

Note d'information



SOMMAIRE

Rubrique	Page (s)
1- Quelles sont les missions du LNR « Maladies réglementées des poissons » ?	2
2- Quelles personnes contacter ?	2
3- Quels sont les virus qu'il est possible de rechercher ?	3
4- Quels sont les types d'analyses effectuées ?	4 à 5
5- Quelles consignes respecter pour le prélèvement et l'envoi des échantillons ?	6 à 11
6- Vous cherchez un partenaire pour mener des actions de recherche ?	12

Note d'information

1- Quelles sont les missions du LNR « Maladies réglementées des poissons » ?

- Confirmer les résultats positifs obtenus par les laboratoires agréés, identifier l'agent pathogène en cause, conserver des isolats des virus identifiés ;
- Effectuer certains diagnostics spécialisés non réalisés par les laboratoires agréés ;
- Coordonner les méthodes de diagnostic et l'utilisation des réactifs ;
- Organiser périodiquement des Essais Inter-Laboratoires d'Aptitude (EILA) et contrôler la qualité des réactifs utilisés, apporter un soutien technique aux laboratoires agréés ;
- Apporter un appui scientifique à la DGAL ou à l'Agence sur des points particuliers (révisions du manuel de diagnostic et du code de l'OIE pour les animaux aquatiques, saisines, ...) ;
- Coopérer avec le Laboratoire de Référence de l'Union Européenne (LR-UE) en pathologie des poissons.

2- Quelles personnes contacter au sein du LNR ?

Pour toute demande d'analyse ou d'information, merci de contacter, en fonction de vos besoins / questions, la responsable du LNR ou les référentes sectorielles :

Responsable LNR:
Lénaïg LOUBOUTIN
Lenaig.LOUBOUTIN@anses.fr
Tel : 02 98 22 47 20
Adjointe Resp. LNR : Joëlle CABON

Virologie / Séroneutralisation :
Référente : **Joëlle CABON**
Joelle.CABON@anses.fr



Biologie moléculaire :
Référente : **Marine BAUD**
Marine.BAUD@anses.fr

@ : pour les contacts par e-mail, merci d'adresser systématiquement vos messages à ces trois interlocutrices afin de garantir un traitement optimal de vos demandes.

Note d'information

3- Quels sont les virus qu'il est possible de rechercher ?

↪ Les virus non-exotiques listés dans la Directive Européenne 2006/88/EC :

Virus	Espèces concernées
<p>SHV : Virus de la Septicémie Hémorragique Virale <i>[Rhabdovirus]</i></p>	<p>Salmonidés et autres familles</p> 
<p>NHI : Virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse <i>[Rhabdovirus]</i></p>	<p>Salmonidés principalement</p>
<p>KHV (CyHV3): Herpèsvirus de la carpe Koï <i>[Herpèsvirus]</i></p>	<p>Carpes communes et carpes Koï</p> 
<p>AIS : Virus de l'Anémie Infectieuse du Saumon (génotype délété dans la région hautement polymorphique (RHP)) <i>[Orthomyxovirus]</i></p>	<p>Saumons de l'Atlantique</p>

↪ Un virus exotique listé dans la Directive Européenne

Il s'agit de l'**EHN**V (Virus de la Nécrose Hématopoïétique Epizootique).

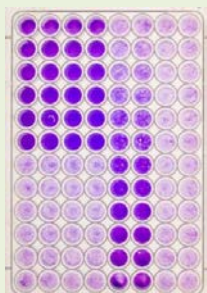

↪ Des virus non-listés connus ou émergents ayant une incidence économique potentielle en élevage, mais non concernés par la réglementation. Il s'agit essentiellement des Nodavirus, du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI), de Togavirus (Alphavirus de la Maladie du Sommeil (MS) et de la Maladie du Pancréas (MP)), de rhabdovirus (Virémie Printanière de la Carpe, rhabdovirus de Perche, ...), du virus de l'Œdème de la Carpe (CEV), d'Iridovirus ou encore d'Herpes Virus...



Note d'information

4- Quels sont les types d'analyses effectuées ?

Le LNR est **accrédité par le COFRAC sous le numéro 1-2251** (portée disponible sur www.cofrac.fr) selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour un certain nombre d'analyse virologiques et sérologiques du guide technique d'accréditation LAB GTA 32 « Essais et Analyses en Virologie Animale » :

	Nature de l'analyse
	Recherche d'anticorps contre la Septicémie Hémorragique Virale (SHV) des Salmonidés par la technique de neutralisation virale
	Recherche d'anticorps contre la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (NHI) des Salmonidés par la technique de neutralisation virale
	Recherche d'anticorps contre le virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (NPI) des poissons par une technique de séroneutralisation virale
	Recherche d'anticorps contre le virus de la maladie du sommeil (VMS) des poissons par une technique de séroneutralisation virale
	Isolement du virus de la NHI sur culture cellulaire et identification par séroneutralisation
	Isolement du virus de la SHV sur culture cellulaire et identification par séroneutralisation
	Isolement du virus de la NPI sur culture cellulaire et identification par séroneutralisation
	Identification du virus de la NHI par immunofluorescence indirecte sur cultures cellulaires
	Identification du virus de la SHV par immunofluorescence indirecte sur cultures cellulaires
	Isolement et identification par immunofluorescence indirecte du virus de l'encéphalopathie et rétinopathie virale des poissons marins (Nodavirus)

Il réalise également des analyses **hors-accréditation**, en **virologie cellulaire** (Eel European Virus X (EVEX), ENHV, Virus de la Virémie Printanière de la Carpe (VPC), Rhabdovirus de Perche, ...), **biologie moléculaire** (PCR et/ou qPCR vSHV, vNHI, vNPI, Nodavirus, CyHV₁₋₂₋₃, CEV, ...) **et sérologie** (recherche d'anticorps anti-CyHV3, ...). **Pour toute demande spécifique, merci de nous contacter.**

Pour la recherche des virus SHV, NHI et NPI par virologie cellulaire, le LNR tient à votre disposition la liste des laboratoires départementaux agréés par l'Etat.

Les **tarifs** des analyses pratiquées sont disponibles sur demande ou accessibles en ligne à l'adresse suivante : <http://www.anses.fr/fr/content/tarif-des-prestations-de-lanses>.

Note d'information

5- Quelles consignes respecter pour le prélèvement et l'envoi des échantillons ?

① Identifier le type d'analyse qui répond à votre objectif

↳ Diagnostic (espèce ?, quels symptômes ?, eau à quelle température ?, ...), surveillance,

Vous pouvez vous aider si nécessaire du poster présenté page suivante qui vous donne un aperçu des pathologies virales connues chez les poissons.

② Prévenir le LNR de votre souhait d'envoyer des échantillons pour analyse

↳ cf contact dans la rubrique « Quelles personnes contacter ? »

Le LNR peut vous conseiller sur le choix de la ou des analyses les plus appropriées à votre contexte.

③ Procéder à la préparation des échantillons :

- Déterminer la nature des échantillons, qui est fonction de l'analyse demandée

↳ **Doc A** page 7

- Respecter Les consignes de préparation

↳ **Doc B** page 8


④ Renseigner la fiche de demande d'analyse

↳ **Doc C** page 10


























⑤ Envoyer les échantillons avec la fiche de demande d'analyse au LNR à l'adresse ci-dessous :

ANSES, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané
Unité Pathologie Virale des Poissons
A l'attention de Mme J. CABON ou Mme L. LOUBOUTIN
Technopôle Brest Iroise
Site Ifremer
CS 10070
29 280 Plouzané

Note d'information



Principaux virus pathogènes chez les poissons d'élevage en Europe

Virus et Maladies	Principales espèces sensibles naturellement	Symptômes, lésions et températures	Détection (Anses)
Rhabdoviridae 			
Novirhabdovirus • SHV  Septicémie hémorragique virale • NHV  Nécrose hématopoïétique infectieuse	- Truite (Arc-en-ciel et fario) - Turbot - Corégone - Brochet - Omble - Black bass	< 15° C - Mélanisme - Exophtalmie - Anémie - Hémorragies - Ascite - Symptômes nerveux - Nécrose hématopoïétique (rein,rate)	- IF  - Séronéutralisation - PCR  (SHV, NHV)
Vesiculovirus • VPC-PPR  Virémie printanière de la carpe Maladie rouge de l'alevin de brochet Rhabdovirose de la perche	- Truite arc-en-ciel - Saumon - Carpe - Brochet - Silure - Perche	Optimum de 8-12° C 11-15° C	
Birnaviridae 			
Aquabirnavirus • NPI  Nécrose pancréatique infectieuse	- Salmonidés essentiellement - Turbot - Maigre	5-14° C 18° C - Nage en vrille - Mélanisme - Apathie - Renflement abdominal - Entérite - Nécrose du pancréas exocrine - Atteinte du tissu excréteur - Apathie - Hémorragies - Nécrose du tissu hématopoïétique	- Effet cytopathique  - Séronéutralisation
Iridoviridae 			
Lymphocystivirus • Maladie lymphocystique	- Daurade - Poissons d'aquarium - Poisson-chat	10-30° C 18-20° C	- IFAT  - PCR  (+)
Ranavirus • Iridovirose	- Turbot	- Inappétence - Mélanisme - Nage anormale	
Nodaviridae 			
Betanodavirus • VER ou VNN  Encéphalopathie et Rétinopathie virale	- Bar - Turbot - Ombrine - Daurade - Sole - Flétan - Mérou - Certains poissons d'aquarium	- Signes nerveux - Inappétence - Nage anormale - Perte d'équilibre - Lésions nerveuses (vacuolisation de la substance grise)	- IF  Optimum de 6-30° C
Togaviridae 			
Alphavirus • MS  Maladie du sommeil • MP  Maladie du pancréas	- Truite arc-en-ciel - Saumon atlantique - Truite fario	- Poissons couchés sur les flancs au fond des bassins - Inappétence - Apathie - Nécrose du pancréas exocrine - Lésions cardiaques et musculaires	- IF  6-15° C - PCR 
Orthomyxoviridae 			
Isavirus • AIS  Anémie infectieuse du saumon	- Saumon atlantique	- Anémie sévère - Exophtalmie - Ascite - Pétéchies dans la graisse abdominale - Congestion du foie et de la rate - Foie de couleur très sombre	- IF  3 à 12° C
Herpesviridae 			
• KHV  Herpesvirose de la carpe Koï	- Carpe Koï et Carpe commune	- Décoloration de la peau - Léthargie - Perte d'équilibre - Hypertrophie et hypersécrétion de mucus dans l'épithélium branchial	- Effet cytopathique  22 à 28° C - PCR 

ANSES Technopôle Brest-Iroise - BP 70 - 29280 Plouzané - Tél. 02 98 22 44 62 - Fax 02 98 05 51 65

Note d'information

Doc A. Nature des échantillons en fonction de l'analyse demandée.

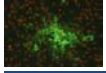
Nature des prélèvements	Virus à rechercher	Nodavirus	Herpesvirus (KHV)
	SHV, NHI autres rhabdovirus (perche, brochet, carpe (VPC), ...) Birnavirus (NPI) Togavirus (Maladie du Sommeil – Maladie du Pancréas) Herpèravirus (CyHV1, CyHV2) Autres virus (Iridovirus, Orthomyxovirus, reovirus...)		
Oeufs	Entre 20 (Salmonidés et espèces à gros œufs) et environ 200 œufs (poissons marins et espèces à petits œufs)	idem	idem
Larves	Environ 200	idem	idem
Alevins vésiculés	Une vingtaine	idem	idem
Poissons de taille inférieure à 5 cm	- Préparer un échantillon de 10 poissons* - Couper la partie en arrière de l'anus et enlever la masse musculaire située au-dessus de la ligne latérale	un échantillon de 10 têtes	Rein et branchies : regroupement d'organes de 2 poissons au maximum par lot
Poissons de taille supérieure à 5 cm	- Préparer un échantillon à partir de 10 poissons* : rein antérieur, rate, cœur, encéphale (ne prendre qu'un fragment de ces organes chez les grands poissons, de façon à avoir un échantillon d'environ 1 g) - Autres organes pouvant être prélevés selon le virus recherché : caeca pyloriques pour Togavirus, branchies pour Herpesvirus, ...	un échantillon constitué de 10 encéphales et 10 yeux	Rein et branchies : regroupement d'organes de 2 poissons au maximum par lot
Produits génitaux	Préparer un échantillon à partir des produits génitaux de 10 poissons* (environ 5 à 10 ml)	idem	idem
Sang / sérums / plasmas	Prélèvement individuel, généralement à minima 30 individus	idem	idem

* Les analyses peuvent être réalisées, à la demande du client, sur moins de 10 poissons, voire même un seul.

Note d'information

Doc B. Consigne pour la préparation et l'expédition des échantillons

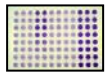
(Décision 2015/1554)



Echantillons d'organes pour recherche de virus en culture cellulaire :

- ↪ Prélèvements des organes (rate, rein antérieur, et cœur ou encéphale) à l'aide d'instruments à dissection stériles
- ↪ Organes placés dans des tubes ou piluliers stériles (pool d'organes possible ; se référer au Doc A et prévoir environ 1 g d'organes par pool)
- ↪ Les tubes ou piluliers contenant les organes sont placés dans des containers étanches (boîtes en polystyrène par exemple) et entourés de glace ou de réfrigérants permettant de maintenir une température n'excédant pas 10° C pendant le transport.
- ↪ Chaque échantillon doit être individualisé (N° de bac, N° de référence, code ...) et accompagné si possible **d'une fiche de demande d'analyse** (cf. modèle joint à titre d'exemple).
- ↪ Les échantillons pour analyse virologique doivent parvenir au laboratoire le plus rapidement possible afin que cette analyse puisse démarrer moins de 48 h après la date des prélèvements (la mort du poisson servant de T₀ sauf en cas de suspicion de foyer). Dans certains cas, exceptionnels, et à condition que les échantillons soient maintenus à une température n'excédant pas 10° C, l'analyse pourra être débutée au plus tard 72 h après la date de prélèvement.

NB : Les textes réglementaires prévoient l'expédition des échantillons d'organes dans du milieu de culture contenant du sérum de veau et des antibiotiques. Cependant, l'expérience a montré que le transport des organes « à sec » donnait des résultats équivalents à ceux obtenus avec les organes transportés en milieu liquide. Par conséquent, les deux modes de prélèvements sont acceptés.



Echantillons de sang pour recherche d'anticorps par méthodes sérologiques :

- ↪ S'ils ne peuvent pas être déposés directement au laboratoire, l'expédition de sang total est à éviter en raison du risque très fort d'hémolyse.

L'idéal est d'envoyer des échantillons de plasma (prise de sang sur tubes héparinés) ou de sérum (prise de sang sur tube sec), conservés durant le transport à 5°C ±3°C.



Echantillons d'organes pour recherche de génome viral par PCR ou RT-PCR :

- ↪ Idem à l'analyse en culture cellulaire, sauf pour la conservation :
 - l'échantillon peut être éventuellement congelé plusieurs semaines. Dans ce cas, des précautions doivent être prises lors de l'expédition pour maintenir le statut congelé jusqu'à la livraison au LNR (température maximale tolérée de 4°C).
 - Si l'échantillon est envoyé frais, prendre les mêmes précautions que pour l'envoi pour recherche de virus en culture cellulaire.
 - Dans certains cas, l'échantillon peut être conservé à T° ambiante, idéalement dans du RNA later, voire dans l'alcool très pur (>96%). Les délais de stockage avant analyse sont alors d'une semaine maximum à 25°C, un mois à 4°C et sans limite à -20°C.

NB : seuls les échantillons frais (ou congelés dans le cas d'une recherche de nodavirus) pourront également être traités en culture cellulaire.

Note d'information



Acides nucléiques pour recherche de génome viral par PCR ou RT-PCR :

- Les acides nucléiques, ADN et ARN, doivent être stockés, expédiés et réceptionnés congelés. Exceptionnellement, l'ADN peut être expédié à 4°C s'il est de qualité suffisante (intégrité et pureté) et si la livraison se fait sous 48-72h.

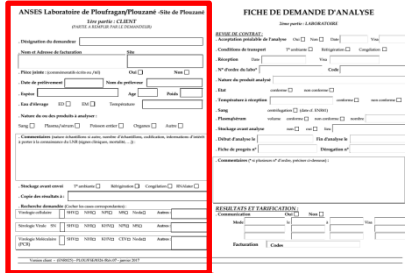
Tout prélèvement non conforme pourra être refusé

Les principaux critères de refus sont les suivants :

- Les produits reçus :
 - n'ont pas été échantillonnés dans les conditions définies dans la directive 2015/1554, notamment en ce qui concerne les températures d'eau ;
 - ne sont pas conformes aux indications des commémoratifs (indications erronées des organes ou de l'espèce) ;
 - se trouvent dans des récipients de transport cassés ou ouverts ;
 - sont altérés (liquéfaction, odeurs,...) ;
 - ne sont pas individualisés ;
 - ont été prélevés plus de 48 h avant le début de l'analyse à compter de la mort du poisson (exceptionnellement 72 h s'ils ont été conservés à une température $\leq 10^{\circ}\text{C}$) ;
 - n'ont pas été conservés conformément aux recommandations émises (ex : congélation pour recherche de virus par culture cellulaire) ;
 - sont hémolysés ou coagulés (sérum ou plasmas).
- Il n'y a pas eu d'accord préalable du LNR sur la faisabilité de la demande d'analyse(s).

Note d'information

Doc C. Modèle de fiche de demande d'analyse.



ANSES Laboratoire de Ploufragan/Plouzané -Site de Plouzané

1ère partie : CLIENT
 (PARTIE À REMPLIR PAR LE DEMANDEUR)

. Désignation du demandeur

. Nom et Adresse de facturation Site

. Pièce jointe : (commémoratifs écrits ou /tél) Oui Non

. Date de prélèvement Nom du préleveur

. Espèce Age Poids

. Eau d'élevage ED EM Température

. Nature du ou des produits à analyser :

Sang Plasma/sérum Poisson entier Organes Autre

. Commentaires (nature échantillons si autre, nombre d'échantillons, codification, informations d'intérêt à porter à la connaissance du LNR (signes cliniques, mortalité, ...)) :

. Stockage avant envoi T° ambiante Réfrigération Congélation RNAlater

. Copie des résultats à :

. Recherche demandée (Cocher les cases correspondantes) :

Virologie cellulaire SHV NHI NPI MS Noda Autres :

Sérologie Virale SN SHV NHI KHV NPI MS Autres :

Virologie Moléculaire (PCR) SHV NHI KHV CEV Noda Autres :

Merci de donner le maximum de précisions et de joindre des éventuels commératifs

Préciser votre demande en cochant la ou les cases souhaitées

Note d'information

6- Vous cherchez un partenaire pour mener des actions de recherche ?

L'Unité Pathologie Virale des Poissons, en complément de son mandat de LNR, développe des activités de recherche axées sur la santé du poisson au travers de deux thématiques principales : les virus piscicoles et l'immuno-écotoxicologie.

L'unité est agréée pour la réalisation d'expériences sur poissons sous le numéro C 29-212-3 et gère un élevage de truites arc en ciel indemnes de pathologies virales.

En complément de ses 1300m² de laboratoires, elle dispose de 7 salles d'élevages confinées et 8 bassins extérieurs de 15m³ et peut réaliser des contaminations biologiques ou chimiques en conditions contrôlées. Les protocoles expérimentaux sont systématiquement soumis à un comité d'éthique Ad Hoc.

N'hésitez pas à nous solliciter...

