

**NOTE DE SYNTHESE
DES RESULTATS OBTENUS
CONCERNANT L'ETUDE DU VIRUS DE TYPE HERPES
ET LA MISE AU POINT DE METHODES DE
DIAGNOSTIC DE L'INFECTION**

AVRIL-MAI 1996

**T. RENAULT
C. LIPART
R.M. LE DEUFF
B. CHOLLET
P. HAFFNER**

IFREMER
Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
B.P. 133 - 17390 La Tremblade



IFREMER

Cette note de synthèse des travaux réalisés au laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie de la station IFREMER de La Tremblade dans le cadre de l'étude du virus de type herpès et de la mise au point de méthodes de diagnostic fait suite à la précédente note du 16 avril 1996. Les résultats obtenus concernant les analyses protocolaires et hors protocoles, ainsi que les résultats expérimentaux déjà disponibles sont donnés et commentés en sept points.

1- Analyses Pays de Loire

2 - Bilan des analyses réalisées dans le cadre du protocole IFREMER BOUIN/IFREMER ARGENTON/SODABO

3 - Bilan global des analyses Pays de Loire et Bouin-Argenton-SODABO

4 - Analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès sur des lots prélevés en 1996, dans le cadre de la veille zoosanitaire

5 - Essais d'amélioration du protocole de PCR

6 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie

7 - Formation

1 - Analyses Pays de Loire

Dans le cadre du protocole établi entre le SMIDAP et l'IFREMER, le bilan des analyses réalisées dans le cadre de la recherche du virus de type herpès par PCR a été réalisé lors d'une réunion réunissant monsieur le Président SAUDRAY, messieurs PAJOT, GLIZE, TRINTIGNAC et Melle LIPART pour le SMIDAP ainsi que M. RENAULT et Melle LE DEUFF pour l'IFREMER.

Le bilan des analyses réalisées dans le cadre du protocole, figure dans le tableau n°1. Le détail de ce tableau est présenté en annexe.

Tableau n°1

Pontes	Nombre de prélèvements larves	Nombre de prélèvements naissains	Observations	Résultats PCR
F :				
A	3	1 (x5 tubes)	ponte éliminée	négatif
B	5		ponte protocolaire	négatif
C	3	2 (x5 tubes)	ponte retirée	négatif
D	4	2 (x5 tubes)	ponte retirée (<u>mortalité</u>)	négatif
E	3		ponte éliminée	négatif
F	3	4 (x5 tubes)	ponte protocolaire	négatif
G	4		ponte protocolaire	négatif
H	2	1 (x5 tubes)	hors protocole	négatif
I	2		hors protocole(<u>mortalité</u>)	négatif
J	2		hors protocole	négatif
K	2		hors protocole	négatif
S :				
I'	3	2 (x5 tubes)	ponte protocolaire	négatif
II	3	2 (x5 tubes)	ponte protocolaire	négatif
III	3	3 (x5 tubes)	ponte éliminée (<u>mortalité</u>)	1 positif sur 5 tubes, lors du prélèvement à 850 µm
IV	3	2 (x5 tubes)	ponte protocolaire (<u>mortalité</u> à 850 µm)	négatif
V	3	2 (x5 tubes)	ponte retirée	négatif
VI	3		ponte protocolaire	négatif
Total analyses	Larves : 51 prélèvements 51 tubes PCR	Naissains : 21 prélèvements 105 tubes PCR		Positif : 1 Négatifs : 156

Restent dans le protocole, 3 pontes F (B, F, G) et 4 pontes S (I', II, IV, VI).

Ce tableau fait ressortir plusieurs points importants :

- Sur 12 pontes réalisées dans le cadre du protocole SMIDAP/IFREMER, seules 7 sont conservées à l'heure actuelle. Le retrait ou l'élimination des pontes, n'est pas le fait d'une suspicion d'herpès pour 4 d'entre elles, seule la S III a été éliminée suite à une analyse positive.
- Sur l'ensemble des analyses réalisées (157), un seul prélèvement (lié à des mortalités) a été trouvé positif en PCR pour la recherche d'herpès.
- Toutes les analyses hors mortalités sont négatives en PCR.
- Sur 4 cas de mortalité, 3 sont négatifs en PCR pour la recherche du virus de type herpès, 1 est positif.
- La ponte S III ayant subi des mortalités et étant positive en PCR, ne l'a été que sur 1 tube sur 5 et les analyses antérieures réalisées sur cette ponte étaient négatives.

L'analyse de ces résultats et la discussion qui a suivi leur présentation a amené, les conclusions suivantes :

- L'analyse systématique de prélèvements hors mortalités ne permet pas actuellement de détecter la présence de virus à l'état latent, avec le protocole d'analyse utilisé.
- La poursuite de ce type d'analyses systématiques avec ce protocole semble inadaptée.
- Les objectifs immédiats s'orientent vers la mise au point d'une technique PCR plus sensible, en utilisant des lots particuliers.
- Lorsque la technique sera au point, il sera procédé à l'analyse des échantillons antérieurs aux mortalités.

Conclusion :

- Les analyses du protocole ne seront pas réalisées hors mortalités, mais les prélèvements seront réalisés et archivés, jusqu'à l'obtention d'une sensibilité plus grande de la technique.
- La priorité est donnée à l'amélioration de la sensibilité de la technique PCR.

**2 - Bilan des analyses réalisées dans le cadre du protocole
IFREMER BOUIN/IFREMER ARGENTON/SODABO**

Ce protocole a été mis en place dans l'optique de l'étude des conditions susceptibles d'induire des mortalités chez les huîtres au stade naissain et d'étudier l'expression associée du virus de type herpès.

Dans cette optique des géniteurs de trois origines différentes ont été testés : Arcachon, Angleterre et Marennes.

Ces géniteurs ont été conditionnés à la station IFREMER de BOUIN. Pour chaque origine une partie des animaux a été conditionné avant maturation, à chaud et l'autre partie à froid.

Une fois à maturation les pontes ont été réalisées, soit à l'IFREMER ARGENTON, soit à la SODABO (BOUIN). Les pontes sont désignées par l'origine et les conditions d'élevage des géniteurs.

ARGENTON (pontes réalisées en double)

Arcachon chaud/froid
Angleterre chaud/froid
Marennes chaud/froid

SODABO

Arcachon chaud/froid
Angleterre chaud/froid
Marennes chaud/froid

Pour les pontes d'ARGENTON, 12 analyses ont été réalisées (une sur chaque ponte à J10).

Pour les pontes de la SODABO, 11 analyses ont été réalisées (car la ponte Arcachon froid était en quantité trop faible), à J10 et J20. Parmi ces pontes la "Marennes froide" a présenté un peu de mortalité.

Comme le montre le tableau de résultats n°2, toutes les analyses sont négatives y compris pour la ponte présentant des mortalités.

Tableau n°2

Sites	Nombre d'analyses larves	Observations	Résultats PCR
ARGENTON	12	RAS	tous négatifs
SODABO	11	1 lot à <u>mortalités</u> (MF)	tous négatifs
Total analyses	23		

Sur 23 analyses réalisées, 23 sont négatives, avec et sans mortalités.

3 - Bilan global des analyses Pays de Loire et Bouin-Argenton-SODABO

Analyses réalisées en PCR pour la recherche de la présence d'herpèsvirus dans les prélèvements de larves et de naissains réalisés dans le cadre des protocoles "Pays de Loire" et "IFREMER (Bouin-Argenton) - SODABO"

95 lots ont été analysés :

- 74 lots de larves (51 "Pays de Loire" + 23 "IFREMER-SODABO") ce qui représente 74 tubes de PCR
- 21 lots de naissains, ce qui représente 105 tubes de PCR (21 x5)

Soit un total d'analyses en PCR de 179 tubes.

Sur l'ensemble des 179 analyses, 6 lots présentent des mortalités. Pour 5 de ces lots les résultats en PCR sont négatifs, pour un lot il y a un tube positif sur les 5 analysés.

Tableau n°3

	Mortalités	Nombre de lots et origine	Résultats PCR
Larves	aucune	69 (47 "Pays de Loire" + 22 "IFREMER-SODABO")	tous négatifs
	importante	5 (4 "Pays de Loire" + 1 "IFREMER-SODABO")	tous négatifs
Naissains	aucune	18 "Pays de Loire"	tous négatifs
	importante	3 "Pays de Loire"	2 lots négatifs 1 lot positif (1tube sur 5)

A ces chiffres, s'ajoutent 30 analyses supplémentaires sur les naissains protocolaires devant être transférés début juin en Baie de Pen Bé. 5 pontes seront transférées, 6 pools de 5 animaux ont été réalisés pour chaque ponte et les résultats de la recherche par PCR du virus de type herpès sont négatifs.

Une fois mis en mer à Pen Bé, les prélèvements seront réalisés, tous les 15 jours, mais les analyses ne seront réalisées qu'en cas de mortalités. Le reste des prélèvements seront archivés (congelés), pour analyse ultérieure si besoin.

4 - Analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès sur des lots prélevés en 1996, dans le cadre de la veille zoosanitaire

1 - Analyses

Outre les analyses de lots "protoculaires" citées dans les paragraphes précédents, les analyses effectuées en PCR pour la recherche de virus de type herpès ont porté sur 20 lots d'animaux (larves et/ou naissain d'huître creuse, *Crassostrea gigas*, d'huître plate, *Ostrea edulis*, et d'huître américaine, *Crassostrea virginica*). L'ensemble des résultats de ces analyses est indiqué dans le tableau n°4.

De la même façon que lors des analyses "protoculaires", il apparaît ici que la présence du virus de type herpès n'est pas détectée, sauf cas particulier, par le protocole actuel de PCR, pour des lots d'animaux ne présentant pas de mortalités. Ces lots, au nombre de 13, sont décomposés comme suit :

- 3 lots de larves de *C. gigas* : 96R01, 96R29 et 96R56
- 5 lots de naissains (moins d'un an) de *C. gigas* : 96R07, 96R18, 96R31, 96R44 et 96R35
- 1 lot de *C. gigas* de plus d'un an : 96R32
- 2 lots de naissains (moins d'un an) d'*O. edulis* : 96R48A et 96R48B
- 1 lot d'*O. edulis* de plus d'un an : 96R30
- 1 lot de larves de *C. virginica* : 96R37

Néanmoins, il a été possible de détecter la présence du virus de type herpès dans le lot 96R41, qui ne présentait pas de mortalités au moment du prélèvement. Ce lot 96R41 est à comparer au lot 96R33. Il s'agit d'animaux provenant de la même ponte et séparés en deux lots d'élevage. Le lot 96R33, placé à 20-21°C a présenté des mortalités de 100% en moins de dix jours. Ces mortalités ont été associées à la détection du virus de type herpès par PCR. Le lot 96R41, élevé à 18-20°C ne présentait pas de mortalités au moment du prélèvement, mais a été sacrifié quelques jours après. La détection du virus sur quelques animaux de ce lot 96R41 semble correspondre à un début d'infection virale productive. En effet, la méthode de PCR ne permet pas actuellement de détecter chez le naissain des quantités d'ADN cible inférieures à 5.10^6 copies, ce qui correspond à une phase de multiplication virale productive.

Les autres lots analysés ont présenté des mortalités :

- Les lots pour lesquels la présence du virus de type herpès a été détectée en association avec des mortalités sont au nombre de 4 : 96R06, 96R16, 96R22 et 96R33.
- La présence du virus n'a pas été détectée sur le lot 96R47 qui présentait des mortalités. Les animaux mis à disposition pour ces analyses étaient dans un état de décomposition avancé, le résultat négatif n'est donc pas interprétable.
- La présence du virus n'a pas été détectée sur le lot 96R38 qui présentait des mortalités. Il semble que les mortalités observées sur ce lot aient une autre cause. En particulier, l'inoculation de parasite *Bonamia ostreae*, quelques jours avant les mortalités pourrait être mise en cause.

Tableau n°4

RESULTATS DE LA RECHERCHE DE VIRUS DE TYPE HERPES PAR PCR

N°échantillon	Origine Espèce	Date de prélèvement	Taille ou âge	Observations avant traitement	Résultats PCR
96 R 01	Écloserie <i>C. gigas</i>	17/01/96	Ponte du 10/01/96	Pas de mortalités 50 mg de larves analysées : un tube de PCR	Négatif (1)
96 R 06	Écloserie <i>C. gigas</i>	02/96	1 cm	Expérience réalisée à l'URPIG : animaux placés à haute température, mortalités anormales 65 animaux analysés : 14 pools de 3 à 6 animaux morts	3 positifs (dont un lot d'animaux pourris) 11 négatifs (dont 6 lots d'animaux pourris). animaux sacrifiés en mars 96
96 R 07	Même lot que 96R06 écloserie <i>C. gigas</i>	02/96	1 cm	Expérience réalisée à l'URPIG : animaux placés en élevage à basse température (témoin de 96R6), pas de mortalités anormales 45 animaux analysés : 9 pools de 5 animaux	Tous négatifs animaux sacrifiés en mars 96
96 R 16	Écloserie <i>C. gigas</i>	15/03/96	Environ 1 an	Mortalités 15 animaux analysés : 3 pool de 4 animaux mort et 1 pool de 3 animaux pourris	Tous positifs (2)
96 R 22	Même lot que 96R16 écloserie <i>C. gigas</i>	16 et 17/03/96	Environ 1 an	Mortalités 15 animaux analysés : 3 pool de 5 animaux morts	Tous positifs (2)
96 R 18	Captage naturel en Seudre, animaux élevés à Mornac (Charente Maritime) <i>C. gigas</i>	18/03/96	Captage en août 1995	Pas de mortalités Lot contrôlé dans la perspective de son utilisation dans des essais de pathologie expérimentale (expérience en cours à l'URPIG) 30 animaux analysés : 6 pools de 5 animaux	Tous négatifs (1)
96 R 29	Écloserie <i>C. gigas</i>	10/04/96	Larves	Pas de mortalités 50 mg de larves analysées : un tube de PCR	Négatif (1)
96 R 30	Écloserie <i>C. gigas</i>	17/04/96	Environ 2 ans	Pas de mortalités au moment du prélèvement Ce lot d'animaux a subi un épisode de mortalité importante (environ 80%) l'an dernier, les survivants ont été maintenus depuis en eau froide 100 animaux analysés : 20 pools de 5 animaux	Négatif (1)

N°échantillon	Origine	Espèce	Date de prélèvement	Taille ou âge	Observations avant traitement	Résultats PCR
96 R 31	Écloserie	<i>C. gigas</i>	17/04/96	Ponte en 09/95 T13-T15	Pas de mortalités animaux passés en mer en novembre 95 30 animaux analysés : 6 pools de 5 animaux	Tous négatifs (1)
96 R 44	Même lot que 96R31 écloserie	<i>C. gigas</i>	fin 04/96	Naissain	Présence d'animaux "baillants" 30 animaux analysés : 3 pools de 5 animaux baillants et 3 pools de 5 animaux fermés	Tous négatifs (3)
96 R 32	Écloserie	<i>O. edulis</i>	05/04/96	Un an et demi	Pas de mortalités 100 animaux analysés : 20 pools de 5 animaux	Tous négatifs (1)
96 R 33	Écloserie	<i>C. gigas</i>	16/04/96	Ponte du 02/10/95 environ 6mm	Animaux élevés à 20-21°C depuis 5 jours Mortalités 8,8% au moment du prélèvement mortalités d'environ 100% au cours de la semaine suivant le prélèvement 30 animaux analysés : 6 pool de 5 animaux	Tous positifs (2)
96 R 41	Même ponte que 96R33 écloserie	<i>C. gigas</i>	19/04/96	Ponte du 02/10/95 environ 6mm	Animaux élevés à 18-20°C Pas de mortalités au moment du prélèvement les animaux ont été sacrifiés quelques jours après le prélèvement 50 animaux analysés : 10 pools de 5 animaux	2 pools positifs 8 pools négatifs (2)
96 R 35	Écloserie	<i>C. gigas</i>	22/04/96	Ponte en 09/95 T6-T7	Pas de mortalités Animaux passés en mer en avril 96 30 animaux analysés : 6 pools de 5 animaux	Tous négatifs (1)
96 R 37	Écloserie	<i>C. virginica</i>	24/04/96	J2	Pas de mortalités 50 mg de larves analysées : un tube de PCR	Négatif (1)
96 R 38	Écloserie	<i>O. edulis</i>	12/04/96	Ponte en 95 4-5 cm	Mortalités apparues rapidement après l'inoculation de <i>Bonamia ostreae</i> purifiés 26 animaux morts analysés : 2 pools de 3 et 4 pools de 5 animaux	Tous négatifs (3)

N°échantillon	Origine	Espèce	Date de prélèvement	Taille ou âge	Observations avant traitement	Résultats PCR
96 R 47	Ecloserie	<i>O. edulis</i>	02/05/96	Naissain	Mortalités 7-15% 25 animaux analysés : 5 pools de 5 animaux pourris	Tous négatifs Les animaux analysés étant dans un état de décomposition avancé au moment du prélèvement, le résultat négatif est ici difficilement interprétable
96 R 48 A	Ecloserie	<i>O. edulis</i>	09/04/96	1500 µm	Pas de mortalités 30 animaux analysés en 2 tubes de PCR : 2 pools de 0.05g et 0.06g	Tous négatifs (1)
96 R 48 B	Même lot que 96R48A Ecloserie	<i>O. edulis</i>	22/04/96	T2	Pas de mortalités 30 animaux analysés sous forme de 6 tubes de PCR : 6 pools de 5 animaux	Tous négatifs (1)
96 R 56	Ecloserie	<i>C. gigas</i>	27/03/96	200 µm J26	Pas de mortalités Fixation glutaraldéhyde avant congélation 50 mg de larves analysées : un tube de PCR	Négatif Résultat non interprétable du fait de la fixation en glutaraldéhyde qui semble inhiber la réaction de PCR

(1) Les limites actuelles de la méthode de PCR ne permettent pas de détecter le virus sous sa forme latente. La non détection du virus de type herpès n'implique donc pas nécessairement l'absence de cet agent dans les échantillons analysés.

(2) Les herpesvirus présentent la particularité de pouvoir persister sous une forme latente pendant toute la vie de leur hôte. Les animaux éventuellement survivants dans un lot ayant subi des mortalités associées à la présence de virus de type herpès, ainsi que les animaux dans lesquels la présence de ce virus est détectée hors mortalité, sont considérés comme potentiellement porteurs asymptomatiques du virus. Ces animaux sont de ce fait susceptibles de développer une infection aiguë ultérieurement et/ou de transmettre le virus à leur descendance. **NOUS CONFIRMONS L'IMPORTANCE DE DETRUIRE LES EVENTUELS SURVIVANTS DE CE TYPE DE LOTS.**

(3) La méthode de PCR permet de détecter le virus de type herpès chez des animaux présentant une phase d'infection virale très active. De ce fait, les résultats négatifs obtenus pour des lots d'animaux présentant des mortalités indiquent que ces mortalités peuvent avoir une autre cause que l'infection à virus de type herpès.

5 - Essais d'amélioration du protocole de PCR

Différents essais sont en cours concernant l'amélioration éventuelle de la sensibilité de détection du virus de type herpès par PCR.

- Des essais d'extraction d'ADN ont été réalisés à partir de lots de naissains d'huître plate (*Ostrea edulis*) et d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) suspectés d'être porteurs asymptomatiques de virus de type herpès à l'état latent.

Les extractions ont été réalisées sur les lots 96R30 et 96R32 (paragraphe 4, tableau n°4). Pour chaque lot, les essais ont été conduits sur des échantillons de 100 animaux analysés par pools de 5 (soit 20 pools de 5 animaux par lot). Ces pools ont été traités par la méthode "classique" (dans laquelle le surnageant des broyats d'animaux est directement analysé en PCR) et par extraction d'ADN (dans laquelle l'ADN extrait des broyats est analysé en PCR).

Aucune réaction de PCR n'a pu permettre détecter le virus à l'état latent chez ces animaux.

- D'autres essais sont actuellement conduits sur des animaux de plus petite taille. Les échantillons utilisés correspondent à des prélèvements réalisés dans le cadre du protocole Pays de Loire. En effet, une ponte (S III) a présenté des mortalités associées à la détection du virus de type herpès. Les prélèvements réalisés régulièrement sur cette ponte, avant l'apparition des mortalités, pourront permettre de réaliser différents essais d'amélioration du protocole de PCR. A cette fin, des extractions d'ADN sont en cours.

6 - Essais de reproduction expérimentale de la maladie

Des essais d'infection ont été réalisés par inoculation de larves virosées vivantes, produites par reproduction expérimentale de l'infection, à des élevages de naissain d'huître (96R18, tableau n°4). Des mortalités ont été observées parmi les animaux inoculés, l'analyse de ces animaux en PCR et en histologie est en cours de réalisation.

7 - Formation

↳ Une session de formation interne à l'IFREMER a été organisée à La Tremblade les 23 et 24 avril 1996.

- Premier jour : Les aspects théoriques et pratiques de la pathologie à virus de type herpès ainsi que de la méthode de PCR ont été exposés. Puis, une démonstration de la méthode a été réalisée. Un fascicule (46 pages) correspondant a été remis aux participants.
- Deuxième jour : Journée consacrée plus particulièrement aux intervenants des cellules de veille zoosanitaire de La Tremblade (B. Chollet), La Trinité (G. Lemouroux et R. Le Chanjaur) et Palavas (Y. Pichot), à leur initiation à l'ensemble du protocole de PCR et à la réalisation du diagnostic, ainsi qu'à une discussion pratique concernant l'équipement et l'aménagement des laboratoires susceptibles de réaliser ces analyses.

Néanmoins, les méthodes mises en place pour réaliser le diagnostic du virus de type herpès par PCR nécessitent une formation plus complète. Quelques autres déplacements à La Tremblade pourront de ce fait être nécessaires avant que les agents des cellules de veille zoosanitaire soient autonomes. Ainsi, depuis la session de formation, G. Lemouroux et R. Le Chanjaur sont venus à La Tremblade (28-30/05/96) réaliser une première série d'analyses en PCR sur des lots prélevés à La Trinité.

↳ Une journée d'information a été consacrée au SMIDAP le 22 mai 1996.

- L'ensemble des résultats obtenus concernant l'étude du virus de type herpès chez les huîtres a été exposé, et en particulier les aspects théoriques et pratiques de la méthode de PCR. Les applications et perspectives de ce travail ont été exposés et discutés.
- Le bilan des analyses effectuées dans le cadre du protocole Pays de Loire a été exposé et discuté (voir paragraphe 1 de ce compte rendu).
- Un fascicule (74 pages) correspondant a été remis aux participants.

ANNEXE

TABLEAUX DE RESULTATS :

➤ **ANALYSE DES PONTES PROTOCOLAIRES PAYS DE LOIRE**

➤ **ANALYSES DES PONTES PROTOCOLAIRES IFREMER/SODABO**

Mise à jour du 31/05/96

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE ELIMINEE LE 25/03/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
FA	Ecloserie <i>C. gigas</i>	26/02/96					
FA 1			08/03/96 J11	80 µm	Fixation glutataraldéhyde	Négatif	Résultats négatifs non interprétables car la fixation par la glutaraldéhyde altère l'ADN et inhibe la réaction de PCR
FA 2			18/03/96 J21	250 µm	Idem	Négatif	
FA 3			25/03/96 J28	400 µm	Idem	Négatif	
FA 4			11/04/96	800 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)	

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
FB	Ecloserie <i>C. gigas</i>	26/02/96					
FB 1			08/03/96 J11	80 µm	Fixation glutaraldéhyde	Négatif	Résultats négatifs non interprétables car la fixation par la glutaraléhyde altère l'ADN et inhibe la réaction de PCR
FB 2			18/03/96 J21	250 µm	Idem	Négatif	
FB 3			01/04/96 J35	800 µm	RAS	Négatif (1)	
FB 4			04/04/96 J38		RAS	Négatif (1)	
FB 5			17/04/96	T500	RAS	Négatif (1)	

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE RETIREE DU PROTOCOLE LE 07/05/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
FC	Ecloserie <i>C. gigas</i>	07/03/96					
FC 1			20/03/96 J13	180 µm	Fixation glutaraldéhyde	Négatif	Résultats négatifs non interprétables car la fixation par la glutaraldéhyde altère l'ADN et inhibe la réaction de PCR
FC 2			22/03/96 J15	250 µm	Idem	Négatif	
FC 3			05/04/96 J29	800 µm	RAS	Négatif (1)	

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE RETIREE DU PROTOCOLE LE 07/05/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
FD	Ecloserie <i>C. gigas</i>	08/03/96					Résultats négatifs non interprétables car la fixation par la glutaraléhyde altère l'ADN et inhibe la réaction de PCR
FD 1			20/03/96 J12	150 µm	Fixation glutaraldéhyde	Négatif	
FD 2			26/03/96 J18	250 µm	RAS	Négatif (1)	
FD 3			05/04/96 J28	800 µm	RAS	Négatif (1)	
FD 4			09/04/96 J32	800 µm	Mortalités	Négatif (1)	
FD 5			11/04/96 J34	800 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)	
FD 6			17/04/96 J40	T500	5 tubes PCR	Négatifs (1)	

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE ELIMINEE)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
FE	Ecloseries <i>C. gigas</i>	11/03/96					
FE 1			21/03/96 J10	100 µm	Fixation glutaraldéhyde	Négatif	Résultats négatifs non interprétables car la fixation par la glutaraldéhyde altère l'ADN et inhibe la réaction de PCR
FE 2			23/03/96 J12	<150 µm	Idem et mortalités anormales	Négatif	
FE 3			24/03/96 J13	150 µm	Idem et 50 à 60% de mortalité	Négatif (1)	

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
FF	Ecloserie <i>C. gigas</i>	11/03/96					
FF 1			21/03/96 J10	100 µm	Fixation glutaraldéhyde	Négatif	Résultats négatifs non interprétables car la fixation par la glutaraldéhyde altère l'ADN et inhibe la réaction de PCR
FF 2			31/03/96 J20	250 µm	RAS	Négatif (1)	
FF 3			11/04/96	800 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)	
FF 4			19/04/96	T500	RAS	Négatif (1)	

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE ENTREE DANS LE PROTOCOLE LE 7 ET LE 9/05/96 EN REMPLACEMENT DE LA PONTE FD)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
FG	Ecloserie <i>C. gigas</i>	25/03/96				
FG 1			05/04/96 J10		RAS	Négatif (1)
FG 1'			05/04/96 J10		RAS	Négatif (1)
FG 2			19/04/96 J24		RAS	Négatif (1)
FG 2'			19/04/96 J24		RAS	Négatif (1)
FG 3			07/05/96	800 µm	RAS	Non analysé
FG' 3			07/05/96	800 µm	RAS	Non analysé

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
 RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
 (PONTE HORS PROTOCOLE DEPUIS LE 10/05/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
FH	Ecloserie <i>C. gigas</i>	25/03/96				
FH 1			05/04/96 J10		RAS	Négatif (1)
FH 2			19/04/96 J24		RAS	Négatif (1)
FH 3			07/05/96		RAS	Non analysé

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE HORS PROTOCOLE DEPUIS LE 10/05/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
FI	Ecloserie <i>C. gigas</i>					
FI 1			10/04/96 J12		RAS	Négatif (1)
FI 2			18/04/96 J20		RAS	Négatif (1)
FI 3			07/05/96	800 µm	Mortalité 5tubes PCR	Négatifs

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
HORS PROTOCOLE DEPUIS LE 10/05/96

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
FJ	Ecloserie <i>C. gigas</i>					
FJ 1			10/04/96 J12		RAS	Négatif (1)
FJ 2			18/04/96 J20		RAS	Négatif (1)

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE HORS PROTOCOLE DEPUIS LE 10/05/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
FK	Ecloserie <i>C. gigas</i>					
FK 1			29/04/96 J12		RAS	Négatif (1)
FK' 1			29/04/96 J12		RAS	Négatif (1)

PONTES HORS PROTOCOLE, analyses non réalisées : FM 1 J14 07/05/96, FP 1 J12 07/05/96, FO 1 J12 07/05/96, F51 J12 07/05/96.

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RÉSULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
SI'	Ecloserie <i>C. gigas</i>	04/03/96				
1			14/03/96 J10	150 µm	RAS	Négatif (1)
2			23/03/96 J20	250 µm	RAS	Négatif (1)
3			04/040/96 J30	850 µm	RAS	Négatif (1)
4			13/04/96	850 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)
5			19/04/96	1000/1500µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)

**PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR**

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
S II	Ecloserie <i>C. gigas</i>	01/03/96				
1			11/03/96 J10	100 µm	RAS	Négatif (1)
2			23/03/96 J22	250 µm	RAS	Négatif (1)
3			01/04/96 J32	850 µm	RAS	Négatif (1)
4			09/04/96	850 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)
5	23/04/96	1000/1500µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)		

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(PONTE RETIREE DU PROTOCOLE ET ELIMINEE LE 09/04/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
S III	Ecloserie <i>C. gigas</i>	01/03/96				
1			11/03/96 J10	125 µm	RAS	Négatif (1)
2			23/04/96 J22	250 µm	RAS	Négatif (1)
3			04/04/96 J33	850 µm	RAS	Négatif (1)

**PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR**

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
S IV	Ecloserie <i>C. gigas</i>	03/03/96				
1			13/03/96 J10	100 µm	RAS	Négatif (1)
2				400 µm	RAS	Négatif (1)
3			04/04/96	850 µm	RAS	Négatif (1)
4			09/04/96	850 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)
5	19/04/96	1000/1500 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)		

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
 RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
 (PONTE RETIREE DU PROTOCOLE LE 09/04/96)

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
S V	Ecloserie <i>C. gigas</i>	04/03/96				
1			14/03/96 J10	150 µm	RAS	Négatif (1)
2			24/03/96 J20	250 µm	RAS	Négatif (1)
3			04/04/96 J30	850 µm	RAS	Négatif (1)

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RÉSULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR

n° échantillons	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
S VI	Ecloserie <i>C. gigas</i>	04/03/96				
1			14/03/96 J10	150 µm	RAS	Négatif (1)
2			24/03/96 J20	250 µm	RAS	Négatif (1)
3			04/04/96 J30	850 µm	RAS	Négatif (1)
4			09/04/96	850 µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)
5			19/04/96	1000/1500µm	5 tubes PCR	Négatifs (1)

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(CES PONTES, PROVENANT DE DEUX ECLOSERIES ONT ETE PLACEES EN NURSERIE
DANS UN 3° SITE, PUIS ELLES EN ONT ETE RETIREES LE 10/05/96)

n° échantillon	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
F F 1	Ecloserie <i>C. gigas</i>		15/04/96	800µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)
F F 2	Ecloserie <i>C. gigas</i>		19/04/96	850 µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)
F F 3	Ecloserie <i>C. gigas</i>		29/04/96	850 µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)
F C1	Ecloserie <i>C. gigas</i>		19/04/96	850 µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)
F C 2	Ecloserie <i>C. gigas</i>		29/04/96	850 µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)

PONTE PROTOCOLAIRE PAYS DE LOIRE
RESULTATS DE LA RECHERCHE D'HERPESVIRUS PAR PCR
(CES PONTES, PROVENANT DE DEUX ECLOSERIES ONT ETE PLACEES EN NURSERIE
DANS UN 3° SITE, PUIS ELLES EN ONT ETE RETIREES LE 10/05/96)

n° échantillon	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observations avant traitement	Résultats PCR
S III	Ecloserie <i>C. gigas</i>		10/04/96	850µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)
S III	Ecloserie <i>C. gigas</i>		15/04/96	850 µm naissain	5 tubes PCR	Négatifs (1)
S III	Ecloserie <i>C. gigas</i>		25/04/96	850 µm naissain	5 tubes PCR	1 tube positif sur 5

**PONTES PROTOCOLAIRES IFREMER / SODABO
(SITE IFREMER ARGENTON : 96 R39)**

n° échantillon	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observation avant traitement	Résultats PCR
E 1 F	Angleterre		J10		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1)
E 2 F	Angleterre		J10		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1)
A 1 F	Arcachon		22/04/96 J7		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1)
A 2 F	Arcachon		22/04/96 J7		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1)
M 1 F	Marennes		22/04/96		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1)
M 2 F	Marennes		22/04/96		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1)

**PONTES PROTOCOLAIRES IFREMER / SODABO
(SITE IFREMER ARGENTON : 96 R39)**

n° échantillon	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observation avant traitement	Résultats PCR
E 1 C	Angleterre		J11		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)
E 2 C	Angleterre		J11		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)
A 1 C	Arcachon		J8		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)
A 2 C	Arcachon		J8		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)
M 1 C	Marennes		J10		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)
M 2 C	Marennes		J10		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)

**PONTES PROTOCOLAIRES IFREMER / SODABO
(SITE SODABO BOUIN : 96R40)**

n° échantillon	Origine	Date de ponte	Date de prélèvement	Taille	Observation avant traitement	Résultats PCR	Commentaires
E F 1 2	Angleterre		05/04/96 J10 30/04/96		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif(1) Négatif (1)	
E C 1 2	Angleterre		05/04/96 J10 30/04/96		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1) Négatif (1)	
A F 1 2	Arcachon		05/04/96 J10 30/04/96		Géniteurs conditionnés à froid	Négatif (1) Négatif (1)	
A C 1 2	Arcachon		05/04/96 J10 pas de prélèvement		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1)	Ponte jetée car trop peu d'animaux
M F 1 2	Marenes		05/04/96 J10 30/04/96		Géniteurs conditionnés à froid Mortalités	Négatif (1) Négatif (1)	
M C 1 2	Marenes		05/04/96 J10 30/04/96		Géniteurs conditionnés à chaud	Négatif (1) Négatif (1)	

COMMENTAIRES

(1) : Les limites actuelles de la méthode ne permettent pas de détecter le virus sous sa forme latente. La non détection du virus de type herpès n'implique donc pas nécessairement l'absence de cet agent dans les échantillons analysés.

(2) : Les herpès virus présentent la particularité de pouvoir persister sous une forme latente pendant toute la vie de l'hôte. Les animaux éventuellement survivants dans un lot ayant subi des mortalités associées à la présence de virus de type herpès, ainsi que les animaux dans lesquels la présence de ce virus est détectée hors mortalité, sont considérés comme potentiellement porteurs asymptomatique du virus. Ces animaux sont de ce fait susceptibles de développer une infection aigüe ultérieurement et/ou de transmettre le virus à leur descendance.

NOUS CONFIRMONS L'IMPORTANCE DE DETRUIRE LES EVENTUELS SURVIVANTS DE CE TYPE DE LOTS.