

Etude de la persistance du virus RHVD à l'aide d'une technique RT-PCR dans l'environnement d'élevages de lapins en vue d'expliquer des récurrences de la Maladie Hémorragique Virale (VHD)

S. BOUCHER¹, C. BOUCAUT BARALON², B. DILE¹, C. JACQUINET³

¹LABOVET (Réseau Cristal) - BP 539 - 85505 Les Herbiers cedex, France

²SCANELIS, 23 Chemin des Capelles, 31076 Toulouse cedex 03, France

³CEVA Santé Animale, 10 av Ballastière, 33500 Libourne, France

Résumé. Dix élevages ayant une première fois été atteints par la VHD en 2003 ont récidivé quelques mois après le premier épisode. Des écouvillonnages ont été réalisés sur le matériel et les locaux afin de mettre en évidence un éventuel virus RHVD par une technique de RT-PCR. Aucun des élevages désinfectés avec un des 3 produits virucides du commerce n'a été positif. En revanche, dans les élevages non désinfectés, les auteurs ont mis en évidence le virus sur les poussières recueillies sur la charpente en bois ou sur le dessus des cages mais aussi sur les parois, les crottes, les poils, les fosses, le granulé et au niveau de taches de sang. Parallèlement est soulevée la durée de l'immunité transmise après vaccination des cheptels sur le terrain. La présence de virus plus de 4 mois après un épisode de VHD et la chute de l'immunité dans certains cas peut expliquer les récurrences.

Abstract. Study of the persistence of RHVD virus with a RT-PCT technique in the environment of rabbitries to explain relapse of viral hemorrhagic disease (RHD). Ten rabbitries that had been infected by RHD a first time in 2003 were infected a second time several months latter. Swabs were sampled on material and buildings with the objective of investigating RHVD viruses with a RT-PCR technique. None of the rabbitries that had been decontaminated with one of the three commercial products against virus was positive. On the opposite, in rabbitries that had not been decontaminated, the authors found the viruses on dust sampled on the woody framework, on the top of the cages, on the walls, dejections, hair, in the pits, on the food and on blood spots. The authors also raise the question of the duration of immunity induced by the vaccination. The occurrence of the virus more than four months after RHD infection and the diminution of the immunity in some cases could also be at the origin of some recurrences.

Introduction

Quelques élevages ayant été atteints par la VHD durant l'épizootie de 2003 ont été de nouveau contaminés après une période d'accalmie variable. Le but de cette étude est de mettre en évidence des zones de ces élevages où le virus peut se trouver présent sans qu'il y ait de cas clinique déclaré au moment du prélèvement.

Notre travail doit aussi permettre de valider ou d'invalider une désinfection telle qu'elle est habituellement pratiquée en élevage. La finalité est de pouvoir conseiller une désinfection et/ou des pratiques d'élevage efficaces conjointement à la vaccination. Il n'a pas de valeur exhaustive mais donne quelques indications pratiques qu'il conviendrait de généraliser à l'aide d'une réelle enquête épidémiologique.

1. Matériel et méthodes

1.1. Elevages

Les prélèvements ont été effectués dans des élevages qui ont montré des épisodes de VHD à au moins deux reprises, le dernier datant de 7 jours à 5 mois à la date du prélèvement. (tableau 1)

Notre travail voulant coller à la réalité du terrain, il n'a pas été demandé aux éleveurs de changer leurs pratiques de nettoyage et de désinfection pour l'expérience. Certains bâtiments ont été nettoyés et

désinfectés selon les méthodes préconisées actuellement (lavage du plus sale au plus propre, dosages et temps de contact respectés) (Boucher et Nouaille, 2002), d'autres l'ont été moins soigneusement (cages seules nettoyées par exemple). D'autres enfin ne furent pas nettoyés avant la réalisation des écouvillons (tableau 1).

1.2. Désinfectants :

Les produits employés sont mentionnés en bas du tableau 1 et sont des produits du commerce couramment utilisés en cuniculture. Ils ont tous une activité virucide aux doses employées. La désinfection a été faite après nettoyage par pulvérisation sur le matériel, les sols, le plafond et les murs. Les fosses n'ont pas toujours été désinfectées.

1.3. Animaux :

les lapins de l'élevage ont été correctement vaccinés selon les dires des éleveurs. Aucun cuniculteur ne pense avoir mal réalisé sa vaccination. Tous disent avoir fait le dernier rappel durant les 6 mois précédant le prélèvement. Nous constaterons postérieurement que les lapins atteints n'avaient pas été vaccinés (engraissements, lapins de fins de bande gardés après la vente des autres) ou avaient été vaccinés depuis plus de 6 mois (femelles adultes). Les foies des cadavres ont été testés par une technique ELISA selon la méthode décrite par le CNEVA (1996).

Tableau 1 : Résultats des RT-PCR sur écouvillons

Lieu	Désinfectant avant écouvillonnage	Résultat RT-PCR
Elevage 1 (infection datant de 7 jours) VHD confirmée ELISA		
Fosse (20 cm en profondeur)	Aucun	Positif
Poils volants	Aucun	Positif
Matériel (cages)	Aucun	Positif
Mangeoires avec granulé	Aucun	Positif
Sang sur les cages	Aucun	Positif
Elevage 2 (infection datant de 4 mois) VHD confirmée ELISA		
cages en bois	Desinfectant 1	Négatif
cages en bois	Aucun	Positif
Charpente du bâtiment en bois (non désinfectées)	Aucun	Positif
Elevage 3 (infection datant de 5 mois) VHD confirmée ELISA		
Sas	Desinfectant 1	Négatif
Cooling externe	Desinfectant 1	Négatif
Silo	Desinfectant 1	Négatif
Extérieur du bâtiment	Desinfectant 1	Négatif
Elevage 4 (infection datant de 3 mois) VHD confirmée ELISA		
Maternité cages intérieur	Desinfectant 1	Négatif
Chenil	Aucun	Négatif
Congélateur à cadavres (n'ayant pas reçu de lapins ayant la VHD mais des dépouilles de garennes)	Aucun	Négatif
Elevage 5 (infection datant de 10 jours) VHD confirmée ELISA		
Engraissement cages intérieur	Désinfectant 1	Négatif
Engraissement plafonds et murs	Désinfectant 1	Négatif
Elevage 6 (infection datant de 5 mois) VHD confirmée ELISA		
Cages ciment	Desinfectant 3	Négatif
Elevage 7 (infection datant de 3 mois) VHD confirmée ELISA		
Poussières derrière le bac à eau	Desinfectant 2	Négatif
Poussières des câbles électriques	Desinfectant 2	Négatif
Fosses	Desinfectant 2	Négatif
Cages (interstices)	Desinfectant 2	Négatif
Elevage 8 (infection datant de 4 mois)		
Maternité vaccinée n'ayant pas été touchée mais engraissement issu de cette maternité confirmé ELISA VHD		
Parois avec crottes d'oiseaux	Desinfectant 1	Négatif
Cages sans lapins	Aucune	Négatif
congélateur	Desinfectant 1	Négatif
Elevage 9 (infection datant de 1 mois) VHD non confirmée ELISA		
Cages de lapines mortes de VHD supposée	Desinfectant 3	Négatif
Elevage 10 (infection datant de 4 mois) VHD confirmée ELISA		
Cages en bois à l'extérieur	Desinfectant 1	Négatif
mangeoire	Desinfectant 1	Négatif

1.4. Prélèvements : I

Ils ont été réalisés à l'aide d'écouvillons stériles. Chaque écouvillon est humidifié extemporanément par de l'eau PPI en uni dose. Chaque prélèvement est fait avec du matériel jetable non réutilisé (gants, petit matériel, uni doses...) Chaque prélèvement est emballé par un sur emballage.

1.5. Méthode

Le critère retenu pour l'étude est la présence ou l'absence de matériel génétique de virus de la VHD. Pour ce faire, les échantillons ont été analysés par une technique de RT-PCR. Les écouvillons sont conservés à température ambiante entre 1 et 7 jours avant l'envoi. Les acides nucléiques sont extraits à

l'aide du kit High Pure Viral RNA (Roche Diagnostics). Pour la RT-PCR, deux amorces spécifiques (VHD1F : 5'acgtgcttcagtttggtat3' et VHD1R : 5'acaattctgctggtgagg3') permettant d'amplifier un fragment de 400 pb sur le gène de la protéine de capsid VP60 du virus de la VHD ont été utilisées. Ces amorces ont été dessinées à partir d'un alignement de 63 séquences du gène de la VP60 du virus de la VHD. Des témoins positifs (gène de la VP60 cloné et cDNA de souches de référence) ainsi que des témoins négatifs (produit d'extraction d'eau sur chaque série) ont été introduits sur chaque série de PCR. Les analyses ont été réalisées dans un environnement sécurisé dédié au diagnostic moléculaire. La spécificité de l'amplification obtenue sur les échantillons testés a été vérifiée par séquençage du fragment amplifié.

2. Résultats

Les analyses en RT-PCR sur le gène de la VP60 du virus de la VHD se sont révélées négatives sur tous les échantillons testés en milieu désinfecté.

En revanche, nous avons mis en évidence le génome du virus sur 7 écouvillons provenant de bâtiments non ou mal désinfectés. On a mis en évidence par cette méthode des virus dans les poussières recueillies sur la charpente en bois ou sur le dessus des cages mais aussi sur les parois, les crottes, les poils, les fosses, le granulé et des taches de sang (tableau 1).

3. Discussion

Les recherches se sont révélées négatives sur tous les prélèvements faits en milieu désinfecté. Lors de l'établissement de notre protocole, nous avons choisi de faire un contrôle de désinfection indicateur à l'aide de boîtes contact. Ce contrôle ne fut pas réalisé. Cependant, même si les pratiques de désinfection que les éleveurs nous ont citées n'étaient pas toujours parfaites (les dosages ont toujours été respectés mais le nettoyage a souvent été trop rapidement effectué et des restes de matière organique existaient dans les bâtiments), il n'a pas été possible de mettre en évidence le virus dans les élevages désinfectés de cette étude. L'élevage 2 est particulièrement intéressant à ce niveau puisque seules les écouvillons réalisés sur des cages non désinfectées ont été positifs. Ruvoen (1995) préconise la désinfection des locaux et du matériel à l'aide de soude (inutilisable pour les cages galvanisées) à moins de 2% ou de formol à 3%.

Les analyses RT-PCR ont toutes été faites après avoir obtenu la certitude du diagnostic de VHD par ELISA. Deux exceptions cependant sont à prendre en compte. Dans un petit élevage fermier (élevage 9) seule une autopsie et la description de mortalité importante sur des sujets de plus de 2 mois nous a amené à conclure à une VHD. Ce diagnostic fut renforcé par le fait qu'une vaccination d'urgence a stoppé la mortalité en 5 jours. Il est possible cependant que les lésions

évoquant une VHD aient été confondues avec celles d'une septicémie à *Pasteurella multocida*. Dans un autre élevage (N°8), la VHD a bien été confirmée par ELISA sur les lapins d'engraissement mais jamais sur les femelles. Or, le prélèvement a été fait sur la maternité et nous ne sommes pas certains que le virus RHVD y ait été présent à un moment donné, même si sur l'élevage il a été retrouvé avec certitude.

L'expérience confirme la transmission indirecte du virus par l'air et tout ce qui peut être souillé par des sécrétions ou excréments de lapins malades.

Tous les éleveurs pensaient que leurs animaux étaient correctement vaccinés au moment où l'épisode de VHD est survenu. Or, dans tous les cas nous avons pu mettre en évidence des failles dans le protocole. Ainsi, aucun ne vaccine ses lapins d'engraissement (pour des raisons économiques). La population arrivant au milieu de sa période d'engraissement est donc un cheptel à risque. Ceci est renforcé chez quelques éleveurs qui gardent les lapins les plus petits 6 semaines de plus afin de les vendre mieux engraisés (fins de bandes). Les lapines de cette expérience sont toutes vaccinées à partir de 10 semaines. Elles restent donc elles aussi un cheptel à risque.

Mais la majorité des lapines contaminées mortes de VHD était représentée par des femelles ayant reçu une vaccination datant de plus de 6 mois au jour de leur mort. Une vaccination bien faite ou faite avec un rappel immunise probablement plus de 6 mois comme le préconisent les fabricants. Cependant, avec les pratiques de vaccination de terrain (incertitude sur la voie d'administration, sur la quantité de vaccin injecté, sur la conservation en élevage du produit... absence de rappel sur les femelles âgées), nous observons que les lapines ne sont plus toutes immunisées au delà de 6 mois et deviennent un cheptel à risque.

Nous avons peu de données sur la résistance du virus RHVD dans le milieu extérieur (Xu et Chen, 1989 ; Ruvoen, 1995). Cette étude de terrain a montré que le virus pouvait se retrouver sur tout support organique issu des lapins (excréments, sang, poils, squames) mais aussi sur des supports ayant été directement ou non en relation avec les lapins (granulés, bois).

Simon *et al.* (1994) ayant relaté certaines expériences où le virus était retrouvé dans les crottes des chiens, nous avons essayé de retrouver le virus dans le chenil d'un élevage où les chiens sont chasseurs et se nourrissent par ailleurs de lapereaux morts mais ce fut sans succès. L'éleveur nous a dit ne pas avoir donné à ses chiens les lapins morts de VHD. Toutefois, on aurait peut-être pu trouver une réserve de virus dans ce chenil non désinfecté.

Enfin, notre travail montre que des élevages vaccinés depuis plus de 6 mois sont susceptibles d'être contaminés. Il est important de renforcer l'immunité par un rappel. Ce rappel peut être effectué dans le

jeune âge de l'animal (5 semaines puis rappel à 10 semaines) ou dans les 6 mois après la première vaccination. Il serait très intéressant de tester ces deux types de protocoles.

Conclusion

Ce travail met en évidence l'intérêt de la désinfection dans la lutte contre la VHD. Le virus peut être retrouvé dans beaucoup d'endroits ayant été en contact avec les lapins excréteurs ou leur cadavre mais on le retrouve aussi dans les fosses ou sur les parois ayant été indirectement en contact avec ces animaux.

Il a permis indirectement de voir que la vaccination contre la VHD doit inclure un rappel.

La présence de virus plus de 4 mois après un épisode de VHD et la chute de l'immunité dans certains cas peut expliquer les récurrences constatées.

Références

- BOUCHER S., NOUAILLE L., 2002. « Manuel Pratique des Maladies des Lapins », *France Agricole* 2^e éd., 272 p (14 – 19 et 104 – 109)
- SIMON MC, MUGURUZA R., ALONSO JL., MUZQUIZ JL., GIRONES O., HAFFAR A., 1994. « recherche du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHD) chez le renard et rôle des canidés domestiques dans la transmission de la maladie. *Rec. Méd. Vét.* 170 (12), 841 – 845.
- CNEVA PLOUFRAGAN. 1996. Mise en évidence du virus de la maladie hémorragique virale du lapin (VHDv) dans les foies de lapin par la technique ELISA. Manuel technique révision 2 pages 1 à 5.
- RUVOEN CLOUET N. 1995. Le virus de la maladie hémorragique du lapin : étude du récepteur erythrocytaire et des caractéristiques antigéniques appliquées au diagnostic séroépidémiologique. *Thèse de doctorat* de l'Université de Nantes, spécialité virologie.
- XU ZJ, CHEN WX, 1989. Viral haemorrhagic disease in rabbits : a review. *Vet. Res. Comm.* 13, 205 – 212.