

Maîtriser les récurrences de VHD dans les élevages cynicoles français : premiers enseignements du projet SURVRECI

Huneau-Salaün A.^{1*}, Guillou-Cloarec C¹, Thomas R¹, Dusseux J¹, Poulain G¹, Chastagner A², Gillet E³, Le Gall-Reculé G.¹, Le Bouquin S.¹

¹ Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané-Niort, BP 53, 22440 Ploufragan, France

²ITAVI, 41 rue de Beaucemaine, 22440 Ploufragan, France

³CLIPP, Interprofession du lapin, 75009 Paris, France

* correspondant : adeline.huneau@anses.fr

Résumé - Chaque année, environ un tiers des cas de maladie hémorragique virale du lapin (VHD pour « Viral Hemorrhagic Disease », ou RHD pour « Rabbit Hemorrhagic Disease ») recensés en France surviennent dans des élevages cynicoles ayant déjà subi la maladie dans les trois années précédentes. Maîtriser la récurrence de la VHD constitue donc un objectif clé pour limiter l'impact de la maladie sur la filière cynicole. L'étude SURVRECI, associant l'Anses, l'ITAVI, le CLIPP et les groupements cynicoles, vise à réduire le nombre de récurrences de VHD en élevage en renforçant les mesures de gestion des foyers et en améliorant les connaissances sur l'épidémiologie de la maladie due au génotype RHDV2 via l'analyse génomique des souches de virus isolées. Entre décembre 2021 et octobre 2022, six élevages atteints plusieurs fois de VHD depuis 2018 ont été suivis pour réaliser une évaluation de l'efficacité de la décontamination des installations vis-à-vis du virus, recenser les mesures de prévention mises en œuvre et dresser un bilan de la vaccination des femelles contre la VHD. Les résultats montrent la présence résiduelle de génome viral après décontamination dans quatre des six élevages, au niveau du système d'évacuation des déjections et/ou du bac d'équarrissage, suggérant la nécessité de renforcer les protocoles de nettoyage et désinfection de ces installations. L'analyse phylogénétique des souches de RHDV2 de trois de ces élevages en récurrence montre que les virus isolés sont proches d'autres virus retrouvés dans d'autres élevages ou dans la faune sauvage. L'analyse des souches virales isolées de plusieurs foyers successifs dans deux élevages entre 2019 et 2021 a par ailleurs confirmé qu'il s'agissait à chaque épisode de maladie de l'introduction d'un nouveau virus et non du maintien de la souche virale initiale. Les investigations de terrain, couplées avec les analyses génomiques, vont être poursuivies jusqu'à fin 2023 avec l'objectif d'enquêter une quinzaine d'élevages en situation de récurrence de VHD et au moins autant d'élevages atteints de VHD avant 2018 mais demeurés indemnes depuis. Les pratiques observées dans les élevages récidivants seront comparées à celles des élevages indemnes depuis plusieurs années, afin d'identifier des points à maîtriser pour éviter les récurrences.

Mots clé : épidémiologie / maladie hémorragique virale / lapin / décontamination

Abstract – Recurrence of Rabbit haemorrhagic disease outbreaks in French rabbit farms: first results of an epidemiological survey. One third of the Rabbit haemorrhagic disease (RHD) outbreaks in France occur on rabbit farms previously infected by the disease. Recurring outbreaks are a main feature of the RHD epidemiology in France. In order to prevent reoccurring outbreaks, an epidemiological survey has been set up comparing biosecurity practices and RHD prevention measures on farms frequently affected by RHD outbreaks with farms previously affected in 2018-2019 but with no recurrence of the disease. To date, six farms with recurring outbreaks and two farms without RHD recurrence have been studied. First results show that RHDV viral genome were still detected on environmental samples after cleaning and disinfection of premises in four out of six farms with recurring RHD outbreaks. Improvement of cleaning and disinfection procedures are needed, especially for the rendering container. Phylogenetic analysis of RHD viruses isolated on successive outbreaks on the same two farms showed no direct relationship between viral isolates, suggesting successive introductions of different viruses. The epidemiological survey will be completed by recruitment of new farms in 2023.

Introduction

La maladie hémorragique virale du lapin (VHD) est un problème sanitaire majeur pour la filière cunicole française depuis l'apparition d'un nouveau génotype de lagovirus, nommé RHDV2, en 2010 (Le Gall- Reculé et al., 2011). Le développement de vaccins spécifiques du RHDV2 a permis une maîtrise partielle de la maladie mais l'impossibilité économique de vacciner les lapins d'engraissement dans les élevages limite le contrôle de la maladie. Ainsi, le dispositif de surveillance de la VHD, mis en place par la filière cunicole en 2018, a montré une incidence d'environ 21,7 foyers pour 100 élevages entre le 01/07/2018 et le 31/12/2019 (Huneau-Salaün et al., 2022). De plus, 35% des foyers recensés en 2019 sont survenus dans des élevages ayant déjà été atteints en 2018. L'existence d'élevages avec plusieurs foyers successifs de VHD avait déjà été rapportée dans l'étude rétrospective menée sur les cas entre 2013 et 2017 en France (Huneau-Salaün et al., 2021). Une situation similaire est également soulignée en Espagne, les élevages à foyers multiples représentant une part importante des cas recensés (Rossel et al., 2019). Ces observations démontrent l'importance des élevages en situation de récurrence dans l'épidémiologie de la VHD à l'échelle d'une filière. Maîtriser les récurrences est donc prioritaire pour réduire l'impact sanitaire de la VHD. L'étude SURVRECI, associant l'Anses, l'ITAVI, le CLIPP et les groupements cunicoles, vise à réduire le nombre de récurrences de VHD en renforçant les mesures de gestion des foyers et en améliorant les connaissances sur l'épidémiologie de la maladie. L'étude, débutée en septembre 2021 pour trois ans, comprend notamment un volet d'enquête épidémiologique et un volet d'analyse phylogénétique des souches virales retrouvées dans ces foyers. Cet article présente les résultats obtenus en 2022 sur ces deux volets et les premiers enseignements pratiques de l'étude.

1. L'étude épidémiologique dans les élevages récidivistes

1.1. Méthodologie d'étude

L'étude épidémiologique se découpe en deux actions. La première est le suivi de la gestion de foyers de VHD dans des élevages ayant été atteints plusieurs fois par la maladie depuis 2018. Ces élevages, dits « récidivistes », sont signalés par les vétérinaires et groupements cunicoles participant à l'étude lorsqu'un nouveau foyer de VHD s'y déclare. Deux visites y sont réalisées pour récolter des informations sur les pratiques de biosécurité, la manifestation de la VHD et les mesures mises en place pour prévenir la maladie. La première visite, conduite durant l'épisode de VHD, permet de réaliser un bilan sérologique sur 14 femelles (sept femelles en première mise-bas et sept femelles multipares) par le dosage des anticorps totaux contre le RHDV-2 afin d'évaluer la qualité de

la vaccination. L'excrétion de virus est recherchée au moyen d'écouvillons rectaux pris sur ces femelles. Des prélèvements d'environnement par chiffonnage sont aussi réalisés afin d'identifier les surfaces positives vis-à-vis du génome de RHDV2 (Huneau- Salaün et al., 2021). Les mêmes prélèvements sont répétés lors de la seconde visite après décontamination de l'élevage pour évaluer la qualité du nettoyage et de la désinfection. La recherche de génome viral sur les écouvillons rectaux et les prélèvements environnementaux est réalisée à l'aide d'une RT-PCR temps réel spécifique du RHDV2 (Le Gall-Reculé et al., 2017) à partir de 10 µL d'ARN totaux utilisés au pur et dilués au 1/10 dans de l'eau sans RNase pour chaque échantillon. Les ARN ont été préalablement extraits à partir de 200 µL de surnageant d'éluat de reprise de chiffonnette ou d'écouvillon à l'aide du kit NucleoMag Vet kit (Macherey-Nagel) dans un automate KingFisher Flex™ (Thermo Fisher Scientific).

La seconde action de l'étude épidémiologique repose sur un dispositif cas-témoin comparant les pratiques de biosécurité et de gestion des foyers de VHD entre ces élevages en récurrence et des élevages n'ayant connu qu'un seul foyer de VHD avant 2018 et demeurés indemnes depuis (témoins). Dans les élevages témoins, une visite est réalisée comprenant le questionnaire de biosécurité et de prévention de la VHD, les prélèvements environnementaux et sur les femelles.

Au moment de la rédaction de cet article, six élevages récidivistes et deux élevages témoins ont été intégrés dans l'étude épidémiologique. Les élevages en situation de récurrence ont connu deux à cinq foyers de VHD depuis 2017, atteignant les lapins d'engraissement essentiellement. Dans ces six élevages, les femelles étaient vaccinées contre la VHD alors que la vaccination en engraissement n'était pas systématique. Les deux élevages témoins ont connu un foyer de VHD en 2018 ou en 2019. La comparaison statistique des pratiques n'étant pas possible sur un petit nombre d'élevages, des premiers résultats descriptifs sont présentés par la suite.

1.2. Efficacité de la décontamination

Dans les élevages récidivistes, la présence de génome de virus RHDV-2 était détectable avant décontamination selon les élevages aux niveaux du bac d'équarrissage, du sol de la salle d'élevage ou du sas sanitaire, du circuit d'aération du bâtiment et du système d'évacuation des déjections (Tableau 1). Après décontamination, aucune trace résiduelle de génome viral n'a été retrouvée dans deux élevages. Dans trois élevages, des prélèvements positifs vis-à-vis du génome de RHDV-2 ont été obtenus dans le bac d'équarrissage insuffisamment décontaminé. Dans deux élevages, le génome viral était détectable

au niveau du système d'évacuation des déjections, encore souillé par des matières fécales. Enfin, des traces résiduelles de virus ont été détectées dans le circuit d'air qui était déjà positif avant décontamination dans un élevage. L'ensemble de ces observations viennent confirmer celles précédemment réalisées après la décontamination d'élevages atteints de VHD, à savoir la persistance de traces de virus jusqu'à six mois après désinfection au niveau du bac d'équarrissage (Huneau-Salaün et al., 2021). L'analyse des protocoles de décontamination mis en œuvre permettra d'identifier d'éventuels points d'amélioration.

Tableau 1 : Détection de génome de RHDV2 dans des élevages atteints de VHD avant et après nettoyage et désinfection N&D (6 élevages)

	Négatif	Positif	Zone positive
Cas-1	14	5	
avant N&D	4	5	sol bâtiment et sas, racleur, bac équarrissage
après N&D	10	0	
Cas-2	15	5	
avant N&D	5	4	admission air, sol de la salle, racleur et bac
après N&D	10	1	bac équarrissage
Cas-3	9	1	
après N&D	9	1	racleur
Cas-4	20	2	
avant N&D	9	1	bac équarrissage
après N&D	11	1	bac équarrissage
Cas-5	12	8	
avant N&D	4	5	filet brise-vent, sol élevage et sas, bac
après N&D	8	3	brasseur d'air, abords sortie fumier, bac
Cas-6	19	3	
avant N&D	8	3	sol élevage, congélateur, bac équarrissage
après N&D	11	0	

1.3. Qualité de la vaccination

Les bilans sérologiques sont disponibles dans quatre élevages récidivistes et deux élevages témoins. Des taux d'anticorps anti-RHDV-2 élevés et homogènes ont été observés dans quatre élevages (trois récidivistes et un témoin), montrant une couverture vaccinale satisfaisante. Dans deux élevages (un récidiviste et un témoin), deux lapines sur 14 ne présentaient pas d'anticorps détectables. Il s'agissait dans les deux cas de femelles en première mise-bas, qui n'ont jamais eu de rappel vaccinal après le schéma initial d'immunisation. L'absence d'anticorps pourrait s'expliquer par un défaut de vaccination initiale. Ces

premiers résultats suggèrent que la vaccination initiale n'est peut-être pas totalement maîtrisée dans certains élevages.

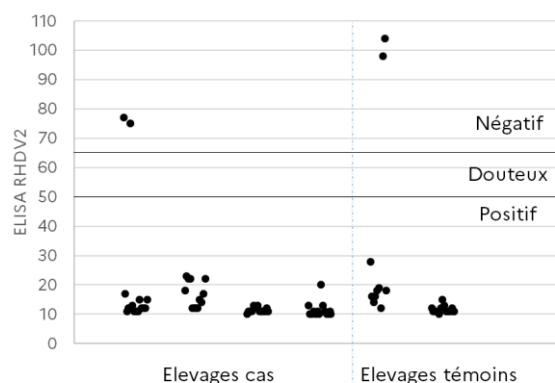


Figure 1 : Dosages d'anticorps totaux anti-RHDV-2 des femelles reproductrices vaccinées contre la VHD dans quatre élevages à récurrence de VHD et deux élevages sans récurrence (témoins) – les résultats sont exprimés en %E/N, selon une méthode adaptée kit ELISA VHD2 (Code 78751) du laboratoire IZLER (OIE)

1.4. Excrétion virale chez les femelles vaccinées

Aucune excrétion virale n'a été détectée sur les femelles dans cinq élevages récidivistes et les deux élevages témoins. Dans le dernier élevage en récurrence, une excrétion virale a été détectée sur 7 des 14 femelles prélevées au moment du foyer de VHD (1^{ère} visite) ; les lapines excrétrices (quatre en première mise-bas, trois multipares) étaient toutes vaccinées et ne présentaient aucun signe clinique de VHD. Elles avaient été transférées trois semaines plus tôt de la salle d'engraissement infectée vers une nouvelle salle (élevage mené en tout plein – tout vide). Afin de vérifier l'éventualité d'une persistance de l'excrétion, une série de prélèvements a été réalisée trois semaines après, sur d'autres femelles de la même bande. Ils ont montré que deux animaux sur vingt, des femelles en troisième mise-bas, excrétaient du génome viral alors qu'aucun signe de VHD n'était rapporté en maternité ou en engraissement (non vacciné). Une nouvelle série de prélèvements, sur les mêmes femelles que la deuxième série, a montré l'absence d'excrétion un mois plus tard.

La détection de génome viral sur les écouvillons ne signifie pas nécessairement l'excrétion de virus infectieux. Cependant, les observations dans cet élevage montrent que des femelles vaccinées et sans symptôme peuvent produire des fèces potentiellement infectantes, alors qu'elles sont hébergées dans une autre salle que les lapins malades. L'infection transitoire des femelles pourrait être liée à une exposition à la même source de virus que les lapins malades ou à un défaut de biosécurité entre les deux stades de production. Elle pourrait mener à l'exposition des lapereaux sous la mère à des fèces

infectantes. Bien que cette situation soit peu courante dans les élevages suivis, les prélèvements par écouvillonnage rectal vont être poursuivis dans l'enquête pour tenter de l'objectiver.

2. L'analyse phylogénétique des virus RHDV2

2.1. Méthodologie

Pour chaque échantillon de foie, les ARN totaux sont extraits à partir de 100 µL d'exsudat comme décrit précédemment. Une partie du génome viral (2387 pb) incluant le gène codant la protéine de capside VP60 est amplifié par RT-PCR à l'aide de deux amorces spécifiques des lagovirus pathogènes et non pathogènes et du kit SuperScript™ III One-Step Platinum Taq HiFi (Invitrogen). L'ADN purifié et quantifié des produits PCR est séquencé comme décrit dans Le Gall-Reculé et al. (2017). Les séquences du gène VP60 obtenues sont alignées avec celles des RHDV et RHDV2 français obtenues à l'Anses depuis l'apparition de la VHD (virus issus de la faune sauvage et d'élevages cunicoles). Les relations phylogéniques entre les séquences sont estimées à l'aide de la méthode de Neighbor-Joining avec le logiciel MEGA 5.05.

2.2. Introductions multiples de virus sur plusieurs années

L'analyse phylogénique des souches de RHDV2 de trois élevages en récurrence montre que les virus isolés ne diffèrent pas de ceux retrouvés dans d'autres élevages ou dans la faune sauvage. Ce résultat confirme l'absence d'une lignée de RHDV2 spécifique aux élevages en récurrence.

Les analyses phylogéniques montrent aussi que les séquences des RHDV2 isolés lors des différents foyers qui ont eu lieu entre 2019 et 2021 pour les deux élevages qui ont pu être analysés sont toutes différentes. Pour un élevage, hormis deux séquences très proches correspondant à des virus récoltés en 2021 à deux mois d'intervalle et dans deux bâtiments différents, les séquences des virus récoltés début et fin 2019 se placent dans deux autres groupes génétiques révélant des liens de parentés distants entre les virus. Pour le second élevage, même si les deux RHDV2 analysés présentent une parenté génétique relativement proche, la séquence du virus récolté près de trois ans avant le foyer de début 2022 est différente. Ainsi pour ces deux élevages, les foyers de VHD qui se sont succédés pendant trois ans sont tous dus à de nouvelles introductions virales.

Perspectives sur la suite du projet

Les premiers résultats obtenus montrent l'importance d'un programme de décontamination complet pour la gestion des foyers de VHD dans les élevages récidivistes. Des défauts de maîtrise de la vaccination et la potentielle excrétion de virus par des femelles sans signe clinique de VHD pourraient avoir un effet

sur le risque de récurrence. Ces aspects vont être approfondis par le suivi de nouveaux élevages récidivistes et non récidivistes durant 2023. De même, les premières conclusions concernant les introductions successives de différents virus au sein des élevages récidivistes seront étayées par l'analyse de virus issus du suivi de ces nouveaux élevages.

Remerciements

Les auteurs remercient les éleveurs, les groupements cunicoles, les vétérinaires de la SNGTV et les laboratoires d'analyses vétérinaires qui ont fournis les échantillons de foie de lapins d'élevage étudiés (Labofarm, Labovet-conseil), le laboratoire Inovalys-Angers pour l'envoi des échantillons de foie de lapins de garenne et de lièvres pour lesquels le RHDV2 a été diagnostiqué, l'Office Français de la Biodiversité (OFB) qui contribue au financement des travaux de suivi de l'évolution génétique des lagovirus de la faune sauvage (convention de recherche OFB/Anses CNV-REC-2019-06). Le projet SURVRECI est financé par le CASDAR dans le cadre de la convention n° 09 21 005056 relative au programme d'expérimentation ou d'élaboration de méthodes et d'outils d'aide à la décision.

Références

- Le Gall-Reculé G., et al., 2011. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet. Rec.* 168: 137-138.
- Le Gall-Reculé G., et al., 2017. Large-scale lagovirus disease outbreaks in European brown hares (*Lepus europaeus*) in France caused by RHDV2 strains spatially shared with rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Res.*, 48:70.
- Huneau-Salaün A., et al., 2022. Etudes épidémiologiques rétrospectives sur la maladie hémorragique virale RHDV-2 dans les élevages cunicoles en France entre 2013 et 2018. *Journées de la recherche cynicole*.
- Huneau-Salaün A., et al., 2022. Bilan de la surveillance de la maladie hémorragique virale du lapin dans les élevages cunicoles en France depuis la création d'un réseau de surveillance en 2018. *Bulletin épidémiologique Santé-alimentation*, 95-01, 2022.
- Huneau-Salaün et al., 2021. Evaluation of cleaning and disinfection procedures in rabbit farms affected by rabbit haemorrhagic disease, in France. In 12th World Rabbit Congress, November 3-5, Nantes, France. C 23.
- Rossel et al., 2019. Myxomatosis and Rabbit Hemorrhagic Disease: a 30-year study of the occurrence on commercial farms in Spain. *Animals*, 9, 780, doi:10.3390/ani9100780.