

**SEPTICEMIE HEMORRAGIQUE VIRALE :
DEMONSTRATION DE L'ETAT REFRACTAIRE
DU SAUMON COHO
(*Oncorhynchus kisutch*)
ET DE LA TRUITE FARIO (*Salmo trutta*) *****

P. de KINKELIN, Monique LE BERRE et Annie MEURILLON *
avec la collaboration technique de M. CALMELS **

Institut National de la Recherche Agronomique

* Laboratoire d'Ichtyopathologie
78850 THIVERVAL GRIGNON

Pisciculture du Moulin de Launay
** 22740 PLEUDANIEL, FRANCE

RESUME

Ces études ont eu pour but de vérifier le comportement de la Truite Fario (*Salmo trutta*) et du Saumon Coho (*Oncorhynchus Kisutch*) à l'infection par le virus de la S.H.V.

Des essais de contamination ont donc été réalisés en pisciculture et au laboratoire (bains infectants et injections intra-péritonéales). L'évolution de la maladie a été suivie chez les espèces éprouvées par rapport à celle d'un témoin sensible, la Truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri*). Les critères d'infection étaient : les courbes de mortalité, l'isolement du virus et la réaction de l'hôte (production d'interféron).

La Truite fario et le Saumon coho se sont révélés réfractaires à la maladie dans toutes les conditions expérimentales (fig. 2 et 3) tandis que chez la Truite Arc-en-Ciel, les mortalités se situaient entre 50 % et 95 % selon les expériences, le virus était toujours réisolé et l'infection déclenchait une production d'interféron.

Les espèces réfractaires constituent un bon moyen pour contribuer à lutter contre la dissémination de la S.H.V. par l'intermédiaire des repeuplements des cours d'eau ou des piscicultures.

*** Travaux effectués dans le cadre de la convention Conseil Supérieur de la Pêche .
INRA N° 65 817.

La Septicémie Hémorragique Virale (S.H.V.) est une maladie de la Truite Arc-en-ciel qui constitue le principal obstacle pathologique à l'expansion de la salmoniculture européenne. Comme cette maladie est souvent propagée par les introductions de poissons ou les repeuplements de cours d'eau, il importe de bien connaître les modalités de sa transmission pour en réaliser une meilleure prophylaxie sanitaire.

Les travaux rapportés dans cet article ont donc été entrepris dans le double but suivant :

1) Éprouver le comportement à l'infection du Saumon Coho récemment importé des Etats-Unis et introduit en Bretagne où la présence de la S.H.V. pouvait compromettre son élevage.

2) Déterminer si la Truite fario, salmonidé autochtone et espèce de repeuplement des cours d'eau était susceptible d'être infectée ou de disséminer le virus. En effet, cette truite est fréquemment élevée dans des salmonicultures atteintes de S.H.V., mais sans extérioriser de symptômes ni de mortalités. Or comme deux auteurs (RASMUSSEN 1965 et GHITTINO 1968) avaient signalé que sous certaines conditions, la Truite fario s'était montrée sensible, il importait de vérifier, avec des techniques virologiques, la réceptivité de cette espèce.

Des expériences de transmission de la S.H.V. ont donc été entreprises en comparant les réactions des deux salmonidés étudiés à celle de la Truite Arc-en-ciel, servant de témoin sensible, sur les critères suivants : mortalité, diagnostic virologique qualitatif et quantitatif, production d'interféron.

I — MATERIEL ET TECHNIQUES

1 — Les Virus

Le virus de la SHV utilisé appartenait au sérotype I (VESTERGARD - JORGENSEN 1972 a) et comprenait les souches suivantes :

— 54/72 pour la contamination par la voie naturelle des saumons coho (virus isolé dans la pisciculture).

— 15/73 pour celle des truites fario (virus également isolé dans la pisciculture servant à l'expérience).

— 07/71 pour les épreuves d'infection par les voies intra-péritonéale et balnéatoire. Cette souche est celle qui est habituellement employée au laboratoire pour les recherches sur la SHV.

Pour la mise en évidence de l'interféron, le virus d'épreuve fut la souche 27/70 du virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse (N.P.I.) des Salmonidés (WOLF et al. 1960).

2 — Cultures cellulaires et titrages des virus

Le virus de la S.H.V. a été produit sur la lignée cellulaire Fathead Minnow ou F.H.M. (GRAVELL et MALSBERGER 1965) selon des modalités déjà décrites (de KINKELIN et SCHERRER 1970). Les titrages ont été effectués sur un volume de 0,1 ml, par une technique de plages en boîtes de Pétri de 35 mm de diamètre, dans du milieu de STOKER, tamponné par le tris à pH 7.6 et gélifié par 0,5 % d'agarose. La lecture des résultats est effectuée après 60 heures d'incubation à + 14 °C.

Le virus de la N.P.I. a été cultivé et titré sur la lignée Rainbow Trout Gonads ou RTG-2 (WOLF et QUIMBY 1962) dans les mêmes conditions que le précédent.

3 — Détection du virus chez l'animal

La virémie a été mesurée par le titrage du virus dans des prélèvements sanguins effectués à intervalles choisis, par ponction de l'aorte postérieure des poissons, anesthésiés dans une solution à 100 ppm de M.S. 222.

L'extraction du virus à partir des organes d'animaux morts ou sacrifiés, a été pratiquée par broyage dans un mortier des reins et rates puis dilution dans du milieu de EARLE et infection de cultures cellulaires de F.H.M. Dans une partie des expériences, ce diagnostic virologique a été rendu quantitatif par la pesée des prélèvements traités et leur titrage (MEURILLON 1974).

Mesure de la production d'interféron sérique :

Cette production a été évaluée par l'épreuve de protection des cellules RTG.2 contre le virus de la N.P.I., selon une technique antérieurement décrite (de KINKELIN et DORSON 1973).

4 — Lots expérimentaux et essais de transmission (tableau I).

— Epreuve du Saumon Coho

Pour la contamination naturelle, 900 saumons d'un poids moyen de 3 g et 900 truitelles arc-en-ciel indemnes de 2 g ont été transférés dans une salmiculture infectée de S.H.V., située à Yvias (Côtes-du-Nord) et placés en deuxième eau sous un bassin atteint. Pendant les 7 semaines de l'expérience, la température de l'eau a varié de + 9° à + 13°C et à la fin, le poids moyen des survivants était de 12 g.

Les critères de contrôle de cette épreuve étaient la mortalité et le diagnostic virologique qualitatif. Parallèlement, deux lots de 500 poissons chacun ont été maintenus en milieu sain pendant la durée des opérations.

Dans les essais d'inoculation, les animaux, placés à + 13°C, ont reçu chacun 10^4 u.f.p.* de virus par la voie péritonéale (12 saumons et 19 truitelles), alors que les témoins recevaient le même volume de milieu de STOKER (0,2 ml). L'évolution des mortalités et la recherche quantitative du virus ont servi à juger des résultats de l'infection.

— Epreuve de la Truite fario

Les essais de contamination dans les conditions naturelles ont porté sur deux classes d'âge : des truites adultes de 180 g et des truitelles de 10 g. Les animaux provenant d'une exploitation indemne de S.H.V. ont été placés dans des cages (fig. 1) en aval d'un bassin infecté de la pisciculture fédérale du Val-d'Oise à Chars. Les poissons avaient été préalablement acclimatés par un séjour de deux semaines dans des cages immergées en amont de la pisciculture. Ensuite pendant toute la durée des expériences, des animaux servant de témoins indemnes, y ont été maintenus.

Quatre lots de 30 animaux chacun (fario et arc-en-ciel) ont été ainsi immergés et la température de l'eau a oscillé entre + 5° et + 8°C pendant l'expérience.

La transmission par balnéation a été réalisée en soumettant deux lots de 30 truitelles chacun, à un séjour d'une heure dans de l'eau titrant 2.10^3 unités formant plaque (u.f.p.) de virus par ml. De même, deux lots de 30 alevins de 0,35 g ont été infectés à + 13°C dans des aquariums de 20 litres.

Les essais d'infection par voie intra-péritonéale ont été faits sur des truites adultes afin de permettre des prises de sang répétées. Les opérations se sont déroulées à trois températures : + 7°C (2 lots de 16 poissons) + 10°C (2 lots de 10) et + 15°C (2 lots de 10). Chacun des animaux a ainsi reçu 2.10^6 u.f.p. de virus.

Le bilan des expériences entreprises et de leurs résultats est résumé dans le tableau I.

* Unités formant plaque.

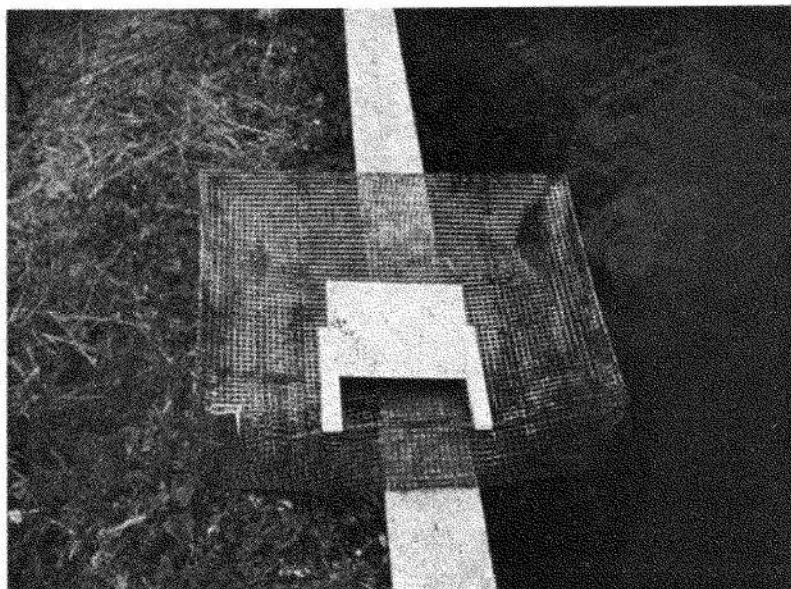


fig. 1 — Modèle de cage en grillage de matière plastique, utilisée pour les essais de contamination des truites fario (dimensions : 1 m x 0,80 m x 0,30 m).

fig. 1 — Plastic net cage used for contamination trials of brown trout (dimensions 1 m x 0.80 m x 0.30 m).

TABLEAU I : Résumé des protocoles expérimentaux et des résultats

| Lots expérimentaux | | Mortalité | Présence (1) du virus dans les organes | Virémie | Interféron |
|--|---|-----------|---|---------|------------|
| SAUMON COHO | | | | | |
| Infection en aval d'un bas- sin contaminé (contamination naturelle) température + 9° à + 13 °C. | 900 saumons de 3 g | 23 | 0 | | |
| | 900 truitelles A. C. de 2 g. <i>Té- moins non infec- tés</i> : | 835 | + | | |
| | 500 saumons de 3 g | 14 | 0 | | |
| | 500 truitelles A. C. de 2 g | 22 | 0 | | |
| Injection intra- péritonéale 10 ⁸ u.f.p/pois- son température : + 13 °C | 12 saumons de 3 g | 0 | 0 | 0 | |
| | 19 truitelles A. C. de 2 g <i>Témoins non in- fectés</i> : | 18 | + | + | |
| | 10 saumons et truitelles | 0 | 0 | 0 | |

| Lots expérimentaux | | Mortalité | Présence (1) du virus dans les organes | Virémie | Interféron |
|---|---|-----------|---|---------|------------|
| TRUITE FARIO | | | | | |
| Infection en aval d'un bas- sin contaminé (contamination naturelle) température : + 5° à + 8°C | 30 truites Fario (F) de 180 g | 0 | 0 | | |
| | 30 truites A.C. de 180 g | 15 | + | | |
| | 30 truitelles F de 10 g | 0 | 0 | | |
| | 30 truitelles A.C. de 10 g | 19 | + | | |
| | <i>Témoins non in- fectés :</i> 30 de chaque groupe | 0 | 0 | | |
| Infection par bain de 1 heure 2.10 ⁵ u.f.p./ml température : truitelles + 5° à + 8°C alevins + 10° à + 12 °C | 30 truitelles F de 10 g | 0 | 0 | | |
| | 30 truitelles AC de 10 g | 3 | + | | |
| | 30 alevins F de 0,35 g | 0 | 0 | | |
| | 30 alevins AC de 0,35 g | 23 | + | | |
| Injection intra- péritonéale 2.10 ⁶ u.f.p./ poisson | + 7° 16 truites F de 180 g | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | 16 truites AC de 180 g | 10 | + | + | + |
| | + 10° 10 truites F | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 truites AC | 5 | + | + | + |
| | + 15° 10 truites F | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 10 truites AC | 0 | 0 | 0 | + |

(1) La recherche du virus est effectuée sur les animaux morts ou sur des sujets sacrifiés en cours ou en fin d'expérience.

RESULTATS

Essais d'infection du Saumon Coho (Fig. 2)

Aucune mortalité n'est survenue dans les lots de saumons coho exposés à une contamination par la voie naturelle ou par injection intra-péritonéale. De même, le virus n'a pu, à aucun moment, être mis en évidence chez les sujets prélevés en cours d'expérience ou sacrifiés à la fin des épreuves. Inversement, les truitelles arc-en-ciel ont succombé à la maladie dans des proportions dépassant 90 % (fig. 2) et les diagnostics virologiques effectués sur les poissons morts ou mourants ont toujours révélé la présence du virus. Bien sûr, chez les truitelles arc-en-ciel infectées par injection de 10⁴ u.f.p. de virus par animal de 2 g, on en retrouve 5.10⁷ par gramme, ce qui témoigne d'une intense multiplication virale.

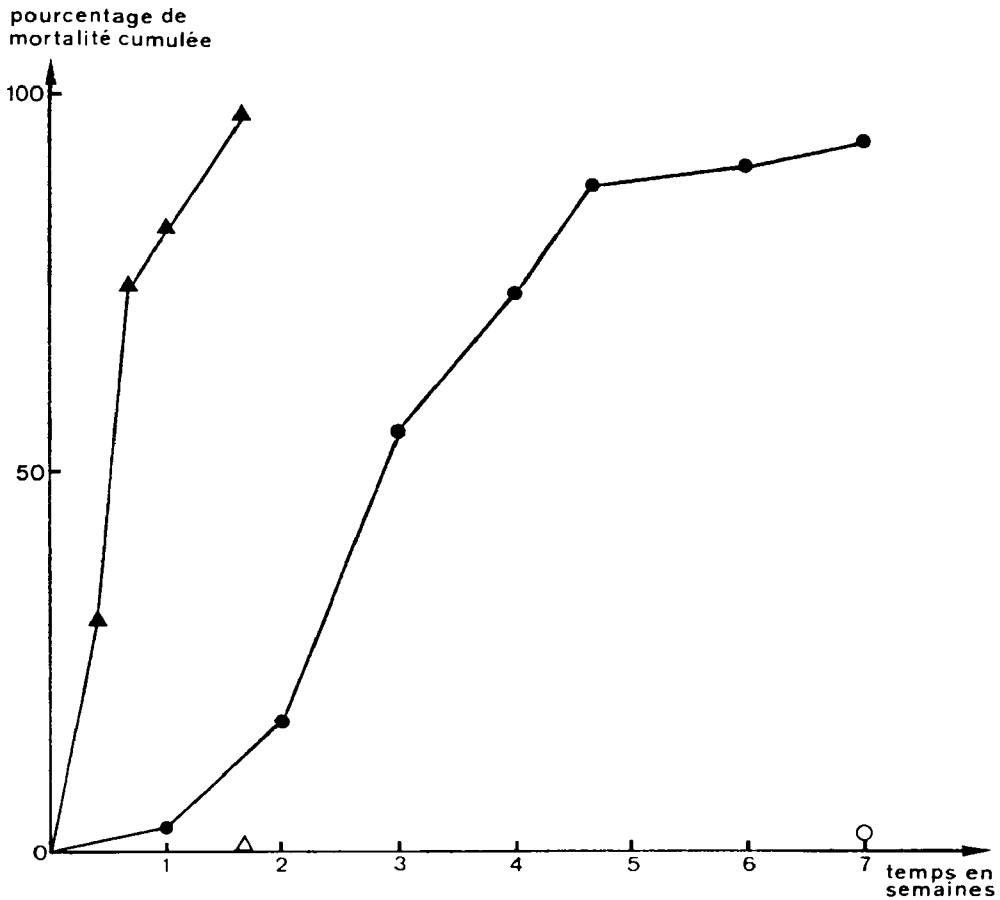


fig. 2 — Courbes des mortalités des expériences d'infections comparées du Saumon Coho et de la Truite Arc-en-Ciel : 12 saumons de 3 g \triangle — \triangle et 19 truitelles de 2 g \blacktriangle — \blacktriangle , infectés par injection intra-péritonéale de 10^4 u.f.p. de virus de la S.H.V., à une température de + 13°C.

\circ — \circ 900 Saumons de 3 g et 900 truitelles de 2 g \bullet — \bullet placés à l'aval d'un bassin contaminé (température + 9° à + 13°C). Les témoins non infectés ne sont pas représentés.

fig. 2 — Mortality curves comparing the results of infection experiments of coho salmon with rainbow trout : 12 salmon each of 3g weight \triangle — \triangle and 19 trout fingerlings each of 2g weight \blacktriangle — \blacktriangle , injected intra-peritoneally with 10^4 p.f.u. of V.H.S. virus per ml. at + 13°C.

\circ — \circ 900 coho salmon each of 3g weight and 900 trout fingerlings each of 2g weight \bullet — \bullet placed downstream from a contaminated pond (temperature range + 9° to + 13°C) Non infected controls are not shown.

Essais d'infection de la Truite Fario (fig. 3)

Les truites et truitelles fario ont résisté aux différents modes de contamination et n'ont présenté aucune mortalité imputable à la virose. Les examens virologiques sont tous demeurés négatifs sauf chez un sujet ayant une légère virémie (20 u.f.p. par ml), trois jours après l'injection intra-péritonéale, mais au 6^e jour, cette virémie avait disparu.

En revanche les truites et truitelles arc-en-ciel témoins se sont montrées sensibles au virus à des degrés divers :

Au cours des essais d'infection par voie naturelle à + 7 °C, 50 % des truites et 60 % des truitelles avaient succombé à la S.H.V. Au bout de la 4^e semaine l'expérience fut arrêtée car tous les examens virologiques étaient positifs (fig. 3).

Dans l'épreuve de contamination par bain d'une heure, seulement 10 % des truitelles arc-en-ciel sont mortes, mais le virus fut réisolé à partir des cadavres. En revanche, au cours de la même épreuve effectuée sur des alevins de 0,35 g, la mortalité atteignit 80 % chez les arc-en-ciel pour rester nulle chez les fario (fig. 3).

Pour les infections par voie intra-péritonéale effectuées uniquement sur des truites, les pourcentages de mortalité ont respectivement atteint 62 % à + 7 °C et 50 % à + 10 °C après quatre semaines d'expérience ; à + 15 °C aucune mortalité ne fut enregistrée. La recherche du virus a été positive sur la plupart des cadavres et la mesure de la virémie a permis de suivre les progrès de l'infection au cours des prélèvements effectués au 3^e, 6^e et 10^e jour sur 10 animaux marqués ainsi qu'au 24^e jour sur 4 de ces survivants : à + 7 °C, la virémie a été décelée le 6^e jour après l'infection puis a augmenté progressivement jusqu'au 10^e et était en régression le 24^e ; la valeur la plus élevée obtenue fut 6.10⁶ u.f.p. par ml. En opérant à + 10 °C, la virémie fut détectée dès le 3^e jour mais à + 15 °C, elle est demeurée nulle.

En dernier lieu, les truites arc-en-ciel infectées par voie intra-péritonéale ont réagi à la multiplication virale par une synthèse d'interféron d'autant plus précoce que la température de l'eau était élevée. Cette production d'interféron ne fut décelée sur aucune des truites fario infectées dans les mêmes conditions.

Expérience de contrôle : essai d'infection de truites arc-en-ciel à partir de fario préalablement exposées au virus d'Egtved.

Après l'arrêt des expériences rapportées ci-dessus, des truites fario contaminées soit par voie naturelle soit par voie intra-péritonéale, ont été mises en contact pendant un mois avec des truites arc-en-ciel indemnes de S.H.V., à une température comprise entre + 7 °C et + 10 °C. Ces dernières n'ont présenté aucune mortalité et les résultats des diagnostics virologiques effectués en cours et en fin d'expérience sur des sujets pris au hasard, sont restés négatifs. En même temps, des témoins arc-en-ciel indemnes, d'origine identique et mélangés à des truites malades de la même espèce, mouraient de la S.H.V.

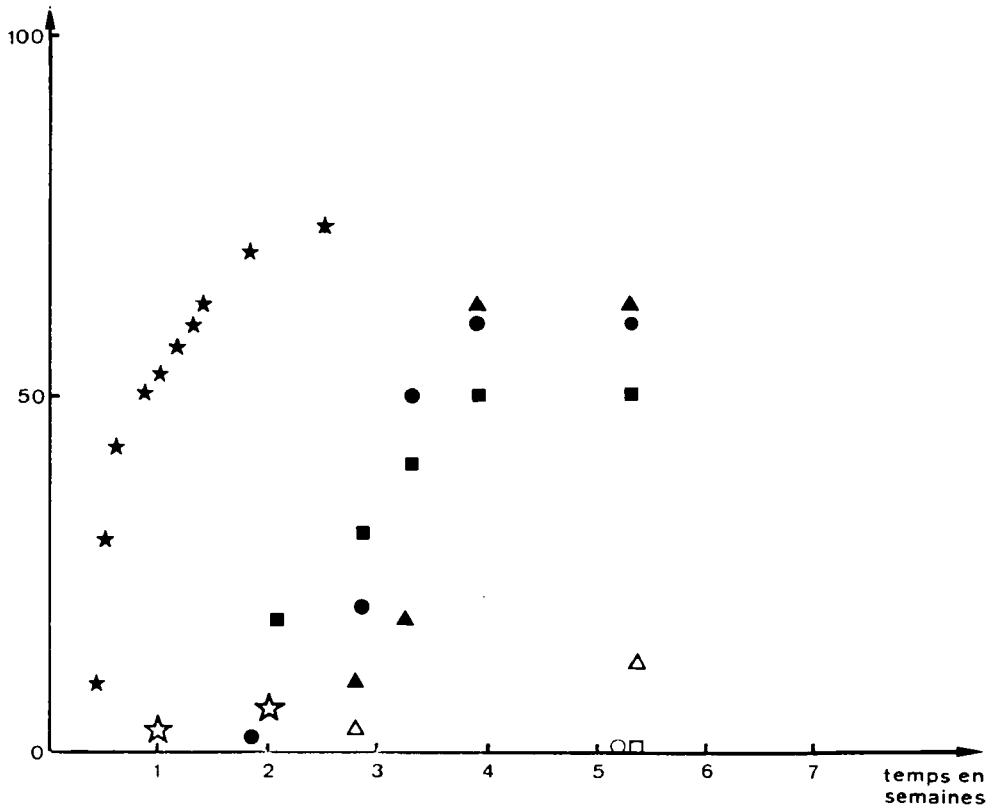


fig. 3 — Courbes des mortalités des expériences d'infections comparées de la Truite Fario et de la Truite Arc-en-Ciel :

□—□ 30 truites fario de 180 g, ■—■ 30 truites arc-en-ciel de 180 g, ○—○ 30 truitelles fario de 10 g et ●—● 30 truitelles arc-en-ciel de 10 g, respectivement placées dans des cages à l'aval d'un bassin infecté, à une température comprise entre + 5° et + 8°C. ☆—☆ 30 alevins fario de 0,35 g et ★—★ 30 alevins arc-en-ciel de 0,35 g infectés par un bain de 1 h à + 10°C dans 2.10^5 u.f.p. ; de virus par ml. △—△ 16 truites fario et ▲—▲ 16 truites arc-en-ciel infectées par voie intra-péritonéale avc 2.10^6 u.f.p. de virus de la S.H.V. (température + 7°).

Les témoins non infectés et les autres essais d'infection ne sont pas représentés sur cette figure.

fig. 3 — Mortality curves comparing the results of infection trials of brown trout with rainbow trout.

□—□ 30 brown trout each weighing 180 g
 ■—■ 30 rainbow trout each weighing 180 g
 ○—○ 30 brown trout fingerlings each weighing 10 g
 ●—● 30 rainbow trout fingerlings each weighing 10 g
 put into separate cages downstream from an infected pond (temperature ranging from + 5° C to + 8°C)

☆—☆ 30 brown trout fry each weighing 0.35 g and
 ★—★ 30 rainbow trout fry of the same weight
 infected by immersion into water containing 2.10^5 p.f.u of V.H.S. virus per ml. for 1 hour. (temperature + 10°C)

△—△ 16 brown trout and 16 rainbow trout ▲—▲ infected intra-peritoneally with 2.10^6 p.f.u. of V.H.S. virus per ml (temperature + 7°C). Non infected controls and the remaining infection trials are not mentioned on this figure.

DISCUSSION

Ainsi les deux espèces éprouvées se sont révélées réfractaires à la S.H.V. et la méthodologie employée a tenu compte de différents paramètres, en s'assurant, dans chaque cas, la présence de témoins sensibles révélant le déclenchement de la maladie. Les facteurs suivants ont été considérés : les voies de pénétration du virus, la température, la durée des essais et l'âge des animaux.

Les voies de pénétration ont reproduit les modalités naturelles et expérimentales d'infection et des effectifs statistiquement suffisants ont été employés sauf au cours de certaines infections parentérales mais alors l'évolution de la maladie était suivie individuellement par des techniques virologiques.

L'influence de la température a été envisagée entre + 5° et + 15°C et correspond à la zone thermique dans laquelle se produit la maladie naturelle.

La durée des expériences a été fixée par le comportement des témoins sensibles, le résultat des diagnostics virologiques et les essais de contamination de la Truite Arc-en-ciel à partir des truites fario infectées expérimentalement. Ces dernières épreuves ont porté à 2 mois le délai d'observation et ce temps est classiquement considéré comme la limite extrême de l'incubation.

Le rôle éventuel de l'âge des animaux a été envisagé, son influence étant importante à connaître pour les repeuplements.

L'isolement du virus en culture cellulaire, suivi de son identification par séro-neutralisation est le seul moyen, en dehors de l'immunofluorescence (VESTERGARD-JORGENSEN 1972 b) d'effectuer le diagnostic précis de la S.H.V. Mais la limite de sensibilité de cette méthode est difficile à définir et dans le cas d'une infection légère, on peut aboutir à de faux résultats négatifs. C'est pourquoi, les prélèvements ont été multipliés en sacrifiant tous les animaux en fin d'expérience et l'épreuve de contamination des truites arc-en-ciel à partir de truites fario préalablement inoculées, a été effectuée.

La virémie et la production d'interféron ont été uniquement étudiées chez les truites infectées par voie parentérale. Pour des raisons techniques, cette étude ne pouvait s'effectuer sur tous les poissons et le travail quantitatif était facilité par la connaissance de la dose initiale.

Dans toutes les expériences, seule la Truite Arc-en-Ciel s'est montrée sensible et le virus y était régulièrement isolé à des titres généralement croissants. Chez les deux autres espèces, le virus disparaît très rapidement. Nous n'avons aucune explication concernant cet état réfractaire mais on peut seulement indiquer qu'il n'est pas dû à une activité anti-virus de la S.H.V. des sérums des salmonidés éprouvés.

Aucune production d'interféron n'a pu être décelée chez la Truite fario alors que l'Arc-en-ciel en synthétise. Mais comme la détection de l'interféron était effectuée sur une lignée cellulaire de Truite Arc-en-Ciel et non de Fario, la sensibilité de la méthode peut être moindre du fait de la spécificité souvent étroite de la protection par l'interféron. Cependant il est improbable qu'un interféron de Truite Fario ne confère aucune protection aux cellules RTG-2 car par exemple, l'interféron de Truite Arc-en-Ciel protège légèrement les cellules FHM qui proviennent d'un poisson d'une famille différente (de KINKELIN et DORSON 1973).

Au cours des expériences de transmission par baignation des truitelles, le taux de mortalité des témoins sensibles est resté bas (10 %) par rapport à ceux des autres essais. Ceci peut être dû à une dose trop faible par rapport au poids des truitelles car avec les alevins, le taux de mortalité des arc-en-ciel était normal. La baignation infectante est donc une mauvaise technique d'infection pour des sujets d'un certain poids, ce qui a été confirmé indépendamment par VESTERGARD-JORGENSEN (1973).

Au cours de notre travail, les épreuves de la Truite fario ont été plus nombreuses que celles du Saumon Coho, car pour la première espèce, deux auteurs, RASMUSSEN (1965) et GHITTINO (1968) avaient signalé sa sensibilité à la SHV. Selon RASMUSSEN, la Truite Fario n'était sensible qu'à l'infection par voie intra-péritonéale et non à la contamination naturelle mais aucune technique virologique n'avait été mise en œuvre. GHITTINO d'autre part, avait décrit un cas de SHV spontanée dans une salmoniculture italienne de truites fario et le virus en avait été ultérieurement isolé (communication personnelle de l'auteur) par VESTERGARD-JORGENSEN.

Nos résultats n'ont permis de vérifier aucune des données indiquées par les auteurs précédents et l'emploi parallèle des épreuves d'infection et du diagnostic virologique est un argument en notre faveur. Il est donc permis de penser que la sensibilité de la Truite Fario, si elle existe, est tout à fait exceptionnelle et peut dépendre de « souches » très rares. L'observation fréquente de truites fario en bonne santé coexistant en salmoniculture avec des truites arc-en-ciel atteintes de SHV est donc conforme à nos résultats expérimentaux.

La démonstration de l'état réfractaire des deux espèces considérées apporte donc un élément favorable dans la lutte contre les viroses en salmoniculture. Il nous permet en outre d'entreprendre un programme d'étude visant à déterminer si l'hybridation de ces espèces avec la Truite Arc-en-Ciel, permet de transmettre la résistance à la SHV.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout spécialement M. CALMELS qui nous a permis d'effectuer nos expériences de terrain sur le Saumon Coho. De même nous tenons à exprimer notre gratitude à M. CANAFF, président de la Fédération de Pêche du Val-d'Oise et au personnel de cette Fédération, grâce auxquels les essais sur la Truite Fario ont pu être menés à bien.

SUMMARY

The aim of these experiments was to test the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and coho salmon (*Oncorhynchus Kisutch*) to exposure to the virus of viral haemorrhagic Septicemia (V.H.S.)

Infection trials were carried out both in the fish farm and in the laboratory (infectious baths and intra-peritoneal injections).

The course of the disease was followed in brown trout and coho Salmon in comparison with a species sensitive to V.H.S. the rainbow (*Salmo gairdneri*); infection criteria being based on the mortality rate, isolation of the virus and the host reaction with respect to interferon production.

In all these experiments, brown trout and coho Salmon were shown to be refractory to the virus of V.H.F. (fig. 2 et 3) while the rainbow trout displayed heavy mortalities (50 % - 90 %), V.H.S. virus was consistently isolated and the infection triggered production of interferon.

Restocking water ways and fish farms with species refractory to V.H.S., constitutes a practical means of helping combat the dissemination of this disease.

Titre anglais :

Viral Hemorrhagic Septicemia of trout : Resistance of coho salmon and brown-trout under natural and experimental conditions.

BIBLIOGRAPHIE

- GHITTINO P., 1968. Grave enzootia di setticemia emorragica virale in trotte fario di allavamento (*Salmo trutta*). *Riv. Pesci It. Itiop.*, 1, 17-19.
- GRAVELL M. et MALSBERGER R., 1965. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 126., 555-565.
- de KINKELIN P. et SCHERRER R., 1970. Le virus d'Egtved : I - Stabilité, développement et structure du virus de la souche danoise F1. *Ann. Rech. veter.*, 1, (1), 17-30.
- de KINKELIN P. et DORSON M., 1973. Interferon production in rainbow trout experimentally infected with Egtved virus
J. gen. Virol., 19 ; 125-127.
- MEURILLON Annie, 1974. Réceptivité de la Truite Fario (*Salmo trutta*) à la Septicémie Hémorragique Virale. Thèse pour le Doctorat vétérinaire, Copedith, Paris.
- RASMUSSEN C., 1965. A biological study of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 126, 427-460.
- VESTERGARD-JORGENSEN P., 1972 a. Egtved virus : Antigenic variation in 76 virus isolated examined in neutralization tests and by means of the fluorescent antibody technique in Symposium of the Zoological Society of London : Diseases of fish, Academic Press ; London and New York, 330-340.
- VESTERGARD-JORGENSEN P. et MEYLING A., 1972 b. Egtved virus : Demonstration of virus antigen by the fluorescent antibody technique in tissues of rainbow trout by VHS and in cell cultures infected with Egtved virus. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 36, 115-122.
- VESTERGARD-JORGENSEN P., 1974. Artificial transmission of VHS of rainbow trout. *Riv. It. Piscic. Itiop.*, 4, 101-102.
- WOLF K., SNIESZKO S., DUNBAR C. et PYLE E., 1960. Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 104, 105-108.
- WOLF K. et QUIMBY Millicent, 1962. Established eurythermic line of fish cells *in vitro*, *Science*, 135, 1065-1066.