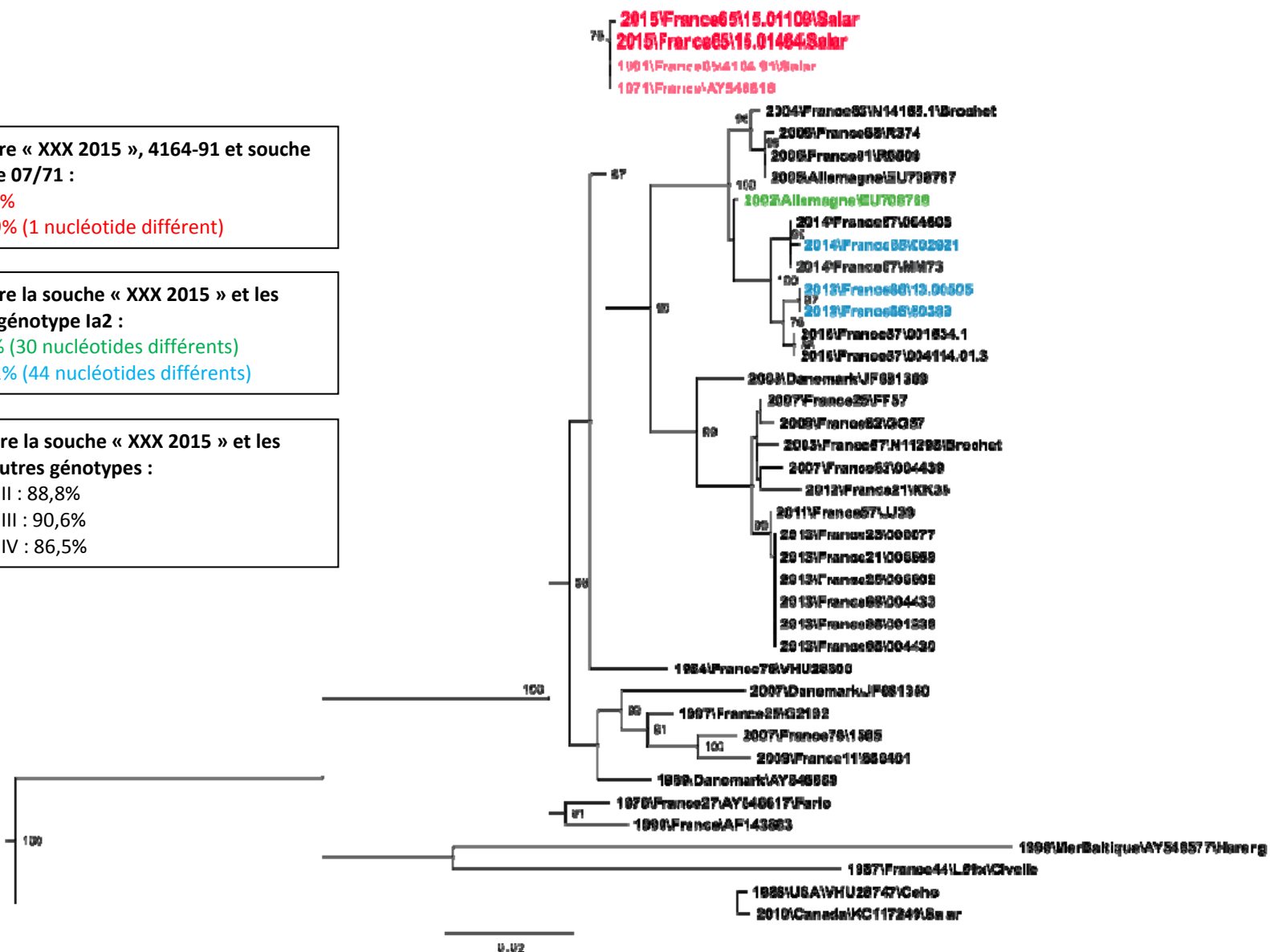


Figure n°2 : Arbre phylogénétique de souches de VSHV représentatives des 4 génotypes et présents en France ou dans le monde depuis 1971.

Le nom des séquences se présente sous la forme suivante : Année\Pays\Nom de l'isolat ou numéro Genebank\Espèce si différente de TAC.

Arbre ML (maximum de vraisemblance) réalisé avec le logiciel Seaview, en utilisant un modèle GTR et 100 bootstraps.

Classification selon Kahns *et al.*, 2012.

		Section 1					
		(1)	10	20	37		
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(1)	CAAT	TGTGGCAGGCCAT	CATCCCTGGGGACTCACAAT		
		(1)	CAAT	TGTGGCAGGCCAT	CATCCCTGGGGACTCACAAT		
		(1)	CAAT	TGTGGCAGGCCAT	CATCCCTGGGGACTCACAAT		
		(1)	CAAT	TGTGGCAGGCCAT	CATCCCTGGGGACTCACAAT		
		(1)	CAAT	TGTGGCAGGCCAT	CATCCCTGGGGACTCACAAT		
		Section 2					
		(38)	38	50	60	74	
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(38)	GGCAT	TGCACAGTGACAT	TCTGCGGGACAGAAATGGATC		
		(38)	GGCAT	TGCACAGTGACAT	TCTGCGGGACAGAAATGGATC		
		(38)	GGCAT	TGCACAGTGACAT	TCTGCGGGACAGAAATGGATC		
		(38)	GGCAT	TGCACAGTGACAT	TCTGCGGGACAGAAATGGATC		
		(38)	GGCAT	TGCACAGTGACAT	TCTGCGGGACAGAAATGGATC		
		Section 3					
		(75)	75	80	90	100	111
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(75)	AA	GACTGACCTGGGGACCT	GATCCAGGTGACAGGAC		
		(75)	AA	GACTGACCTGGGGACCT	GATCCAGGTGACAGGAC		
		(75)	AA	GACTGACCTGGGGACCT	GATCCAGGTGACAGGAC		
		(75)	AA	GACTGACCTGGGGACCT	GATCCAGGTGACAGGAC		
		(75)	AA	GACTGACCTGGGGACCT	GATCCAGGTGACAGGAC		
		Section 4					
		(112)	112	120	130	148	
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(112)	CGGGGGC	ACGAGGAAACTGACT	CCAAACAAGTGTGT		
		(112)	CGGGGGC	ACGAGGAAACTGACT	CCAAACAAGTGTGT		
		(112)	CGGGGGC	ACGAGGAAACTGACT	CCAAACAAGTGTGT		
		(112)	CGGGGGC	ACGAGGAAACTGACT	CCAAACAAGTGTGT		
		(112)	CGGGGGC	ACGAGGAAACTGACT	CCAAACAAGTGTGT		
		Section 5					
		(149)	149	160	170	185	
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(149)	CAAT	ACCGATATCCAGAT	GAGGGGGCAACAGACGAC		
		(149)	CAAT	ACCGATATCCAGAT	GAGGGGGCAACAGACGAC		
		(149)	CAAT	ACCGATATCCAGAT	GAGGGGGCAACAGACGAC		
		(149)	CAAT	ACCGATATCCAGAT	GAGGGGGCAACAGACGAC		
		(149)	CAAT	ACCGATATCCAGAT	GAGGGGGCAACAGACGAC		
		Section 6					
		(186)	186	200	210	222	
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(186)	TT	TTCTTATCTCAACCAT	CTCATCACCAACATGGCTC		
		(186)	TT	TTCTTATCTCAACCAT	CTCATCACCAACATGGCTC		
		(186)	TT	TTCTTATCTCAACCAT	CTCATCACCAACATGGCTC		
		(186)	TT	TTCTTATCTCAACCAT	CTCATCACCAACATGGCTC		
		(186)	TT	TTCTTATCTCAACCAT	CTCATCACCAACATGGCTC		
		Section 7					
		(223)	223	230	240	259	
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(223)	AA	GAACCGAGTGCC	TAGATGCCCATAGTGATATCAC		
		(223)	AA	GAACCGAGTGCC	TAGATGCCCATAGTGATATCAC		
		(223)	AA	GAACCGAGTGCC	TAGATGCCCATAGTGATATCAC		
		(223)	AA	GAACCGAGTGCC	TAGATGCCCATAGTGATATCAC		
		(223)	AA	GAACCGAGTGCC	TAGATGCCCATAGTGATATCAC		
		Section 8					
		(260)	260	270	288		
XXX 2015	1971\France\AY546616 1991\France65\4164.91\salar 2015\France65\15.01109\salar 2015\France65\15.01464\salar 2015\France65\ECHANTILLON3\salar consensus	(260)	CG	CTTCTGGGAAAGT	ATCCTCATTTC		
		(260)	CG	CTTCTGGGAAAGT	ATCCTCATTTC		
		(260)	CG	CTTCTGGGAAAGT	ATCCTCATTTC		
		(260)	CG	CTTCTGGGAAAGT	ATCCTCATTTC		
		(260)	CG	CTTCTGGGAAAGT	ATCCTCATTTC		

Figure n°3 : Alignement des séquences d'un fragment de Gene G (286 nucléotides) selon Thiery *et al.*, 2004.

Séquences obtenues à partir des 2 surnageants de culture de XXX 2015 (15.01109 et 15.01464), du tube de garde (Echantillon 3), du surnageant de culture de 1991 (4164.91) et de la séquence de référence 07/71 (AY546616). Le fond de couleur jaune représente les positions conservées entre les souches comparées.

Ces éléments mettent en évidence :

- Une **identité parfaite, à un nucléotide près, des isolats « XXX 2015 » et 4164-91 avec la séquence de la souche 07/71 isolée en 1971** ;
- Une **très forte probabilité de lien épidémiologique entre l'isolat « XXX 2015 » et la souche n°4164-91 isolée en 1991** à partir de Saumons atlantiques dans une autre pisciculture de la région ;
- Une **absence d'évolution génétique du gène de la glycoprotéine (1524 nt) entre ces deux isolats et la souche de référence, malgré une période de 24 ans séparant les deux isolats de saumon et une période de 44 ans entre la souche 07/71 et l'isolat « XXX 2015 »**.

- **Éléments disponibles sur la sensibilité du Saumon atlantique au virus de la SHV**

Une espèce animale sensible pour un pathogène donné est définie comme une espèce chez laquelle l'infection par l'agent responsable de la maladie a été démontrée soit via des observations de terrain (infections naturelles) soit via des infections expérimentales (mimant le plus possible les voies naturelles d'infection) (Directive 2006/88/EC ; OIE, 2015b). Un autre élément qui peut être pris en considération est la capacité de l'agent infectieux à se répliquer au sein de l'espèce considérée, cette réplification pouvant donner lieu à une expression clinique (EFSA, 2008).

- **Rapports relatifs à des infections naturelles ou à des résultats de surveillance**

Sur le continent Nord-Américain, l'examen des données de la littérature montre que des particules virales infectieuses de souches Nord-Américaines de VSHV (génotype IVa) ont été mises en évidence chez des *Salmo salar* d'élevage dès 1995 en Colombie Britannique (Canada) (Margolis, 1995 ; Traxler *et al.*, 1995) puis régulièrement depuis (Garver *et al.*, 2013). Les détections sont généralement réalisées en hiver et en été, à des périodes coïncidant avec des fraies de harengs (espèce chez laquelle le VSHV est endémique dans cette zone géographique) à proximité des fermes touchées [de fortes identités génétiques entre des souches isolées de saumons atlantiques dans cette région et des souches issues de harengs ou de sardines ont depuis confirmé l'hypothèse d'une transmission entre poissons sauvages et d'élevage (Garver *et al.*, 2013)]. Des mortalités chroniques relativement mineures ont été observées dans certains cas, allant de 2% par semaine à 10% en cumulé (Traxler, communication personnelle). Du VSHV a également été détecté chez un individu issu d'un lot de saumons atlantiques élevés en cages marines dans la région de Washington (Amos *et al.*, 1998 ; Amos et Thomas, 2002). Ces poissons avaient montré des troubles de l'appétit associés à une mortalité anormale et des signes cliniques suggérant une origine infectieuse. Les analyses complémentaires menées sur une période de 4 semaines n'ont néanmoins pas permis de ré-isoler du VSHV.

➔ **En milieu naturel, les *Salmo salar* peuvent être infectés par le VSHV génotype IV (au contact de poissons marins contaminés). Les mortalités induites rapportées sont faibles.**

En Europe, aucun virus de type VSHV n'a été isolé à partir de plusieurs milliers d'échantillons de saumons atlantiques collectés ces dernières années en Norvège, en Grande Bretagne et en Irlande dans le cadre de la surveillance en routine des rhabdovirus réglementés (Council Directive 91/67/EEC et Commission Decision 2001/183/EC ; Skall *et al.*, 2005). Du VSHV a par contre été isolé de saumons atlantiques en Espagne (Jimenez de la Fuente, *et al.*, 1988 ; Lopez-Vazquez *et al.*, 2003). Au niveau national, une étude menée à la fin des années 1990 sur la répartition des virus de salmonidés dans les piscicultures de la région aquitaine et des régions limitrophes a porté sur 699 prélèvements de poissons de différentes espèces, parmi lesquelles 11 issus de saumons atlantiques (Nougayrede, 1988). Du VSHV a pu être isolé par culture cellulaire et caractérisé au niveau sérologique à partir d'un échantillon de *Salmo salar* (taux de prévalence de 9%).

➔ **En Europe, le VSHV n'a pu être isolé que de rares fois de saumons atlantiques malgré un nombre d'échantillons contrôlés conséquent.**

o Rapports relatifs à des contaminations expérimentales

L'injection intra-péritonéale (IP) de saumons atlantiques avec des souches d'eau douce de VSHV (isolats 07/71 et 23/75 de génotype I utilisés aujourd'hui comme référence dans un certain nombre de laboratoires ; de Kinkelin et Castric, 1982) a engendré des niveaux de mortalités de 67 à 78% dans les 13 jours post-injection. Des quantités élevées de virus ont été retrouvées chez les poissons injectés et une dissémination horizontale du virus a pu être démontrée par la contamination de truites arc en ciel positionnées dans un bassin alimenté par l'eau de rejet des saumons. Aucune mortalité ni transmission n'a par contre été observée chez des saumons contaminés par balnéation. Une réplication virale a été mise en évidence dans un nombre limité de poissons (2 sur 60 avec la souche 07/71 et 3 sur 60 avec la souche 23/75). Des titres élevés en anticorps neutralisants spécifiques du VSHV ont été détectés chez les survivants à 79 jours post-infection.

Des mortalités nulles à modérées (0 à 3,3%) ont également été rapportées chez des saumons atlantiques (< 10g) infectés par balnéation avec des souches marines ou une souche d'eau douce de VSHV (DK-3592B) à une température de 10°C (King *et al.*, 2001). Aucun des individus morts n'a présenté de signes cliniques caractéristiques d'une SHV mais du virus a pu être isolé par culture cellulaire (identification par test ELISA) à partir de la rate et des reins antérieurs de certains individus (les poissons survivants n'ont pas été testés pour la présence du virus). Des résultats similaires à ceux obtenus par de Kinkelin et Castric (1982) ont été publiés en 2009 concernant une souche de génotype III isolée de truites arc en ciel en Norvège (Dale *et al.*, 2009). Alors que cette souche présentait une forte virulence chez la truite arc en ciel (70% par balnéation, 100% par injection IP), aucune mortalité n'a été observée chez des saumons atlantiques contaminés par balnéation. Une mortalité de 52% a néanmoins été obtenue chez les poissons injectés. Les études complémentaires citées par Skall *et al.* (2005) confirment cette faible virulence dans un contexte d'infection par balnéation.

➔ **Après balnéation avec des souches de génotypes I et III virulentes pour la TAC, seules des mortalités nulles à très faibles ont pu être observées chez des saumons atlantiques, sans mise en évidence de transmission virale.**

Des essais réalisés plus récemment avec des souches VSHV de génotype IVa ont permis de confirmer la sensibilité du saumon atlantique à ce génotype (Lovy *et al.*, 2013). Des taux de mortalité de l'ordre de 90% ont été obtenus chez les poissons injectés par voie IP dans les trois semaines suivant la contamination à une température d'eau de 9°C. L'infection a été accompagnée de signes cliniques (exophtalmie bilatérale, hémorragies à la base des nageoires, ...) et de modifications histologiques (hémorragies au niveau des reins, congestion de la rate, ...). Une infection productive (signes cliniques, mortalités de 8%, forte réplication du virus dans les organes cibles et persistance supérieure à 10 semaines, excrétion) a également été obtenue par balnéation et contact avec des harengs infectés. Une transmission du virus de saumons atlantiques contaminés à des harengs utilisés comme « sentinelles » a également pu être démontrée. Il est important de noter que les souches utilisées pour cette étude avaient été isolées de *Salmo salar* et qu'un stress supplémentaire des animaux a été introduit au moment de la contamination (transfert en eau de mer). Si la virulence de ces souches de génotypes IVa semble plus élevée que celles générées par les génotypes présents en Europe, l'examen des observations de terrain depuis le premier cas détecté en 1995 chez *Salmo salar* ne montre néanmoins pas d'évolution de la virulence chez cette espèce.

➔ **Le *Salmo salar* pourrait être une espèce vectrice pour le VSHV de génotype IVa.**

En conclusion, il apparaît que :

- **Des virus de type VSHV sont capables d'infecter productivement le saumon atlantique, attestant du statut sensible officiel de cette espèce** (OIE, 2015a ; EFSA, 2008) ;
- Au regard des données de surveillance et des contaminations expérimentales réalisées, **la pathogénicité pour le saumon atlantique des souches circulant en Europe semble nulle ou très modérée ;**
- La détection d'individus positifs dans le milieu naturel suggère que **le saumon atlantique pourrait jouer un rôle de vecteur du VSHV.**

- **Evolution génétique des virus de type VSHV**

En Europe, la mise en place d'une surveillance active (Directive Européenne 2006/88/EC) et de campagnes extensives en mer visant à disposer de données de prévalence ont permis d'obtenir un certain nombre de souches de VSHV représentatives de l'ensemble des génotypes circulants. Ces souches ont été utilisées ces dernières années dans le cadre d'études phylogénétiques visant à mieux appréhender les capacités d'évolution et de circulation de ces virus.

Les virus à ARN ont une capacité d'évolution génétique significativement plus importante que les virus à ADN, causée par leur ARN polymérase qui n'est pas équipée de système de correction des erreurs faites lors du processus de réplication (Steinhauer *et al.*, 1992). Les études réalisées sur une grande diversité d'isolats de VSHV couvrant l'ensemble des génotypes ont permis d'établir que, pour le gène codant la glycoprotéine, le taux de substitution nucléotidique varie entre $1,72 \times 10^{-3}$ et $2,80 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Pierce and Stepien, 2012 ; He *et al.*, 2014). Pour un gène de la taille de la glycoprotéine virale, cela représente un nombre théorique de substitutions nucléotidiques de 0,43 et 2,62 par an. Des approches ciblées spécifiquement sur des souches de génotype la ont estimé le taux moyen de substitution de ce génotype entre $1,74 \times 10^{-3}$ et $6,01 \times 10^{-4}$ (soit 0,91 à 2,65 substitutions par an) (Einer-Jensen *et al.*, 2004 ; He *et al.*, 2014).

En Finlande, où l'étude des souches isolées de truites arc en ciel (génotype Id) sur la période allant de 2000 à 2004 a révélé des taux de mutation relativement faibles, des niveaux d'identité nucléotidique (gène G) allant de 99.1 à 99.5% ont été établis avec l'ancêtre commun suspecté, une souche datant de 1968, ce qui correspond à des taux de substitution nucléotidique par site et par an variant entre $1,3 \times 10^{-4}$ et $2,6 \times 10^{-4}$ (soit environ 0,25 à 0,51 substitution / an) (Raja-Halli *et al.*, 2006).

En Colombie Britannique, région où le VSHV (génotype IVa) est enzootique, la comparaison des séquences du gène G de 63 isolats (dont 13 de saumons atlantiques) provenant de 29 localisations et couvrant une période de 19 années (Garver *et al.*, 2013) a permis d'estimer la diversité nucléotidique maximale à 2% (30 nucléotides sur 1524). L'étude fine des séquences a montré que la majorité des isolats présentaient des différences au niveau du gène G et n'étaient détectés que sur une période limitée (une année maximum). Parmi les quelques isolats avec une identité nucléotidique totale, la plupart étaient associés à des origines géographiques communes et prélevés dans des intervalles de temps limités.

Au niveau national, l'étude des relations phylogénétiques entre les isolats obtenus à partir des foyers détectés en France depuis une trentaine d'année est en adéquation avec ces taux moyens d'évolution (Figure 2). Des isolats mis en évidence à plusieurs mois d'intervalle et ayant un probable lien épidémiologique ont toujours présenté un nombre de substitutions nucléotidiques suffisant au niveau du gène de leur glycoprotéine pour permettre de les discriminer. Des identités totales ont été obtenues mais uniquement à partir de souches isolées dans le même pas de temps, ce qui a permis suspecter un lien épidémiologique fort (Roman *et al.*, 2014).

Sur la base des éléments exposés ci-dessus et dans l'état actuel des connaissances :

- **La plasticité génétique des isolats de génotype la de VSHV est estimée entre $1,74 \times 10^{-3}$ et $6,01 \times 10^{-4}$ substitutions/site/an** (soit 0,91 à 2,65 substitutions nucléotidiques par an pour le gène de la glycoprotéine) ;
- **L'évolution génétique de virus de type VSHV dans un hôte comme le saumon atlantique**, à priori faiblement sensible et chez lequel le virus pourrait avoir un niveau de réplication très faible, **reste délicat à évaluer mais pourrait être plus limitée** ;
- **Il paraît néanmoins fortement improbable que le virus puisse persister sur une période aussi longue** (24 ans entre le cas de 1991 et le cas actuel) **dans des poissons porteurs sans générer des substitutions nucléotidiques détectables** ;
- **L'identité génétique entre les isolats de terrain de 1991 et 2015 et la souche de référence 07/71** utilisée en routine comme témoin positif lors des analyses de première intention **est atypique** ;
- **L'étude rétrospective, menée par le LRUE, de cas similaires d'identités nucléotidiques totales entre des souches isolées de foyers et des isolats caractérisés** (trois cas dans trois pays sur les 22 dernières années) **a toujours conclu à des cas de contaminations croisées** (virus utilisés comme témoins lors des analyses ou provenant d'un essai inter-laboratoire d'aptitude).

- **Le cas de 1991**, dont l'étiologie a été attribuée à du VSHV, **est étrange** à deux niveaux : i) une température d'eau très inhabituelle (19,5°C notifiée dans le rapport d'analyse n°9109164164 ; Annexe 2) pour l'observation de signes cliniques associés à une infection par ce rhabdovirus (généralement entre 4 et 14°C, observés entre 15 et 18°C mais avec des mortalités cumulées modérées) et apparaissant élevée pour un poisson comme le saumon qui aime les eaux fraîches (6 à 15°C en général) ; ii) des signes cliniques et des mortalités (150 poissons / jour sur au moins un mois mais sans détail de l'effectif total) dont la proportion semble forte au regard des données de contaminations naturelles et expérimentales disponibles.

■ **Point 2 de la saisine : Appui à l'élaboration du protocole « truitelles sentinelles »**

Le protocole mis en place pour le suivi sanitaire de la pisciculture est présenté en Annexe 2. Il a été mis en place et optimisé sur la période du 9 juillet au 7 août 2015 dans le cadre de différents échanges entre la DGAL, la DDCSPP65, le vétérinaire sanitaire mandaté et le LNR Maladies réglementées des poissons.

L'Anses a été plus particulièrement questionnée sur :

- Le choix (origine, taille) et la vérification (échantillonnage, méthode analytique) du statut sanitaire des sentinelles avant mise en place sur site ;
- L'optimisation des conditions de mise en contact des sentinelles avec les eaux potentiellement contaminées sur site, avec notamment la prise en compte de la température de l'eau ;
- Les modalités d'analyses des poissons au cours et au terme de la phase de contact avec les eaux de sortie de la pisciculture (échantillonnage et modalités de préparation des échantillons ; méthodes analytiques) ;
- Les modalités de réalisation du traitement des effluents sortant du bassin contenant les truitelles sentinelles.

A la demande du vétérinaire sanitaire mandaté pour le suivi du protocole sentinelle, les analyses (virologie cellulaire et/ou RT-PCR) seront réalisées par le personnel du LNR Maladies réglementées des poissons. Le protocole a été mis en application sur le terrain à la date du 3 août 2015 (prélèvements d'organes sur certaines des truitelles du lot utilisé comme sentinelles pour vérification du statut sanitaire des truitelles sentinelles) et est toujours en cours à l'heure actuelle.

Le directeur général

Marc Mortureux

MOTS-CLES

Septicémie Hémorragique Virale (SHV) – Rhabdovirus – *Salmo salar* – Sensibilité - Culture cellulaire – Immunofluorescence – Séquençage – Evolution génétique - Taux de substitution nucléotidique.

BIBLIOGRAPHIE

- Amos, K, Thomas, J, Hopper, K. 1998. A case history of adaptive management strategies for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in Washington State. *J. Aquat. Anim. Health.* 10, 152-159.
- Amos, K, Thomas J. 2002. Disease interactions between wild and cultured fish : observations and lessons learned in the Pacific Northwest. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 22(2), 95-102.
- Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027831750>
- Commission Decision 2001/183/EC: Commission Decision of 22 February 2001 laying down the sampling plans and diagnostic methods for the detection and confirmation of certain fish diseases and repealing Decision 92/532/EEC (Text with EEA relevance) (notified under document number C(2001) 426). <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32001D0183>
- Council Directive 91/67/EEC concerning the animal health conditions governing the placing on the market of aquaculture animals and products. *Official Journal of the European Communities L 46*, 19 February 1991, Volume 34, pp. 1-18.
- Dale, OB, Orpetveit, I, Lyngstad, TM, Kahns, S, Skall, HF, Olesen, NJ, Dannevig, BH. 2009. Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Organ.* 85, 93-103.
- De Kinkelin, P, Castric, J. 1982. An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry, *Salmo salar* L., to viral haemorrhagic septicaemia. *J. Fish Dis.* 5, 57-65.
- Directive 2006/88/CE du 24 octobre 2006 du Conseil relative aux conditions de police sanitaire applicables aux animaux et aux produits d'aquaculture, et à la prévention de certaines maladies chez les animaux aquatiques et aux mesures de lutte contre ces maladies. *Journal Officiel de l'Union Européenne.* L328/14. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex:32006L0088>
- EFSA. 2008. Aquatic species susceptible to diseases listed in Directive 2006/88/EC. Scientific opinion of the panel on animal health and welfare (AHAW). Question n°EFSA-Q-2008-074. *The EFSA Journal.* 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.
- Einer-Jensen, K, Ahrens, P, Lorenzen, N. 2005. Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. *Dis. Aquat. Organ.* 67(1-2), 39-45.
- Garver, KA, Traxler, GS, Hawley, LM, Richard, J, Ross, JP, Lovy, J. 2013. Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in British Columbia, Canada, reveals transmission from wild to farmed fish. *Dis. Aquat. Organ.* 104(2), 93-104.
- He, M, Yan, XC, Liang, Y, Sun, XW, Teng, CB. 2014. Evolution of the viral hemorrhagic septicemia virus: divergence, selection and origin. *Mol. Phylogenet. Evol.* 77, 34-40.
- Jimenez de la Fuente, J, Marcotegui, MA, San Juan, ML, Basurco, B. 1988. Diagnosis of viral diseases in salmonid farms in Spain. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 8(1), 1-2.
- Kahns, S, Skall, HF, Kaas, RS, Korsholm, H, Bang Jensen, B, Jonstrup, SP, Dodge, MJ, Einer-Jensen, K, Stone, D, Olesen, NJ. 2012. European freshwater VHSV genotype Ia isolates divide into two distinct subpopulations. *Dis. Aquat. Organ.* 99, 23-35.
- King, JA, Snow, M, Skall, HF, Raynard, RS. 2001. Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to European freshwater and marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Dis. Aquat. Organ.* 47, 25-31.

Lopez-Vazquez, C, Bain, N, Oliveira, JG, Snow, M, Raynard, RS, Barja, JL, Dopazo, CP. 2003. Characterization of VHSV isolates from Iberian origin and from the Flemish Cap by sequencing. 11th International Conference of the EAFP on Diseases for Fish and Shellfish, St. Julians, Malta. Abstract book, p138, 21-26 september, 2002.

Lovy, J, Piesik, P, Hershberger, PK, Garver, KA. 2013. Experimental infection studies demonstrating Atlantic salmon as a host and reservoir of viral haemorrhagic septicemia virus type Iva with insights into pathology and host immunity. *Vet. Microbiol.* 166, 91-101.

Margolis, L. 1995. Isolation of North American strain VHS virus from farmed Atlantic salmon. *Aquaculture Update* 72. Pacific Biological Station, Nanaimo, BC.

Nougayrede, P. 1988. Enquête sur la repartition des virus de salmonidés dans les salmonicultures de la région Aquitaine et des régions limitrophes. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 311, 134-138.

OIE. 2015a. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2015. Chapter 2.3.9. Viral Haemorrhagic Septicemia. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.09_VHS.pdf

OIE. 2015b. Code sanitaire pour les animaux aquatiques. Glossaire. <http://www.oie.int/index.php?id=171&L=1&htmfile=glossaire.htm>

Pierce, LR, Stepien, CA. 2012. Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV). *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 327–341.

Raja-Halli, M, Vehmas, TK, Rimaila-Parnanen, E, Sainmaa, S, Skall, HF, Olesen, NJ, Tapiovaara. 2006. Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis. Aquat. Organ.* 72, 201–211.

Roman, T., Cabon, J., Baud, M., Bigarré, L., Morin, T., 2014. Bilan pour l'année 2013 de la surveillance des principaux dangers sanitaires de première catégorie pour les poissons : septicémie hémorragique virale (SHV), nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI) et herpès-virose de la carpe (HVC). *Bull. Epid. Santé Anim. Alim.* 64, 69-71.

Skall, HF, Olesen, NJ, Møllergaard, S. 2005. Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming: a review. *J. Fish Dis.* 28, 509-529.

Snow, M, Bain, N, Black, J, Taupin, V, Cunningham, CO, King, JA, Skall, HF, Raynard, RS. 2004. Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Organ.* 61(1-2), 11-21.

Steinhauer, DA, Domingo, E, Holland, JJ. 1992. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene.* 122, 281–288.

Traxler, GS, Kieser, D, Evelyn, PTP. 1995. Isolation of North American strain of VHS virus from farmed Atlantic salmon. *Aquaculture update* 72.