

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DES CONDITIONS D'ISOLEMENT DE L'AGENT DE L'ERYTHRODERMATITE DE LA CARPE

*(Cyprinus carpio)*

G. TUFFERY et G. DEHAND\*

---

## RESUME

Des carpes ont été inoculées à l'aide d'une souche de la bactérie responsable de l'E.C., afin de suivre l'évolution de la maladie et de procéder à l'isolement du germe à partir des lésions et du rein des animaux d'expérience.

Les cadavres des poissons ont été conservés dans différentes conditions de températures (+ 4, + 10, + 20° C), pendant des temps variables (24, 48, 96 heures), afin de vérifier la persistance de la bactérie.

Celle-ci ne peut être résolue avec efficacité lors des mortalités que dans les 9 à 10 premiers jours de la maladie, essentiellement avant que les ulcères n'apparaissent. La bactérie n'a jamais été détectée dans le rein.

La survie du germe dans les cadavres est presque nulle quelles que soient les conditions de conservation.

Le dépistage systématique de l'E.C. ne peut utiliser des méthodes bactériologiques et il doit faire appel à la recherche d'anticorps spécifiques de la bactérie.

Les cadavres des carpes mortes de l'E.C. ne constituent pas une source d'infection pour le peuplement piscicole d'un étang.

---

\* LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES VETERINAIRES  
22, rue Pierre Curie — B.P. n° 67 — 94704 MAISONS ALFORT CEDEX  
MINISTERE DE L'AGRICULTURE — Direction de la Qualité.

## SUMMARY

Experimental batches of carps have been inoculated with a C.E. strain, for the disease record and to try germ isolation from lesions and kidney of fishes.

Fish dead bodies have been stored under different temperature conditions (+4, + 10, + 20° C), and during several time periods (24, 48, 96 hours), to ensure germ conservation.

Never C.E. bacteria has been isolated from dead fishes more than ten days after inoculation, always before ulcers appearance.

Fish kidney is always free from C.E. bacteria.

Germ conservation in dead bodies is very limited, even under the best cold conditions and the most limited storing time.

Bacteriological technics are not suitable for systematic detection of C.E., and there is a need of specific antibodies display methods.

C.E. dead carps are not a source of infection for fish pond populations.

## 1 - INTRODUCTION

L'Erythrodermatite (E.C.), maladie particulière aux carpes, notamment de race cuir et miroir, provoque d'importantes mortalités printanières et estivales dans les étangs.

Quelques jours après l'infection, une dépigmentation apparaît sur le flanc des animaux. Sur le pourtour de cette zone qui s'étend de façon concentrique se forment quelques pétéchies. Ces lésions deviennent de plus en plus hémorragiques puis entraînent la formation d'un ulcère parfois très profond et une nécrose atteint les tissus sous-jacents.

La persistance du germe dans les cadavres ainsi que dans les prélèvements réalisés en vue du diagnostic n'étant pas encore totalement connue, nous nous proposons de déterminer les conditions limites de conservation et d'isolement.

## 2 - METHODE ET TECHNIQUE

### 2.1. - Préparation de l'inoculum

A partir de la souche V 76/48 isolée par BOOTSMA et FIJAN (1976), incubée trois jours à + 26° C sur milieu Tryptose Blood Agar (Difco) additionné de 10 % de sérum de veau, on réalise une suspension bactérienne en eau physiologique.

Cette dernière est inoculée par voie intradermique à 30 carpes âgées de deux étés. L'injection de  $1.10^4$  bactéries par individu se fait sur le flanc près de la nageoire dorsale (DUBOIS-DARNAUDPEYS et TUFFERY - 1977).

## 2.2. - Observations et prélèvements sur les lots expérimentaux

Placés en stabulation dans une eau déchlorée dont la température est maintenue à  $+ 18 \pm 2^{\circ} \text{C}$ , ces cyprinidés font l'objet d'une surveillance quotidienne pendant laquelle on observe leur comportement général ainsi que l'évolution des signes cliniques de la maladie au point d'injection.

Au moment de la mort, on effectue un prélèvement dans le rein et un autre dans la zone nécrotique de l'ulcère ; ce dernier est réalisé à l'aide d'un scalpel stérile, en prélevant les tissus situés juste sous le derme.

Les cadavres des poissons sont ensuite conservés à sec à différentes températures ( $+ 4^{\circ} \text{C}$ ,  $+ 10^{\circ} \text{C}$ ,  $+ 20^{\circ} \text{C}$ ), à raison de 10 carpes par lot.

Un contrôle de la présence de la bactérie dans l'ulcère est fait quotidiennement en utilisant la même technique que celle citée précédemment, au moment de la mort, et après 24, 48, 96 heures.

## 2.3. - Conditions de culture des bactéries

Les ensemencements se font sur deux milieux qui sont ensuite incubés trois jours à  $+ 26^{\circ} \text{C}$  :

— Milieu Tryptose Blood Agar (T.B.A.) additionné de sérum de veau, pour la recherche de l'agent de l'Erythrodermatite.

— Milieu Trypticase Soy Agar (T.S.A.) enrichi en amidon et à pH 6,4 pour la mise en évidence des germes d'accompagnement tels que *Aeromonas* et *Pseudomonas*.

## 3. - RESULTATS

La totalité des animaux meure entre le 7<sup>e</sup> et le 18<sup>e</sup> jour (tableau 1).

La séquence des lésions constatées est fonction de l'évolution rapide ou lente de la maladie.

Les poissons qui meurent dans les 8 premiers jours ne présentent qu'une dépigmentation et quelques pétéchies au point d'inoculation. Lorsque la mort survient entre 9 et 12 jours après le début de l'épreuve, des hémorragies et des ulcérations se manifestent ainsi que des lésions internes. La quasi totalité des isolements de la bactérie de l'E.C. a été réalisée lors de cette période.

Par la suite (13 à 18 jours), les carpes meurent en présentant des ulcères cutanés et des pétéchies sur l'ensemble du corps. Des exophtalmies sont constatées dans les jours qui précèdent la fin des mortalités. Au cours de cette dernière phase, l'agent de l'E.C. n'a été réisolé qu'une fois sur 9.

Au total, sur les 30 essais de mise en évidence de la bactérie, seulement 15 ont été positifs au moment de la mort.

Les essais de conservation des cadavres de carpes dans différentes conditions de température ( $+ 4$ ,  $+ 10$ ,  $+ 20^{\circ} \text{C}$ ), et de temps (24, 48, 96 heures), n'ont conduit à réisolier le germe de l'E.C. que dans un seul cas (carpe morte au dixième jour, avec des hémorragies internes, un début d'ulcération, des hémorragies externes, et conservée à  $+ 10^{\circ} \text{C}$  pendant 24 heures).

**Tableau 1 : Résultats des observations et des essais d'isolement de l'agent de l'Erythrodermatite de la carpe.**

| NOMBRE DE<br>JOURS APRÈS<br>L'INOCULATION | LÉSIONS OBSERVÉES          |           |             |                        |         |         |                         |         |         |             |         |         |                  | ESQUEMES BACTÉRIOLOGIQUES A PARTIR DE : |         |                      |         |         |                |         |         |         |  |  |  |  |
|---|----------------------------|-----------|-------------|------------------------|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------------|---------|---------|------------------|---|---------|----------------------|---------|---------|----------------|---------|---------|---------|--|--|--|--|
|   | Externes                   |           |             |                        |         |         | Internes                |         |         |             |         |         | Lésions externes |   |         |                      |         |         | Inch.          |         |         |         |  |  |  |  |
|   | Dans la zone d'inoculation |           |             | pétéchies sur le corps |         |         | pétéchies sur les nages |         |         | Mémorragies |         |         | Agent de l'E.C.  |   |         | Acromonia Hydrophila |         |         | Pseudomonas Sp |         |         |         |  |  |  |  |
|   | Dépigmentation             | Pétéchies | Mémorragies | Ulçères                | Ulçères | Ulçères | Ulçères                 | Ulçères | Ulçères | Ulçères     | Ulçères | Ulçères | Ulçères          | Ulçères                                 | Ulçères | Ulçères              | Ulçères | Ulçères | Ulçères        | Ulçères | Ulçères | Ulçères |  |  |  |  |
| 7   | 1                          | 1         | -           | -                      | -       | -       | -                       | -       | -       | -           | -       | -       | -                | 1                                       | 1       | 0                    | 0       | 1       | 1              | -       | 1       | -       |  |  |  |  |
| 8   | 2                          | -         | -           | -                      | -       | -       | -                       | -       | -       | -           | -       | -       | -                | 2                                       | 2       | -                    | 2       | 0       | 2              | -       | -       | 2       |  |  |  |  |
| 9   | 5                          | 3         | 1           | 3                      | 2       | -       | -                       | -       | -       | 4           | 4       | 5       | -                | 4                                       | 5       | 2                    | 3       | 0       | 5              | -       | 3       | 2       |  |  |  |  |
| 10  | 7                          | -         | -           | 6                      | 6       | -       | -                       | -       | -       | 6           | 6       | 6       | 1                | 2                                       | 5       | 0                    | 6       | 1       | 6              | 1       | 1       | 6       |  |  |  |  |
| 11  | 3                          | -         | -           | 3                      | 3       | -       | -                       | -       | -       | 3           | 2       | 3       | -                | 1                                       | 2       | 0                    | 2       | 1       | 3              | -       | -       | -       |  |  |  |  |
| 12  | 3                          | -         | -           | 3                      | 3       | -       | -                       | -       | -       | 3           | 1       | 3       | -                | 2                                       | 1       | 0                    | 2       | 1       | 2              | 1       | 2       | 1       |  |  |  |  |
| 13  | 3                          | -         | -           | 3                      | 3       | 3       | -                       | -       | -       | 2           | 0       | 2       | 1                | 3                                       | -       | 0                    | 1       | 2       | 3              | -       | -       | -       |  |  |  |  |
| 14  | 2                          | -         | -           | 2                      | 2       | -       | -                       | -       | -       | 2           | 0       | 2       | -                | 2                                       | -       | 0                    | 2       | -       | 2              | -       | -       | -       |  |  |  |  |
| 15  | 1                          | -         | -           | 1                      | 1       | 1       | 1                       | 1       | 1       | 1           | 1       | 1       | -                | 1                                       | -       | 0                    | 1       | -       | 1              | -       | -       | -       |  |  |  |  |
| 16  | 1                          | -         | -           | 1                      | 1       | -       | -                       | -       | -       | -           | 0       | 1       | -                | 1                                       | -       | 0                    | 1       | -       | 1              | -       | -       | -       |  |  |  |  |
| 18  | 2                          | -         | -           | 2                      | 2       | 2       | 2                       | 2       | 2       | 2           | 0       | 2       | -                | 2                                       | -       | 0                    | 2       | -       | 2              | -       | 2       | -       |  |  |  |  |

*Aeromonas hydrophila* et *Pseudomonas Sp.*, sont présents dans les lésions des carpes, après le 8<sup>e</sup> et jusqu'au 13<sup>e</sup> jour. Leurs effectifs, relativement réduits, sur les boîtes de Pétri ne semblent pas influencer le développement des colonies de la bactérie de l'E.C.

Les essais d'isolement de ce germe à partir du rein ont toujours été négatifs.

#### 4. - DISCUSSION

Au cours d'expérimentations similaires (DUBOIS-DARNAUDPEYS et TUFFERY, à paraître), portant sur 60 carpes, la bactérie n'a été isolée par culture directe que sur 50 % des morts au mois de septembre, et 7,7 % en avril.

En fait, dans les conditions optimales d'isolement du germe, nous ne le retrouvons qu'une fois sur deux.

Il semble que l'ouverture de l'ulcère diminue considérablement les chances d'isolement de l'agent responsable des mortalités.

En effet, tant que le poisson ne présente qu'une dépigmentation au point d'injection, les résultats sont positifs pour 87,5 % des cas, mais après ce stade d'évolution des lésions, la positivité n'est que de 36,3 %.

Le premier ulcère caractéristique de la maladie apparaît généralement 10 jours après l'inoculation alors que le taux de mortalité atteint déjà 50 %.

Celle-ci est plus lente dans les jours qui suivent et il faut attendre 18 jours pour que la totalité des carpes soit morte.

Sur 8 animaux morts sans ulcère, 7 se sont révélés positifs au cours de la recherche de l'agent de l'Erythrodermatite. Sur 22 animaux morts avec présence d'ulcère, 8 seulement étaient porteurs du germe. Il semblerait donc que la quantité de germes présents dans le derme diminue progressivement, ce qui permettrait de penser que la mortalité qui suit l'ulcération finale n'est pas due au développement du germe mais à une toxine libérée lors de la mort des bactéries.

Pour cet essai, il n'y a pas eu de transport des poissons entre le moment de la mort et le premier prélèvement, mais il est possible que les cadavres des carpes aient séjourné dans l'eau plusieurs heures au cours de la nuit. Lors de l'ouverture de l'ulcère, l'agent de l'Erythrodermatite présent dans les tissus nécrosés est mis en contact direct avec l'élément liquide. La survie de la bactérie dans l'eau est pratiquement nulle, quels que soient la température et l'environnement abiotique dans lequel il se trouve (DUBOIS-DARNAUDPEYS et TUFFERY 1978). Il est donc probable que lors du séjour dans l'eau des poissons morts une partie ou la totalité du germe meurt, ce qui rend très difficile, voire impossible, son isolement.

Au cours de l'expérimentation, la bactérie considérée n'a jamais été isolée à l'état pur ; par contre nous avons pu constater, sur le milieu Trypticase Soy Agar enrichi en amidon, la présence de quelques *Aeromonas hydrophila* et surtout d'un certain nombre de *Pseudomonas Sp.* (50 à 300). Ceux-ci peuvent élaborer, au moment de la culture sur milieu nutritif, une bactériocine qui diffuse dans la gélose et possède un rôle inhibiteur vis-à-vis de certaines bactéries

de la flore environnante (HAMON — 1965). Expérimentalement, cette action antagoniste a pu être mise en évidence pour *Aeromonas salmonicida*, germe responsable de la furunculose des Salmonidés (DUBOIS-DARNAUDPEYS — 1976) et soupçonnée pour l'agent de l'Erythrodermatite (données non publiées). Au cours de la présente étude, nous avons cependant constaté qu'un effectif de 300 colonies de *Pseudomonas Sp.*/boîte de Pétri ne gêne pas la croissance de l'E.C. Mais il est possible qu'avec une plus forte concentration en bactéries antagonistes se manifeste un effet inhibiteur.

Pour éliminer l'action éventuelle de ces germes d'accompagnement, BOOTSMA préconise l'emploi d'un milieu Tryptose Blood Agar enrichi de sérum et additionné de deux antibiotiques : Ampicilline (50 U/ml) et Polymyxine B. Sulfate (50 IU/ml) (BOOTSMA, FIJAN et BLOMMAERT — 1977).

Lors des différents essais, un ensemencement a été fait en parallèle sur milieu T.B.A. et sur milieu T.B.A. complété en antibiotiques.

Après trois jours d'incubation à + 26° C, nous avons constaté sur le premier de ces milieux la présence de deux sortes de colonies des *pseudomonas* et des colonies typiques de l'Erythrodermatite mais nous n'avons jamais obtenu aucune culture sur le milieu T.B.A. contenant l'Ampicilline et la Polymyxine B. Sulfate.

Ces inoculations sur poissons nous ont permis de noter que l'agent de l'Erythrodermatite se manifestait, sur le milieu utilisé pour l'isolement, par l'apparition d'une faible quantité de colonies (20 à 50).

## 5. - CONCLUSION

La fiabilité de la technique bactériologique décrite est limitée du fait de l'obligation d'effectuer les prélèvements dans les premiers jours de la maladie, période pendant laquelle les lésions sont peu apparentes et la mortalité non décelable en milieu naturel.

Le diagnostic formel de l'Erythrodermatite de la carpe ne peut être envisagé uniquement par des essais d'isolement et d'identification de la bactérie, étant donné la survie presque nulle du germe dans les cadavres, même conservés dans les meilleures conditions pendant un temps limité.

Le dépistage systématique de l'Erythrodermatite de la carpe doit faire appel à des méthodes et des techniques sérologiques susceptibles de mettre en évidence des anticorps spécifiques du germe.

Le rôle épidémiologique des cadavres de carpes mortes de l'E.C., comme source d'infection, est vraisemblablement des plus limité, voire inexistant.

## BIBLIOGRAPHIE

BOOTSMA R., FIJAN N.N., BLOMMAERT J., 1977.

Isolation and preliminary identification of the causative agent of carp erythrodermatite.

*Veterinarski Archiv.* 47 (6), 291-302.

DUBOIS-DARNAUDPEYS A., 1976.

Contribution à l'épidémiologie de la Furunculose des Salmonidés ; Devenir de *Aeromonas salmonicida* dans l'environnement dulçaquicole.

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie — PARIS VI.

DUBOIS-DARNAUDPEYS A., TUFFERY G., 1977.

Données expérimentales sur l'épidémiologie de l'Erythrodermatite de la carpe.

*Bull. Off. Int. Epiz.*, 87 (5-6), 443-444.

DUBOIS-DARNAUDPEYS A., TUFFERY G., 1978.

Etude expérimentale des conditions de survie de l'agent de l'Erythrodermatite de la carpe dans un environnement abiotique.

*Bull. Acad. Vét. de France*, 51, 101-106.

DUBOIS-DARNAUDPEYS A., TUFFERY G.

Etude expérimentale de la sensibilité de différentes espèces pisciaires à l'agent de l'Erythrodermatite de la carpe (E.C.).

*Bull. Acad. Vét. de France* (à paraître)

HAMON Y., 1965.

Bactérovirus et substances analogues, pathologie, biologie.

*Ann. Institut Pasteur*, 13 (15-16-17-18), 806-824.