

Marché public de services à finalité de recherches passé par procédure négociée sans publication préalable,
ci-après dénommé "CONVENTION DE RECHERCHES"

Cahier spécial des charges n° 03.02.03 - 22 - 5043

**Développement de nouveaux outils moléculaires pour la recherche de
Flavivirus et stratégies de détection des émergences en faune sauvage
dans un contexte « One Health »**

Convention de recherches
Rapport d'activités annuel
- 2023 -

SPW – DEMNA

M. Herman
V. De Waele
A. Licoppe
A. Terneus

SPW – ULIÈGE

L. Duran
S. Engelskirchen
F. Focroulle
J. Paternostre
A. Van Goethem

A. Mertens
A. Linden



TABLE DES MATIÈRES

1. État des lieux	2
2. Outils moléculaires pour la recherche spécifique de Flavivirus dans l'avifaune	5
3. Détection de virus au sein des espèces indigènes de chiroptères en Wallonie	11
4. Détection d'agents zoonotiques chez 3 espèces de rongeurs	15
5. Maladies potentiellement émergentes et veille sanitaire	25
5.1 Virus de la maladie hémorragique épizootique	25
5.2 Virus de la Peste porcine africaine	27
5.3 Mycobactéries	28
5.4 Virus de la maladie d'Aujeszky	32
5.5 Echinococcus multilocularis	38
5.6 Influenza aviaire	42
6. Collaborations et analyses mises en œuvre dans les CREAVES	44
7. Rapports de terrain & missions ponctuelles	44
8. Annexes	45
8.1 WildTub Wallonia 2023	46
8.2 Résultats des analyses réalisées dans les centres de revalidation	49
8.3 Résultats des analyses réalisées sur animaux trouvés morts ou achevés	83
8.4 Mortalités chez le Lièvre d'Europe en Région wallonne, automne 2023	108
8.5 Rapports d'autopsie	115

1. État des lieux

En 2023, l'équipe du Service Faune sauvage (FMV, ULiège) a réalisé des autopsies et analyses sur plus de 3000 animaux sauvages.

Les animaux ont été prélevés :

- pendant la saison de chasse (animaux présumés sains abattus en action de chasse)
- toute l'année, soit sur le terrain (cas particuliers des sangliers trouvés morts), soit en salle d'autopsie de la FMV (animaux trouvés morts ou abattus pour raison sanitaire ou piégés ainsi que ceux décédés dans les centres de revalidation pour espèces sauvages, les CREAVES). Quelques animaux d'élevage ou de captivité sont également inclus.

Les différentes catégories sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Distribution des espèces animales analysées en 2023.

		Cerf élaphe	Chevreuril	Sanglier	Lièvre	Renard	Blaireau	Raton laveur	Chauve -souris	Oiseaux	Hérisson	Castor	Ragondin	R. musqué	Autres*	
Surveillance événementielle	Surveillance ciblée	192	176	372	-	-	-	-	-	257	-	-	188	99	29	1313
	Trouvés morts	18	17	29	17	20	28	1	3	34	-	7	-	-	5	179
	Achèvements sanitaires	8	10	8	4	10	1	63	-	1	-	2	-	-	-	107
	Animaux d'élevage et en captivité	7	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	11	23
	Animaux de CREAVES	-	5	-	24	15	8	2	46	586	794	-	-	-	30	1510
		225	208	409	45	45	37	66	49	883	794	9	188	99	75	3132

(*) "Autres":

Surveillance ciblée : 6 daims, 9 mouflons, 14 Rats surmulots.

Trouvés morts : 1 chat sauvage, 1 fouine, 1 loup gris, 2 mouflons

Animaux d'élevage/ captivité : 1 bouquetin des Alpes, 3 furets, 2 lièvres de Patagonie, 3 loups gris, 1 mouffette, 1 wallaby de Benneth

Animaux de CREAVES : 1 belette, 2 chats sauvages, 14 écureuils, 9 fouines, 2 lapins de garenne, 1 martre, 1 putois

En ce qui concerne l'étude relative aux **Flavivirus** dans l'avifaune, 602 oiseaux ont été autopsiés et analysés en 2023. Plusieurs qPCR ont été réalisées et aucun échantillon n'a été détecté positif pour le virus du Nil occidental (WNV). Par contre, un autre flavivirus, le virus Usutu (USUV) a largement circulé au sein des populations en 2023. Sur la cohorte des 602 oiseaux, 88 oiseaux étaient qPCR USUV positifs (14,6 %) pour l'ensemble des espèces étudiées. Le merle noir (*Turdus merula*) représente l'espèce la plus fortement impactée par ce virus.

En 2023, 49 chiroptères (la plupart morts dans les CREAVES) ont été autopsiés. La cause principale de mortalité était d'origine traumatique et aucun cas suspect de rage (tableau nerveux ou comportement anormal associé à un contact rapproché avec un humain) n'a été rapporté. Néanmoins, les échantillons ont systématiquement été testés et tous les résultats des qRT-PCR **pan-Lyssavirus** étaient négatifs.

L'étude sur rongeurs initiée en 2022 a été maintenue en 2023 avec 302 animaux analysés. Parmi les 3 espèces étudiées (ragondin, rat musqué et surmulot), le rat musqué est l'espèce la plus fréquemment porteuse de 3 pathogènes (*Echinococcus multilocularis*, *Giardia spp* et *Toxoplasma gondii*). Le rat surmulot était plus souvent porteur de **Leptospires**. Les rongeurs

qui excrètent des *Leptospires* (via les urines) et des *Giardia* (via les matières fécales) peuvent ainsi souiller l'eau/le milieu environnant, source de contamination possible pour les humains. Sur base de ces résultats, des recommandations sont adressées aux agents forestiers et piégeurs qui manipulent ces espèces.

Les résultats des analyses réalisées dans le cadre de la détection précoce de pathogènes potentiellement émergents (*) et de la veille sanitaire (°) sont résumés ci-dessous.

Maladie hémorragique épizootique (MHE)* : les 370 sérums de ruminants sauvages testés pour détecter la présence d'anticorps anti-EHDV étaient négatifs. Il est difficile d'anticiper la propagation de la MHE mais pour traquer une éventuelle émergence, l'étude sérologique sera maintenue en automne 2024. En surveillance passive, aucun cervidé sauvage autopsié en 2023 n'a présenté de lésions suggestives justifiant une recherche directe du EHDV. Et aucun évènement de mortalité anormal n'a été notifié dans ces populations en Wallonie.

Peste porcine africaine* : le DEMNA a renforcé la surveillance passive notamment en augmentant le nombre de vétérinaires préleveurs et en intensifiant la communication dans le milieu cynégétique. En 2023, 40 sangliers trouvés morts ont été prélevés sur le terrain et analysés au LNR, ils étaient tous viro-négatifs.

***Mycobacterium tuberculosis complex** :** en saison de chasse, 756 carcasses ont été inspectées par l'équipe en 2023. Parmi celles-ci, 7 présentaient des lésions suspectes. Les résultats des qPCR MTC (*Mycobacterium tuberculosis complex*) se sont tous avérés négatifs. En surveillance passive, 16 cervidés (sur base de lésions suggestives) et 37 blaireaux (analyse systématique) ont été analysés. Tous les résultats des qPCR MTC étaient négatifs à l'exception d'un échantillon prélevé sur blaireau (positif *M. microti*). Pour rappel, les sangliers trouvés morts ne peuvent pas être transférés à la FMV. Donc aucune qPCR MTC n'est réalisée sur ces carcasses, seules les analyses liées à la Peste Porcine africaine sont réalisées par le LNR. En conclusion, les analyses réalisées en 2023 n'ont pas permis de détecter la présence de *Mycobacterium bovis*, et autres MTC, chez des espèces sauvages (cerfs, chevreuils, sangliers et blaireaux). Cette surveillance sera maintenue en 2024.

***Mycobacterium avium paratuberculosis* ° :** parmi les 34 cervidés analysés (sur base de lésions suggestives), 14 résultats étaient qPCR *Map* positifs. Concernant les autres espèces analysées (les blaireaux notamment), aucun cas *Map* positif n'a été détecté.

***Mycobacterium avium avium* ° :** cette mycobactérie a été isolée de 4 oiseaux et d'un cervidé.

Virus de la maladie d'Aujeszky ° : les prélèvements ont été réalisés sur sangliers abattus pendant la saison de chasse 2023 et 345 échantillons sanguins ont été testés (recherche d'anticorps dirigés contre ADV). La séroprévalence apparente globale était de 26,96 % (IC 95% : 22,27 – 31,64).

***Echinococcus multilocularis* ° :** 42 renards ont été analysés et 24 individus (57 %) étaient porteurs du parasite. Les dépouilles sont transmises au service Faune sauvage sur base volontaire ou via les CREAVER. L'échantillonnage 2023 n'est malheureusement pas représentatif de la population vulpine en Wallonie.

Influenza aviaire HP ° : dans le cadre de la collaboration avec Sciensano (analyses sur oiseaux chassés), aucun cas positif d'influenza aviaire HP n'a été mis en évidence par le LNR en 2023.

Les résultats concernant les animaux morts *dans les CREAVES* sont présentés dans l'annexe 8.2 et ceux relatifs aux animaux trouvés morts ou abattus pour raisons sanitaires *en milieu naturel* sont présentés dans l'annexe 8.3. En 2023, plus de 100 rapports d'autopsie ont été transmis aux chasseurs ou aux cantonnements, certains d'entre eux sont insérés dans l'annexe 8.5.

2. Outils moléculaires pour la recherche spécifique de Flavivirus dans l'avifaune

Parmi les Flavivirus, le virus du Nil occidental (WNV), le virus Usutu (USUV) et Bagaza (BAGV) sont transmis principalement par des moustiques et circulent au sein de nombreuses espèces d'oiseaux en Europe. WNV et USUV sont étroitement apparentés et ils se sont largement répandus en Europe ces dernières années. Ils se maintiennent principalement dans un cycle de transmission moustique-oiseau, l'homme et les autres mammifères étant considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques. Cependant, les récentes épidémies avec des cas de mortalité chez l'homme (principalement dûs au WNV) ont fait des flavivirus zoonotiques une préoccupation majeure en santé publique. Pour anticiper ces épidémies, il est essentiel de connaître les réservoirs naturels qui sont impliqués dans les phénomènes d'émergence, de connaître les facteurs climatiques favorisant et de comprendre les processus d'amplification virale. Au sein de l'avifaune européenne, les rapaces et corvidés, notamment, sont reconnus comme sensibles au WNV, ils représentent un groupe bien étudié. Cependant, l'implication d'autres espèces d'oiseaux comme les petits passereaux, qui sont des hôtes réservoirs importants, est peu connue or ils pourraient jouer un rôle dans la circulation locale des flavivirus.

Le service Faune sauvage, en collaboration avec le service de Pathologie, a mis en évidence la présence de USUV dans l'avifaune sauvage en Wallonie dès 2016. Il s'agissait d'une émergence vraie. Par la suite, USUV a continué à être détecté en Wallonie mais aucune analyse jusqu'à présent n'a pu mettre en évidence la présence de WNV dans notre région. En 2024, un projet de collaboration avec Sciensano sera mis en œuvre afin de couvrir les 3 régions en termes de détection WNV.

2.1 Objectif

Le projet de recherche ciblé 'Flavivirus' a pour objectif d'affiner la détection des flavivirus au sein de l'avifaune sauvage de Wallonie. Dans ce but, un large échantillonnage a été réalisé sur de nombreuses espèces d'oiseaux essentiellement morts dans les centres de soin (CREAVES). Des organes de choix ont été prélevés en autopsie et différents outils moléculaires ont été développés pour couvrir les flavivirus appartenant au complexe sérologique de l'encéphalite japonaise mais également pour détecter USUV et éventuellement WNV.

2.2 Méthode

2.2.1 Distribution spatio-temporelle de l'échantillonnage

Les oiseaux analysés proviennent principalement de 8 centres de revalidation de la faune sauvage répartis en Wallonie (CREAVES d'Andenne, Hotton, Namur, Ottignies, Perwez, Ransart, Theux, et Virelles, Figure 2). L'échantillonnage est aléatoire, tous les individus morts dans les centres sont analysés, quels que soient l'espèce, l'âge et le sexe. L'étude comprend également des oiseaux trouvés morts en dehors des CREAVES et signalés par divers collaborateurs de l'Université de Liège. La collecte des cadavres a été réalisée de manière continue tout au long de l'année 2023.

Figure 2 : Localisation des centres CREAVES collaborant dans l'étude Flavivirus 2023.



2.2.2 Procédure d'échantillonnage

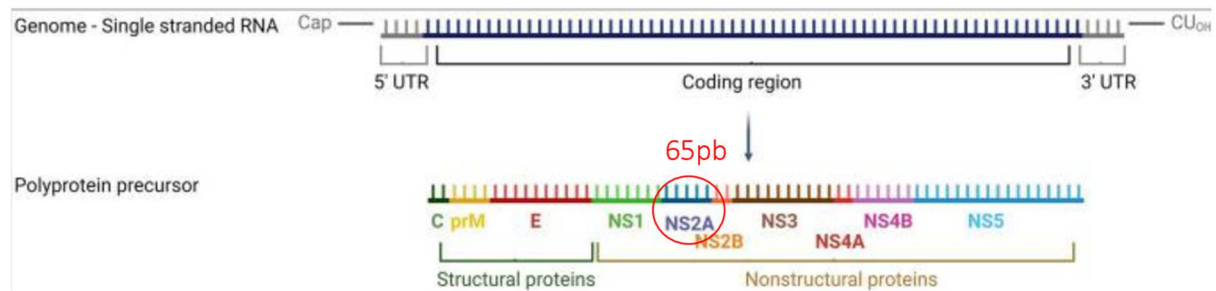
Pour des raisons pratiques, les cadavres sont conservés entiers à -20°C et bien identifiés (référence, historique) avant leur acheminement à la FMV. Dès réception des spécimens, un protocole standard de nécropsie est appliqué afin d'identifier les lésions macroscopiques et poser un diagnostic différentiel sur la cause de la mort. Dans le cadre de cette étude, un pool d'organes (système nerveux central, rate et foie) est systématiquement prélevé par individu. Le pool est conservé à -20°C pour traitement ultérieur (broyage et extraction d'ARN) et analyses moléculaires. Les cadavres qui ne sont plus en état d'être analysés sont éliminés.

2.2.3 Analyses moléculaires

Pour chaque individu (pool d'organes), une RT-qPCR est réalisée. Toutes les RT-qPCR sont réalisées en duplex en utilisant des amorces et des sondes spécifiques du gène qui code pour la protéine eucaryote β -actine, ce qui permet de vérifier la qualité de l'extraction des acides nucléiques de l'échantillon ainsi que le bon déroulement de la réaction PCR.

Dans le cadre de la détection précoce de la circulation de divers flavivirus à potentiel zoonotique, une première RT-qPCR est réalisée pour cibler les virus appartenant au complexe sérologique de l'encéphalite japonaise. Les amorces employées ciblent un fragment de 65 paires de bases situé dans la région codant pour la protéine non structurale NS2A (Figure 2.2.3.1)

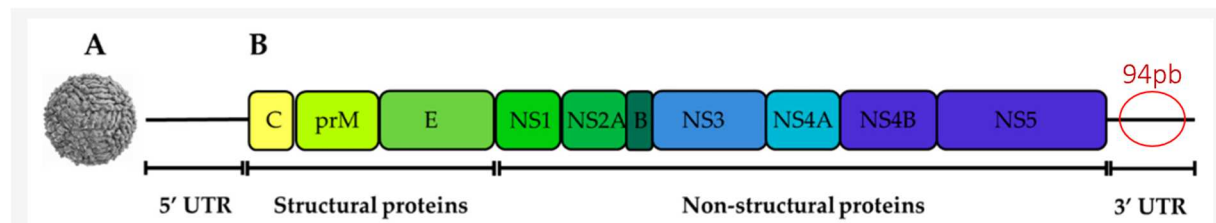
Figure 2.2.3.1 : "Schematic view of the USUV genome structure" (Holicki et. al, 2022).



Les primers utilisés pour cette RT-qPCR de "première ligne" (Forward JE-3533F 5'-TCA GYT GGG CCT TCT GGT-3' et reverse JE-3597R 5'-TGG CCG TCC ACC TCT TSC-3') ainsi que la sonde (JE-3553P 5'-TGT TYT TGG CCA CCC AGG AGG T-3') ont été conçus et validés par Elizalde *et al.*, 2020.

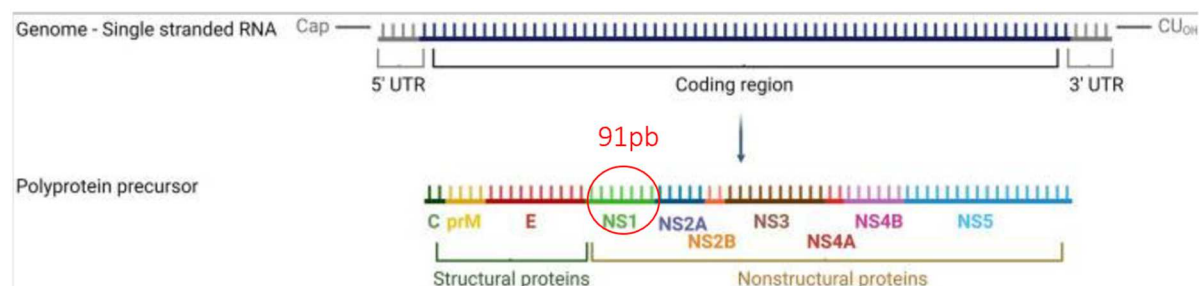
Les échantillons présentant un résultat positif lors de cette première RT-qPCR (CT < 39) sont ensuite soumis à deux RT-qPCR plus spécifiques. La seconde RT-qPCR, spécifique du génome du virus du Nil occidental (WNV), est réalisée, ciblant un segment de 94 paires de bases situé dans la région 3'UTR (Figure 2.2.3.2). Les primers de cette RT-qPCR (Forward : WNV_Fwd 5'-CGG AAG TYG RGT AKA CGG TGC TG-3' et reverse : WNV_Rev 5'- CGG TWY TGA GGG CTT ACR TGG -3') ainsi que la sonde (WNV_P 5'- WCC CCA GGW GGA CTG -3') émanent de l'article de Vázquez *et al.*, 2016.

Figure 2.2.3.2 : "The structure of WNV virion (A) and 11 kb long viral genome represented with one ORF encoding 3 structural and 7 non-structural proteins (B)" (Habarugira et al., 2020).



Pour les échantillons présentant un résultat WNV négatif, une troisième RT-qPCR est réalisée visant la détection d'un fragment spécifique du virus USUTU (USUV) de 91 paires de bases codant pour la protéine non-structurale NS1 (Figure 2.2.3.3).

Figure 2.2.3.3 : "Schematic view of the USUV genome structure" (Holicki et. al, 2022).



Les primers utilisés pour cette dernière RT-qPCR (Forward Usutu_Fwd 5'- CGT TCT CGA CTT TGA CTA-3'et reverse Usutu_Rev 5'- GCT AGT AGT AGT TCT TAT GGA -3') ainsi que la sonde (Usutu_P 5'-FAM-ACC GTC ACA ATC ACT GAA GCA T-BHQ1 -3') ont été conçus et validés par Elizalde *et al.*, 2020.

Tous les échantillons sont analysés en duplicat. Les résultats douteux sont considérés comme négatifs

Le kit Luna® Universal One-Step RT-qPCR (Enzyme thermosensible à démarrage rapide) a été utilisé pour ces 3 PCR.

Le processus de RT-qPCR commence par deux étapes initiales communes à toutes les PCR. Tout d'abord, la rétrotranscription se fait à 55°C pendant 10 minutes, suivie de l'activation de l'enzyme thermosensible à 95°C pendant 1 minute.

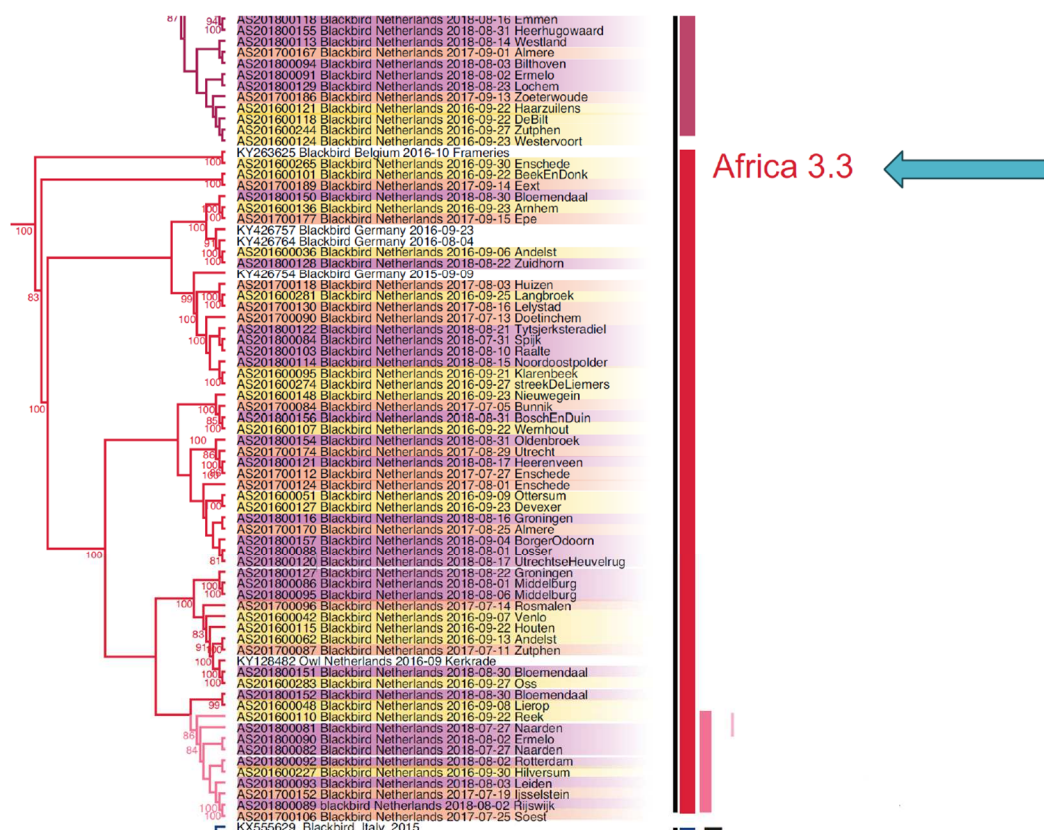
Ensuite, 45 cycles d'amplification sont réalisés, avec des caractéristiques spécifiques à chaque type de PCR :

- RT-qPCR USUV : Dénaturation à 95°C pendant 10 secondes ; Hybridation à 48°C pendant 20 secondes ; Élongation à 72°C pendant 20 secondes.
- RT-qPCR WNV : Dénaturation à 95°C pendant 15 secondes ; Hybridation et élongation à 60°C pendant 1 minute.
- RT-qPCR séro-complexe de l'encéphalite japonaise : Dénaturation à 95°C pendant 10 secondes ; Hybridation à 48°C pendant 1 minute et 20 secondes ; Élongation à 72°C pendant 20 secondes.

2.2.4 Phylogénomique

Des fragments de génome viral ont été séquencés utilisant des techniques de séquençage de première génération (Sanger). Grâce à l'analyse de ces fragments, la présence du lignage "Africa 3.3" a pu être détectée, un lignage déjà identifié auparavant aux Pays-Bas. Les amorces utilisées pour le séquençage feront l'objet d'une réévaluation en 2024 afin d'affiner les résultats.

Figure 2.2.4 : "Maximum likelihood phylogeny of USUV complete coding region sequences" (Oude Munnink BB et. Al, 2020).



2.3 Résultats des analyses 2023

En 2023, 602 oiseaux ont été autopsiés et analysés. Parmi ceux-ci, 88 échantillons se sont révélés positifs pour le virus Usutu (USUV), représentant une prévalence de 14,6 % pour l'ensemble des espèces étudiées. Sur la carte ci-dessous, les communes échantillonnées sont indiquées en gris. Les chiffres noirs indiquent le nombre total d'oiseaux analysés par commune, tandis que les chiffres rouges représentent le nombre d'oiseaux testés USUV positifs par commune. Aucun des oiseaux analysés n'a été testé positif pour le virus du Nil occidental (WNV).

Figure 2.3.1 : Distribution de l'échantillonnage 2023 dans les communes de Wallonie, 88 cas USUV positifs (en rouge) sur 602 oiseaux analysés (en noir).

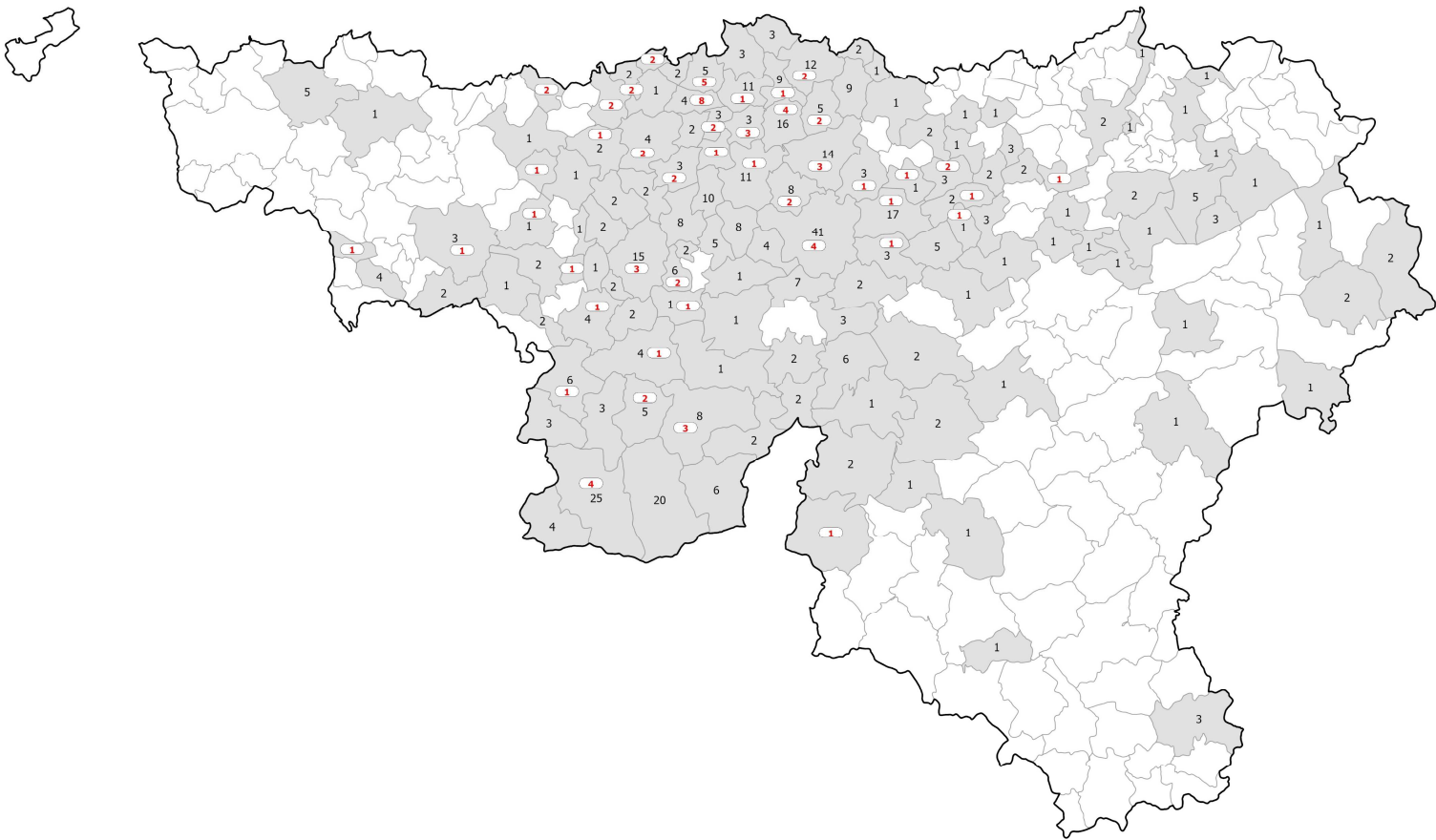


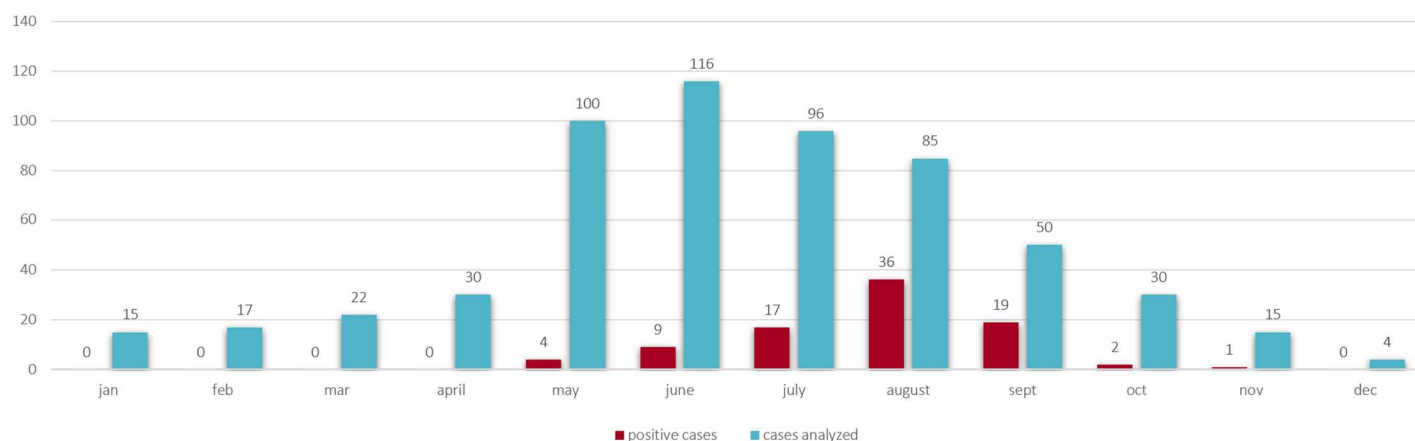
Tableau 2.3 : Répartition des cas positifs d'infection par le virus Usutu (USUV) parmi différentes espèces d'oiseaux, classées par ordre taxonomique. Le tableau indique, pour chaque espèce, le nombre de cas USUV positifs sur le total de cas analysés.

Ordre	Nom commun	Nom Scientifique	Cas USUV positifs / cas analysés
Accipitriformes	Épervier d'europe	<i>Accipiter nisus</i>	1/7
	Buse variable	<i>Buteo buteo</i>	3/20
Apodiformes	Martinet noir	<i>Apus apus</i>	3/7
Charadriiformes	Mouette rieuse	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	2/4
Columbiformes	Pigeon ramier	<i>Columba palumbus</i>	1/28
Falconiformes	Faucon crécerelle	<i>Falco tinnunculus</i>	2/21
Galliformes	Faisan de colchide	<i>Phasianus colchicus</i>	1/2
Passeriformes	Choucas des tours	<i>Coloeus monedula</i>	4/36
	Corneille noire	<i>Corvus corone</i>	1/18
	Corbeau freux	<i>Corvus frugilegus</i>	1/6
	Mésange bleue	<i>Cyanistes caeruleus</i>	1/13
	Hirondelle de fenêtre	<i>Delichon urbicum</i>	1/9
	Rouge gorge familier	<i>Erithacus rubecula</i>	1/13
	Geai des chênes	<i>Garrulus glandarius</i>	1/5
	Bergeronnette grise	<i>Motacilla alba</i>	1/5
	Moineau domestique	<i>Passer domesticus</i>	2/34
	Pie bavarde	<i>Pica pica</i>	1/20
	Fauvette à tête noire	<i>Sylvia atricapilla</i>	1/6
	Troglodyte mignon	<i>Troglodytes troglodytes</i>	2/8
	Grive musicienne	<i>Turdus philomelos</i>	1/13
	Merle noir	<i>Turdus merula</i>	53/121
Strigiformes	Chevêche d'Athéna	<i>Athene noctua</i>	1/8
	Effraie des clochers	<i>Tyto alba</i>	2/9
	Hibou grand-duc	<i>Bubo bubo</i>	1/8

Parmi les 88 cas USUV positifs, l'espèce la plus représentée est le Merle noir (*Turdus merula*). Comme indiqué dans le tableau ci-dessous, 53 merles sur les 121 analysés se sont révélés USUV positifs. Sur base des accueils dans les centres de soin, aucune autre espèce n'a été impactée de la sorte, les autres cas positifs sont dispersés dans une grande variété d'espèces appartenant à 8 ordres différents.

Sur le graphique suivant (Figure 2.3.2), la répartition saisonnière des cas USUV positifs est mise en évidence. Les mois présentant la plus grande incidence de cas positifs coïncident avec les hautes températures favorables à la reproduction et la survie des moustiques

Figure 2.3.2 : Distribution des cas USUV positifs par mois de prélèvements.



3. Détection de virus au sein des espèces indigènes de chiroptères en Wallonie

Certaines espèces de chauves-souris constituent des hôtes réservoirs privilégiés pour différents virus transmissibles à l'homme tels que le virus Hendra (Halpin et al., 2000), le virus Nipah (Yob et al., 2001), le SARS-Coronavirus (CoV) (Li et al., 2005) et le virus Marburg (Towner et al., 2009). Les chiroptères sont également reconnus comme hôtes réservoirs pour le virus Ebola (Leroy et al., 2005), le MERS-CoV (Memish et al., 2013) et le SARS-CoV-2 (Zhou et al., 2020). Parmi les virus recensés dans les populations de chauves-souris en Europe, la majorité appartient aux familles *Rhabdoviridae* et *Coronaviridae* mais de nouveaux virus ont été découverts récemment. Ces études sont en plein essor même si de nombreux 'gaps' subsistent. En effet, pour la plupart des virus isolés de chauves-souris, il existe peu de données concernant la saisonnalité et les voies d'excrétion virale, la prévalence du virus dans la population hôte, ainsi que l'abondance de ces hôtes. Une étude récente a recensé tous les virus potentiellement zoonotiques détectés chez des chauves-souris européennes mais aucune donnée ne concerne la Belgique (Kohl et al., 2021).

Objectif

L'objectif de cette étude est de détecter la présence de virus potentiellement à risque pour la santé humaine/animale et qui sont hébergés au sein des populations de chauves-souris en Wallonie. Le choix des espèces de chauves-souris étudiées est fonction de leur abondance relative, de leur comportement synanthrope mais également des contraintes liées aux prélèvements de terrain. Sur base de 2 études de priorisation réalisées à l'échelle européenne (Kohl et al., 2021, EFSA Journal 2023 ;21,3), une approche 'avec *a priori*' est proposée avec des qPCR spécifiques pour cibler les lyssavirus, coronavirus et flavivirus. Des échantillons supplémentaires conservés à -80°C sont également prévus pour des études envisagées en partenariat avec d'autres laboratoires. L'étude préliminaire lancée en 2022 dans les centres de revalidation (CREAVES) a mis en évidence la difficulté d'obtenir des échantillons de qualité que ce soit en *ante* ou *post mortem*. En 2023, outre la mise au point de PCR ciblées, des études de validation technique ont été réalisées afin d'optimiser les techniques de prélèvements sur le terrain.

Méthode

Pour les 2 approches réalisées en parallèle et détaillées ci-dessous, les déterminations de l'espèce et de l'âge des chiroptères ont été réalisées selon des guidelines de référence (C. Dietz et O. von Helversen, « Illustrated identification key to the bats of Europe », Tuebingen & Erlangen : 34-35, 2004).

1. *partim in vivo*

Ecouvillons oro-pharyngés et matières fécales prélevés lors de séances autorisées de capture sur les sites de swarming ou capture en ferme (en collaboration avec Plecotus et GeCoLab ULiege).

2. *partim post mortem*

Autopsies et échantillonnages ciblés (SNC, poumon, cœur, intestin grêle, foie, rate) sur des chiroptères provenant des centres de soin pour espèces sauvages (CREAVES) et autopsiés à la FMV.

3. Analyses de laboratoire

Protocoles qRT-PCR (soit émanant d'études publiées soit conçus in-house)

-Marston et al. *Pan-lyssavirus Real Time RT-PCR for Rabies Diagnosis. J Vis Exp. 2019 Jul 10;(149).*

-Elizalde et al., *A Duplex Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR for Simultaneous Detection and Differentiation of Flaviviruses of the Japanese Encephalitis and Ntaya Serocomplexes in Birds. Front Vet Sci. 2020*

Résultats des analyses 2023

En 2023, les autopsies et analyses ont porté sur 49 chauves-souris (46 récupérées dans les CREAVES, 2 via des privés et 1 via la Clinique Vétérinaire Universitaire - tableau ci-dessous). Parmi les espèces prélevées, il s'agit en majorité de Pipistrelles communes (*Pipistrellus pipistrellus*) (n=36), mais aussi d'Oreillards roux (*Plecotus auritus*) (n=3), d'un Oreillard gris (*Plecotus austriacus*), de Sérotines communes (*Eptesicus serotinus*) (n=4), de Murins à moustache (*Myotis mystacinus*) (n=4) et d'un Murin de Bechtein (*Myotis bechteinii*). Malgré ce faible échantillonnage, 6 des 24 espèces de chiroptères identifiés en Wallonie sont représentées.

Les échantillons ont été testés par qRT-PCR ciblant les genres lyssavirus et flavivirus. Tous les résultats des qRT-PCR pan-lyssavirus étaient négatifs et, par conséquent, aucun échantillon n'a été transmis au LNR (Sciensano) pour confirmation. Il est important de souligner que la cause principale de mortalité de ces chauves-souris était d'origine traumatique et qu'aucun cas suspect (tableau nerveux ou comportement anormal associé à un contact rapproché avec un humain) n'a été rapporté. Les résultats des qRT-PCR pan-flavivirus seront finalisés en 2024.

Tableau 3. : Autopsies de chiroptères en 2023, n = 49.

Référence	Animal	Date découverte	Provenance	Commune	CP	Contact	Cause de la mort
W23-1766	Pipistrelle commune	06-10-23	Bouffloulx	Châtelet	6200	CREAVES Ransart	Traumatique
W23-1767	Sérotine commune	11-08-23	Limbourg	Limbourg	4830	CREAVES Theux	Métabolique
W23-1768	Pipistrelle commune	30-08-23	Spa	Spa	4900	CREAVES Theux	Traumatique
W23-1769	Pipistrelle commune	10-07-23	Aywaille	Aywaille	4920	CREAVES Theux	Indéterminée
W23-1770	Pipistrelle commune	04-05-23	Hotton	Hotton	6990	CREAVES Hotton	Traumatique
W23-1771	Pipistrelle commune	18-08-23	Natoye	Hamois	5360	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1772	Pipistrelle commune	07-07-23	Theux	Theux	4900	CREAVES Theux	Métabolique
W23-1773	Sérotine commune	13-08-23	Malmedy	Malmedy	4960	CREAVES Theux	Infectieuse
W23-1774	Murin à moustaches	06-06-23	Goesnes	Ohey	5353	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1775	Pipistrelle commune	19-09-23	Fraipont	Trooz	4870	CREAVES Theux	Traumatique
W23-1776	Oreillard roux	15-08-23	Tavier	Anthisnes	4163	CREAVES Theux	Traumatique
W23-1777	Pipistrelle commune	06-05-23	Wanze	Wanze	4520	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1778	Pipistrelle commune	20-04-23	Clavier	Clavier	4560	CREAVES Theux	Traumatique

W23-1779	Murin de Bechstein	19-06-23	Hotton	Hotton	6990	CREAVES Hotton	Traumatique
W23-1780	Pipistrelle commune	nc	Rixensart	Rixensart	1330	CREAVES Ottignies	Traumatique
W23-1781	Pipistrelle commune	20-08-23	Andenne	Andenne	5300	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1782	Pipistrelle commune	24-08-23	Marchin	Marchin	4570	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1783	Sérotine commune	16-04-23	Bure	Tellin	6927	CREAVES Hotton	Traumatique
W23-1784	Pipistrelle commune	30-08-23	Amay	Amay	4540	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1785	Pipistrelle commune	06-07-23	Sart-Tilman	Liège	4031	CVU	Traumatique
W23-1786	Oreillard roux	04-05-23	Leftay	Spa	4900	CREAVES Theux	Traumatique
W23-1787	Murin à moustaches	28-08-23	Andenne	Andenne	5300	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1788	Oreillard roux	04-05-23	Hotton	Hotton	6990	CREAVES Hotton	Traumatique
W23-1789	Pipistrelle commune	22-05-23	Pepinster	Pepinster	4860	CREAVES Theux	Traumatique
W23-1790	Pipistrelle commune	01-05-23	Namur	Namur	5000	CREAVES Namur	Traumatique
W23-1791	Pipistrelle commune	19-04-23	Maillen	Assesse	5330	CREAVES Namur	Traumatique
W23-1792	Pipistrelle commune	30-04-23	Temploux	Temploux	5020	CREAVES Namur	Infectieuse
W23-1793	Pipistrelle commune	20-03-23	Tamines	Sambreville	5060	CREAVES Namur	Indéterminée
W23-1794	Pipistrelle commune	13-03-23	Bruxelles	Bruxelles	1000	CREAVES Namur	Infectieuse
W23-1795	Pipistrelle commune	05-05-23	Havelange	Dinant	5370	CREAVES Namur	Indéterminée
W23-1796	Pipistrelle commune	03-05-23	Targnon, 45	Stoumont	4987	CREAVES Theux	Traumatique
W23-1797	Murin à moustaches	18-10-23	Bas-Oha	Wanze	4520	CREAVES Andenne	Infectieuse
W23-1798	Pipistrelle commune	05-07-23	Glimes	Incourt	1315	CREAVES Perwez	Métabolique
W23-1799	Pipistrelle commune	13-09-23	Dion-Valmont	Chaumont-Gistoux	1325	CREAVES Perwez	Traumatique
W23-1800	Pipistrelle commune	06-09-23	Jandrain-Jandrenouille	Orp-Jauche	1350	CREAVES Perwez	Indéterminée
W23-1801	Pipistrelle commune	02-12-23	NC	NC	NC	CREAVES Perwez	Traumatique
W23-1802	Pipistrelle commune	10-10-23	Ransart	Charleroi	6043	CREAVES Ransart	Traumatique
W23-1803	Pipistrelle commune	26-09-23	Andenne	Andenne	5300	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1804	Pipistrelle commune	23-09-23	Andenne	Andenne	5300	CREAVES Andenne	Traumatique
W23-1805	Pipistrelle commune	12-03-23	Jambes	Namur	5100	CREAVES Namur	Métabolique
W23-1806	Pipistrelle commune	20-07-23	Auvelais	Sambreville	5060	CREAVES Namur	Métabolique
W23-1807	Pipistrelle commune	26-07-23	Ciney	Ciney	5590	CREAVES Namur	Métabolique
W23-1808	Murin à moustaches	nc	Namur	Namur	5000	CREAVES Namur	Traumatique

W23-1809	Pipistrelle commune	12-07-23	Floreffe	Floreffe	5150	CREAVES Namur	Traumatique
W23-1810	Oreillard gris	05-02-23	Moustier-sur-Sambre	Jemeppe-sur-Sambre	5190	CREAVES Namur	Indéterminée
W23-1811	Pipistrelle commune	08-07-23	Rouveroy	Estinnes	7120	CREAVES Virelles	Indéterminée
W23-1812	Sérotine commune	07-07-23	Limal	Wavre	1300	A.Van Goethem	Infectieuse
W23-1813	Pipistrelle commune	16-09-23	Rendeux	Rendeux	6787	J.Paternostre	Traumatique
W23-1814	Pipistrelle commune	17-12-23	Landenne,	Andenne	5300	CREAVES Andenne	Traumatique

4. Détection d'agents zoonotiques chez 3 espèces de rongeurs (suite de l'étude 2022)

Le ragondin (*Myocastor coypus*) fait partie des espèces invasives en Wallonie, il est répandu dans la région Sambre-Meuse et en Lorraine belge (<http://biodiversité.wallonie.be>). Sur base d'études réalisées dans les pays voisins confrontés à des populations croissantes de ragondins, 4 agents pathogènes majeurs détectés chez ces rongeurs sont zoonotiques. Il s'agit des leptospires, de *Giardia* spp, de *Toxoplasma gondii* et d'*Echinococcus multilocularis*. Le présent projet a débuté en 2022 et il s'étend sur 2 années. Des outils moléculaires ont été développés pour détecter ces agents pathogènes au départ de différents organes prélevés en *post mortem*. Outre le ragondin, l'étude concerne également 2 autres espèces de rongeurs sauvages présents en Wallonie : le rat musqué (*Ondatra zibethicus*) et le rat surmulot (*Rattus norvegicus*) qui peuvent eux aussi être porteurs des agents pathogènes cités ci-dessus.

Cette étude sur les agents zoonotiques présents chez les ragondins (Service Faune sauvage, ULiège) est menée conjointement à un suivi génétique des populations de ragondins (Service de Génétique, F. Farnir, ULiège). Une collaboration avec le SPW (CiEi - Etienne Branquart) a été initiée, elle permet de récolter les espèces concernées qui sont ensuite transférées en salle d'autopsie (à la FMV) pour réaliser les prélèvements ciblés. Les analyses moléculaires sont réalisées dans les laboratoires du service Faune sauvage et le financement de cette étude est pris en charge par le SPW et l'ULiège.

Objectif

Vu la proximité de ces rongeurs avec l'homme et les agents zoonotiques qu'ils sont susceptibles de véhiculer et d'excréter dans l'eau, l'objectif de cette étude est de déterminer si ces animaux sont porteurs de ces pathogènes et, le cas échéant, d'en déterminer la prévalence. L'objectif est également de fournir des recommandations en termes d'hygiène et de biosécurité pour les agents (piégeurs et agents forestiers) du SPW.

Méthode

Comme en 2022, les rongeurs ont été fournis par les piégeurs du SPW qui les ont acheminés frais vers les congélateurs de collecte du Service Faune sauvage. Nous tenons à remercier chaleureusement les piégeurs qui ont intensément participé à ce projet.

Le service Faune sauvage a organisé le transfert des carcasses vers l'ULiège. Les autopsies et les prélèvements ont systématiquement été réalisés dans la salle d'autopsie de la FMV. Les organes ont été sélectionnés en fonction du tropisme respectif de chaque pathogène : rein (*Leptospira* spp.), système nerveux central (*Toxoplasma gondii*), contenu intestinal (*Giardia* spp.) et foie (*Echinococcus multilocularis*). Les échantillons ont été conservés à -20°C pour analyses ultérieures. Après extraction d'ADN (NucleoSpin DNA Stool, Macherey-Nagel, Allemagne) les qPCR dédiées ont été réalisées selon les protocoles suivants :

○ *Echinococcus multilocularis*:

From : « Real time PCR to detect the environmental faecal contamination by *Echinococcus multilocularis* from red fox stools » ; Knapp et al. ; Vet. Parasitology ; 201, 1–2, 2014

Amorces *Echinococcus m.* (2 µl):

0,75 µl	Em_rrnL-f	5'- CTG TGA TCT TGG TGT AGT AGT TGA GAT TT -3'	10 µM
0,75 µl	Em_rrnL -r	5'- GGC TTA CGC CGG TCT TAA CTC -3'	10 µM
0,5 µl	Em_rrnL -p	5'- TGG TCT GTT CGA CCT TTT TAG CCT CCA T -3'	10 µM

rrnL : Large subunit of ribosomal RNA

Amorces β-Actine (2 µl):

0,75 µl	Act-F	5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C -3'	10 µM
0,75 µl	Act -R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T -3'	10 µM
0,5 µl	Act-P	5'-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-3'	10 µM



→ Taille amplicon *Echinococcus m.*: 84 bp

→ Taille amplicon β-Actine : 131 bp

Mix réactionnel (20 µl):

- 2 µl ADN
- 2 µl Amorces *Echinococcus m.*
- 2 µl Amorces β-Actine
- 10 µl qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics)
- 4 µl H₂O nuclease free

Cibles:

Echinococcus m. FAM
β-Actine HEX/VIC

Programme:

95°C	3 min	X 1
95°C	5 s	X 40
60°C	20 s	

○ *Giardia spp.*:

From : N. Jothikumar, Jennifer L. Murphy, Vincent R. Hill; Detection and identification of *Giardia* species using real-time PCR and sequencing; Journal of Microbiological Methods; 2021.

Amorces *Giardia spp.* (2 µl):

0,75 µl	18S_PGiardia_F	5'- ATC CGG TCG ATC CTG CCG -3'	10 µM
0,75 µl	18S_PGiardia_R	5'- ACG TCT TGG CGC CGG GTT -3'	10 µM
0,5 µl	18S_PGiardia_P	5'- CGG CGG ACG GCT CAG GA -3'	10 µM

Amorces β-Actine (2 µl):

0,75 µl	Act-F	5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C -3'	10 µM
0,75 µl	Act -R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T -3'	10 µM
0,5 µl	Act-P	5'-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-3'	10 µM



→ Taille amplicon Giardia spp.: 156 bp

→ Taille amplicon β -Actine : 131 bp

Mix réactionnel (20 μ l):

- 2 μ l ADN
- 2 μ l Amorce Giardia spp.
- 2 μ l Amorce β -Actine
- 10 μ l qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics)
- 4 μ l H₂O nuclease free

Cibles:

Giardiaspp. FAM
 β -Actine HEX/VIC

Programme:

95°C	10 min	X 1
95°C	10 s	X 45
60°C	40 s	

○ Leptospira spp.:

From : Giry, Claude & Roquebert, Benedicte & Li-Pat-Yuen, Ghislaine & Gasque, Philippe & Jaffar-Bandjee, Marie. (2017). Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic Leptospira genomes using a multiplex TaqMan® assay. BMC Microbiology. 17. 10.1186/s12866-017-1019-1.

Amorces *Leptospira* spp (2 μ l):

0,75 μ l	LeptoF	5' – AGA ATT GGG ATG AGG TGT GGA TAG – 3'	10 μ M
0,75 μ l	LeptoR	5' – CTA CCC CCG CAA CTA AAC AAC TG – 3'	10 μ M
0,5 μ l	LeptoP	5' – CCG AAA TAG GTT TAG GCC T – 3'	10 μ M

Amorces β -Actine (2 μ l):

0,75 μ l	Act-F	5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C -3'	10 μ M
0,75 μ l	Act -R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T -3'	10 μ M
0,5 μ l	Act-P	5'-TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T-3'	10 μ M

→ Taille amplicon Leptospira spp.: 111 bp

→ Taille amplicon β -Actine : 131 bp

Mix réactionnel (20 μ l):

- 2 μ l ADN
- 2 μ l Amorce Leptospirose
- 2 μ l Amorce β -Actine
- 10 μ l qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics)
- 4 μ l H₂O nuclease free

Cibles:

Leptospirose FAM
 β-Actine HEX/VIC

Programme:

95°C	3 min	X 1
95°C	5 s	X 40
60°C	20 s	

○ *Toxoplasma gondii* :

From : Lin et al., "Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*". J Clin Microbiol. 2000;38(11):4121-4125. doi:10.1128/JCM.38.11.4121-4125.2000

Amorces *Toxoplasma gondii* (2 µl):

0,75 µl	Toxo-F	5'- TCC CCT CTG CTG GCG AAA AGT-3'	10 µM
0,75 µl	Toxo-R	5'- AGC GTT CGT GGT CAA CTA TCG ATT G-3'	10 µM
0,5 µl	Toxo-P	5'- TCT GTG CAA CTT TGG TGT ATT CGC AG-3'	10 µM

Amorces β-Actine (2 µl):

0,75 µl	Act-F	5'-CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C -3'	10 µM
0,75 µl	Act -R	5'-CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T -3'	10 µM
0,5 µl	Act-P	5'-6-TAMN/TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T/3IAbRQSp-3'	10 µM

→ Taille amplicon *Toxoplasma g.* : 98 bp

→ Taille amplicon B-Actine : 131 bp

Mix réactionnel (20 µl):

2 µl ADN
 2 µl Amorces *Toxoplasma g.*
 2 µl Amorces β-Actine
 10 µl qPCR BIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics)
 4 µl H₂O nuclease free

Cibles:

Toxoplasma g. FAM
 β-Actine HEX/VIC

Programme:

95°C	3 min	X 1
95°C	5 s	X 40
60°C	20 s	

Résultats des analyses 2023

Au total, 301 animaux (188 ragondins, 99 rats musqués et 14 rats surmulots) ont été autopsiés et 979 analyses moléculaires ont été réalisées pour les 4 agents pathogènes ciblés.

Tableau 4.1 : Prévalence des 4 agents pathogènes pour chaque espèce de rongeurs en 2023.

	Rongeurs 2023							
	<i>E. multilocularis</i>		<i>Giardia</i> spp.		<i>Leptospira</i> spp		<i>T. gondii</i>	
	n positifs	Prévalence(%)	n positifs	Prévalence(%)	n positifs	Prévalence(%)	n positifs	Prévalence(%)
Ragondins (n=188)	6	3,19%	0	0,00%*	0	0,00%	14	7,44%
Rats musqués (n=99)	22	22,44%*	14	14,43%Δ	3	3,03%	15	15,15%
Rats surmulots (n=14)	0	0,00%	0	0,00%	3	21,42%	1	7,14%

*Rats musqués : 1 analyse non réalisée

•Ragondins : 5 analyses non réalisées

ΔRats musqués : 2 analyses non réalisées

Figure 4.1 : Prévalence des 4 agents pathogènes pour chaque espèce de rongeurs en 2023.

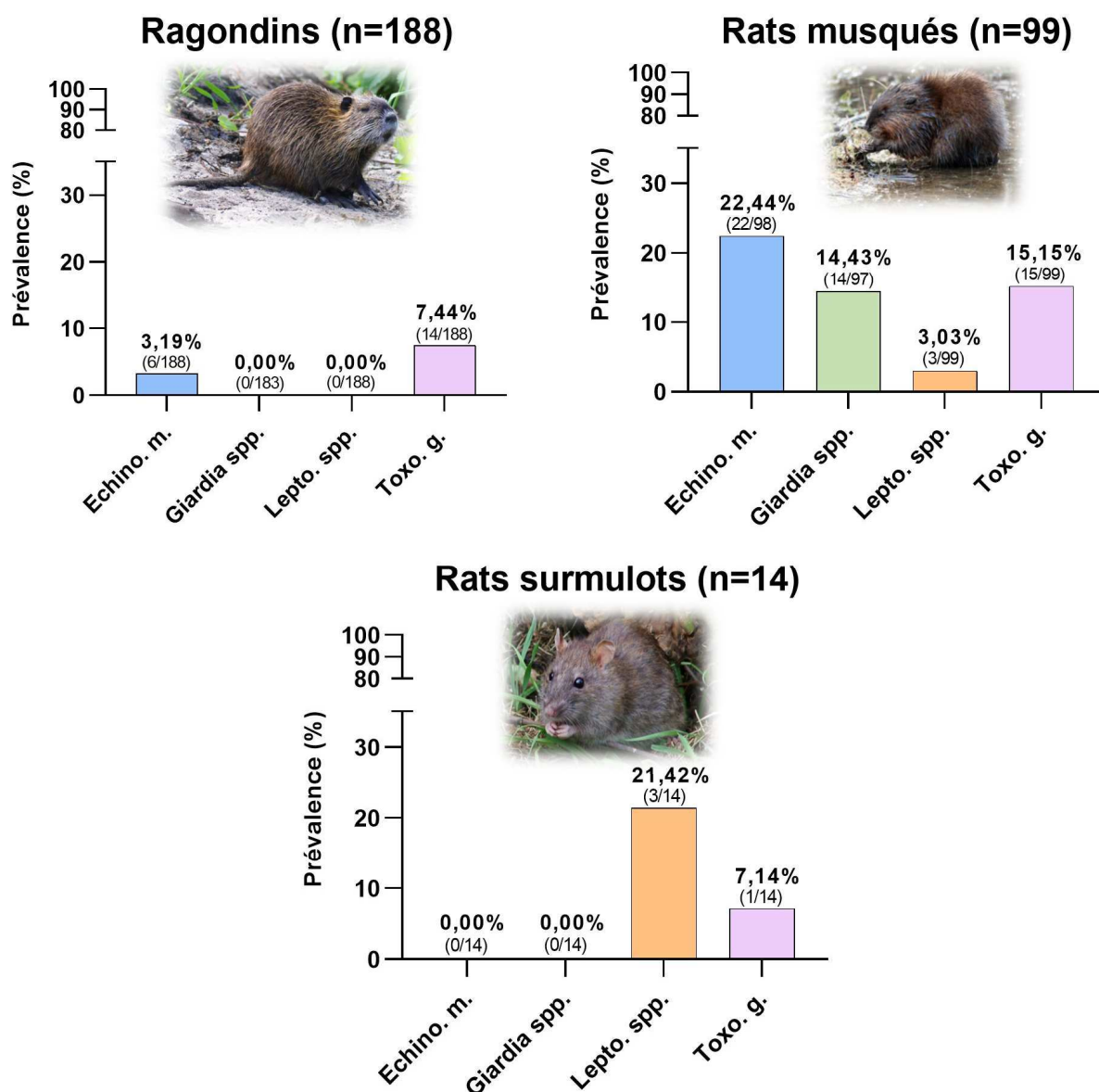
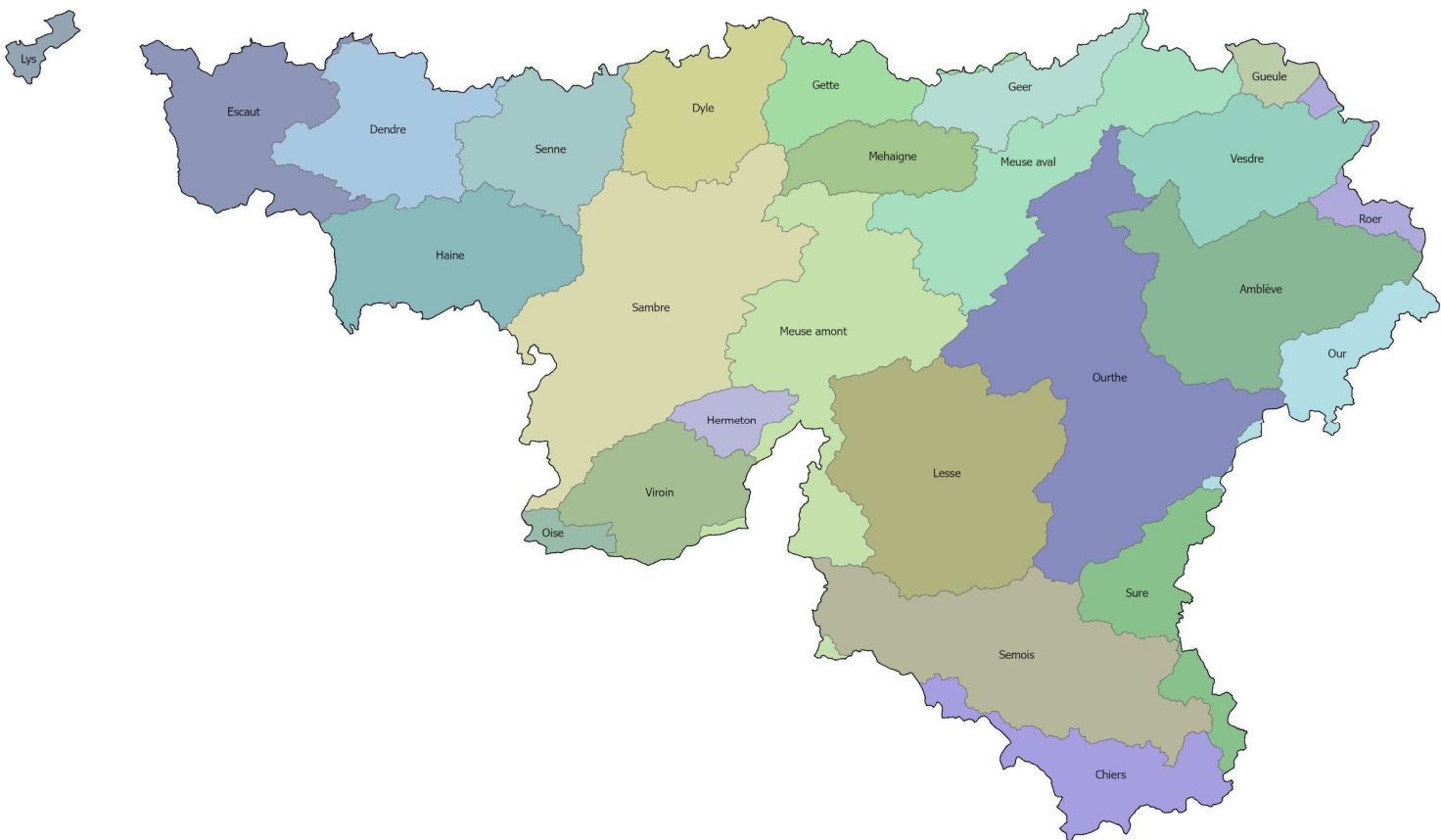


Figure 4.2 : Carte des bassins versants principaux de Wallonie.



SPW | SPW Digital.

Tableau 4.2 : Répartition géographique des rongeurs testés pour *Echinococcus multilocularis* en 2023.

Bassin versant principal	Communes	Ragondins analysé (n positifs)	Rats musqués analysés (n positifs)	Rats surmulots analysés (n positifs)
Chiers	Meix-devant-Virton (6769)		6	
	Musson (6750)	5	2	
	Rouvroy (6767)	32 (1)	4	
	Virton (6760)	9 (1)	2 (1)*	1
Hermeton	Philippeville (5600)		4 (1)	1
Lesse	Libramont (6800)		3 (2)	
Meuse Amont	Doische (5680)	28	2	
Oise	Chimay (6464)	2		
Sambre	Beaumont (6500)	1		1
	Cerfontaine (5630)	2		
	Erquelines (5660)	5		1
	Florennes (5620)		10 (1)	2
	Froidchapelle (6440)	6	5 (1)	1
	Ham-sur-Heure-Nalinnes (6120)	1	4 (1)	
	Philippeville (5600)	2		
	Thuin (6530)	4 (1)		1
	Walcourt (5650)		9	
Semois	Bièvre (5555)	16		

	Bouillon (6830)	44 (2)	10	
	Chiny (6810)		18 (5)	
	Florenville (6824)		2 (1)	
	Musson (6750)		1 (1)	
	Neufchâteau (6840)		1 (1)	
	Paliseul (6850)		4 (3)	
	Tintigny (6730)		3 (2)	
	Vresse-sur-Semois (5550)		4 (1)	
Viroin	Chimay (6464)			1
	Couvin (5660)	9	1	3
	Philippeville (5600)	9		2
	Viroinval (5670)	13 (1)	4 (1)	
TOTAL		188 (6)	99 (22)	14 (0)
PREVALENCE <i>E. multilocularis</i>		3,19%	22,44%	0,00%

*Rats musqués : 1 analyse non réalisée

Tableau 4.3 : Répartition géographique des rongeurs testés pour *Giardia* spp. en 2023.

Bassin versant principal	Communes	Ragondins analysés (n positifs)	Rats musqués analysés (n positifs)	Rats surmulots analysés (n positifs)
Chiers	Meix-devant-Virton (6769)		6 (2)	
	Musson (6750)	5	2	
	Rouvroy (6767)	32	4	
	Virton (6760)	9•	2	1
Hermeton	Philippeville (5600)		4 (1)	1
Lesse	Libramont (6800)		3 (1)	
Meuse Amont	Doische (5680)	28	2	
Oise	Chimay (6464)	2		
Sambre	Beaumont (6500)	1		1
	Cerfontaine (5630)	2		
	Erquelinnes (6560)	5		1
	Florennes (5620)		10 (1)	2
	Froidchapelle (6440)	6	5 (1)	1
	Ham-sur-Heure-Nalinnes (6120)	1	4	
	Philippeville (5600)	2		
	Thuin (6530)	4		1
	Walcourt (5650)		9 (1)	
Semois	Bièvre (5555)	16		
	Bouillon (6830)	44•	10 (1)	
	Chiny (6810)		18 (3)Δ	
	Florenville (6824)		2	
	Musson (6750)		1	
	Neufchâteau (6840)		1 (1)	
	Paliseul (6850)		4 (1)	

	Tintigny (6730)		3 (1)	
	Vresse-sur-Semois (5550)		4	
Viroin	Chimay (6464)			1
	Couvin (5660)	9	1Δ	3
	Philippeville (5600)	9		2
	Viroinval (5670)	13	4	
TOTAL		188 (0)	99 (14)	14 (0)
PREVALENCE <i>Giardia</i> spp		0,00%	14,43%	0,00%

•Ragondins : 5 analyses non réalisées
ΔRats musqués : 2 analyses non réalisées

Tableau 4.4 : Répartition géographique des rongeurs testés pour *Leptospira* spp. en 2023.

Bassin versant principal	Communes	Ragondins analysés (n positifs)	Rats musqués analysés (n positifs)	Rats surmulots analysés (n positifs)
Chiers	Meix-devant-Virton (6769)		6	
	Musson (6750)	5	2	
	Rouvroy (6767)	32	4	
	Virton (6760)	9	2	1
Hermeton	Philippeville (5600)		4	1 (1)
Lesse	Libramont (6800)		3	
Meuse Amont	Doische (5680)	28	2 (1)	
Oise	Chimay (6464)	2		
Sambre	Beaumont (6500)	1		1
	Cerfontaine (5630)	2		
	Erquelinnes (6560)	5		1
	Florennes (5620)		10 (1)	2
	Froidchapelle (6440)	6	5	1 (1)
	Ham-sur-Heure-Nalinnes (6120)	1	4	
	Philippeville (5600)	2		
	Thuin (6530)	4		1 (1)
	Walcourt (5650)		9	
Semois	Bièvre (5555)	16		
	Bouillon (6830)	44	10	
	Chiny (6810)		18 (1)	
	Florenville (6824)		2	
	Musson (6750)		1	
	Neufchâteau (6840)		1	
	Paliseul (6850)		4	
	Tintigny (6730)		3	
	Vresse-sur-Semois (5550)		4	
Viroin	Chimay (6464)			1
	Couvin (5660)	9	1	3
	Philippeville (5600)	9		2
	Viroinval (5670)	13	4	
TOTAL		188 (0)	99 (3)	14 (3)
PREVALENCE <i>Leptospira</i> spp		0,00%	3,03%	21,42%

Tableau 4.5 : Répartition géographique des rongeurs testés pour *Toxoplasma gondii* en 2023.

Bassin versant principal	Communes	Ragondins analysés (n positifs)	Rats musqués analysés (n positifs)	Rats surmulots analysés (n positifs)
Chiers	Meix-devant-Virton (6769)		6	
	Musson (6750)	5	2 (1)	
	Rouvroy (6767)	32	4	
	Virton (6760)	9	2 (2)	1
Hermeton	Philippeville (5600)		4 (1)	1
Lesse	Libramont (6800)		3	
Meuse Amont	Doische (5680)	28 (3)	2 (1)	
Oise	Chimay (6464)	2		
Sambre	Beaumont (6500)	1		1
	Cerfontaine (5630)	2		
	Erquelinnes (6560)	5		1
	Florennes (5620)		10 (1)	2
	Froidchappelle (6440)	6 (1)	5	1
	Ham-sur-Heure-Nalinnes (6120)	1	4 (1)	
	Philippeville (5600)	2 (1)		
	Thuin (6530)	4		1
	Walcourt (5650)		9	
Semois	Bièvre (5555)	16		
	Bouillon (6830)	44 (8)	10 (2)	
	Chiny (6810)		18 (1)	
	Florenville (6824)		2	
	Musson (6750)		1 (1)	
	Neufchâteau (6840)		1	
	Paliseul (6850)		4 (1)	
	Tintigny (6730)		3 (2)	
	Vresse-sur-Semois (5550)		4	
Viroin	Chimay (6464)			1
	Couvin (5660)	9	1	3 (1)
	Philippeville (5600)	9 (1)		2
	Viroinval (5670)	13	4 (1)	
TOTAL		188 (14)	99 (15)	14 (1)
PREVALENCE <i>T. gondii</i>		7,44%	15,15%	7,14%

Les résultats 2023 présentent les mêmes tendances que ceux de 2022. Les rats musqués sont plus souvent porteurs (22,44 %) de larves d'*Echinococcus multilocularis* au niveau du foie que les ragondins (3,19 %). Ce parasite, lorsqu'il est sous sa forme kystique dans le foie de son hôte intermédiaire (ici le rat musqué ou le ragondin), ne représente pas un risque direct pour l'homme. Cependant, si les carcasses sont laissées le long des berges, l'animal mort, et par conséquent le parasite, peuvent être ingérés par un carnivore (notamment le renard roux) ce qui permet de boucler le cycle parasitaire. Par la suite, l'homme se contamine en ingérant accidentellement des œufs du parasite excrétés dans les matières fécales du renard. D'un point de vue pratique, il est important de ne pas laisser des carcasses de rongeurs le long des berges afin d'éviter d'entretenir le cycle du parasite « rongeur/renard ».

Toxoplasma gondii a également été plus souvent détecté chez les rats musqués (15,15 %) que chez les ragondins (7,44 %) et les rats surmulots (7,14 %) qui sont tous les trois des hôtes intermédiaires, le parasite étant retrouvé sous forme de kystes dans certains organes. Ce n'est pas le cas en Belgique mais dans les pays dans lesquels le ragondin est consommé, il est conseillé de bien cuire la viande avant de la consommer ou de la donner aux animaux domestiques.

En 2023, *Giardia* spp. n'a été détecté que chez des rats musqués (14,43 %). Les rats surmulots, quant à eux, sont davantage porteurs de Leptospires (21,42 %) que les rats musqués (3,03 %). Les rongeurs qui excrètent des leptospires (via les urines) et des *Giardia* (via les matières fécales) peuvent ainsi souiller l'eau/le milieu environnant, source de contamination possible pour les humains.

Recommandations pour les piégeurs et les agents forestiers

A l'instar des conseils fournis dans le rapport de 2022, nous insistons sur le fait que travailler dans un environnement aqueux et au contact de rongeurs porteurs d'agents pathogènes transmissibles à l'homme impose des règles de prudence. Même si les risques sont modérés, ils sont réels et justifient les mesures de précaution suivantes : ne jamais manipuler les rongeurs sans gants et remplacer régulièrement ces gants (abîmés/troués), prévoir des sacs hermétiques pour le transfert des carcasses et des bacs de transport dédiés, ne pas manger/boire lors des activités de piégeage, nettoyer et désinfecter gants, bottes et équipement tous les soirs. Il faut également désinfecter et protéger les plaies au niveau des mains et des avant-bras par des pansements étanches, éviter tout contact yeux/nez/bouche avec les mains ou gants souillés et se laver soigneusement les mains et les avant-bras (eau + savon) après avoir manipulé ces animaux ou le matériel de piégeage. Comme indiqué, il est aussi conseillé de ne pas laisser les carcasses piégées sur les berges afin de ne pas entretenir le cycle de certains parasites (*Echinococcus multilocularis* et *Toxoplasma gondii*).

5. Maladies potentiellement émergentes et veille sanitaire

Selon la définition du Code terrestre de l'OMSA, une maladie émergente désigne « une nouvelle apparition, chez un animal, d'une maladie, d'une infection ou d'une infestation ayant des répercussions significatives sur la santé animale ou humaine et résultant (a) de la modification d'un agent pathogène connu ou de sa propagation à une nouvelle aire géographique ou à une nouvelle espèce, ou (b) d'un agent pathogène non identifié antérieurement ou d'une maladie diagnostiquée pour la première fois ». Ainsi, on parle d'émergence pour une maladie véritablement nouvelle mais aussi d'émergence lorsqu'une maladie déjà connue ailleurs surgit dans une zone auparavant indemne (maladie exotique).

L'objectif est de détecter ces émergences le plus rapidement possible en faune sauvage et de mettre en œuvre des mesures de lutte s'il a été déterminé que cette émergence pouvait avoir un impact sur la faune sauvage, les animaux domestiques et/ou la santé humaine.

Pour remplir cet objectif, l'équipe ULiège utilise deux méthodes : des analyses ciblées, sur gibier présumé sain, abattu en période de chasse et des analyses sur animaux trouvés morts ou achevés pour raisons de santé. Ces deux méthodes et les analyses moléculaires qui en découlent permettent de mettre en évidence d'éventuels nouveaux pathogènes (volet « maladies émergentes ») mais également des agents déjà présents en faune sauvage (volet « veille sanitaire »). Les résultats sont présentés ci-dessous par agent pathogène.

5.1. Virus de la maladie hémorragique épizootique

La MHE est une maladie à transmission vectorielle, non zoonotique, qui concerne les ruminants domestiques et sauvages. Aux Etats-Unis, le Cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) est l'espèce la plus gravement touchée, la forme suraiguë présentant un taux de létalité élevé. La MHE circule dans des élevages bovins au Maghreb, depuis 2006. De nombreux foyers bovins puis des cas de MHE sur cerfs élaphe captifs et quelques cas sauvages (cerf élaphe et chevreuil) ont été détectés pour la première fois en Europe en 2022 en Italie puis en Espagne. Il a été démontré que l'origine du virus détecté en Europe était nord-africaine (sérotypage 8). En septembre 2023, des foyers bovins ont été détectés en France (Pyrénées-Atlantiques et Hautes-Pyrénées). Tout en étant une maladie saisonnière influencée par la biologie du vecteur, la rapidité de dispersion du virus est impressionnante. Sur une période de 10 mois, le virus s'est répandu du sud au nord de l'Espagne (soit plus 800 km depuis le premier foyer détecté en Andalousie en novembre 2022). En juin 2024, le signalement le plus septentrional se trouvait dans le département du Morbihan, en Bretagne, à quelques 600 km de la Belgique (source AFSCA). La MHE est une maladie à déclaration obligatoire en Belgique et elle est catégorisée 'D+E' pour les ruminants sauvages dans l'AHL, ce qui implique une stratégie de surveillance. Il s'agit d'une menace émergente qui impacte déjà les élevages de bovins en France mais très peu de données sont disponibles en ce qui concerne la situation chez les cervidés captifs ou sauvages. Un vaccin contre la MHE a obtenu une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) en France en août 2024 et un programme de vaccination a été lancé dans les élevages bovins pour ralentir la progression de la maladie.

Objectifs

Etant donné la progression rapide de la maladie dans les élevages bovins en France notamment, l'objectif est de détecter le plus précocement possible, par des approches directe et indirecte, le virus de la MHE (EHDV) au sein des populations de cervidés sauvages en Wallonie.

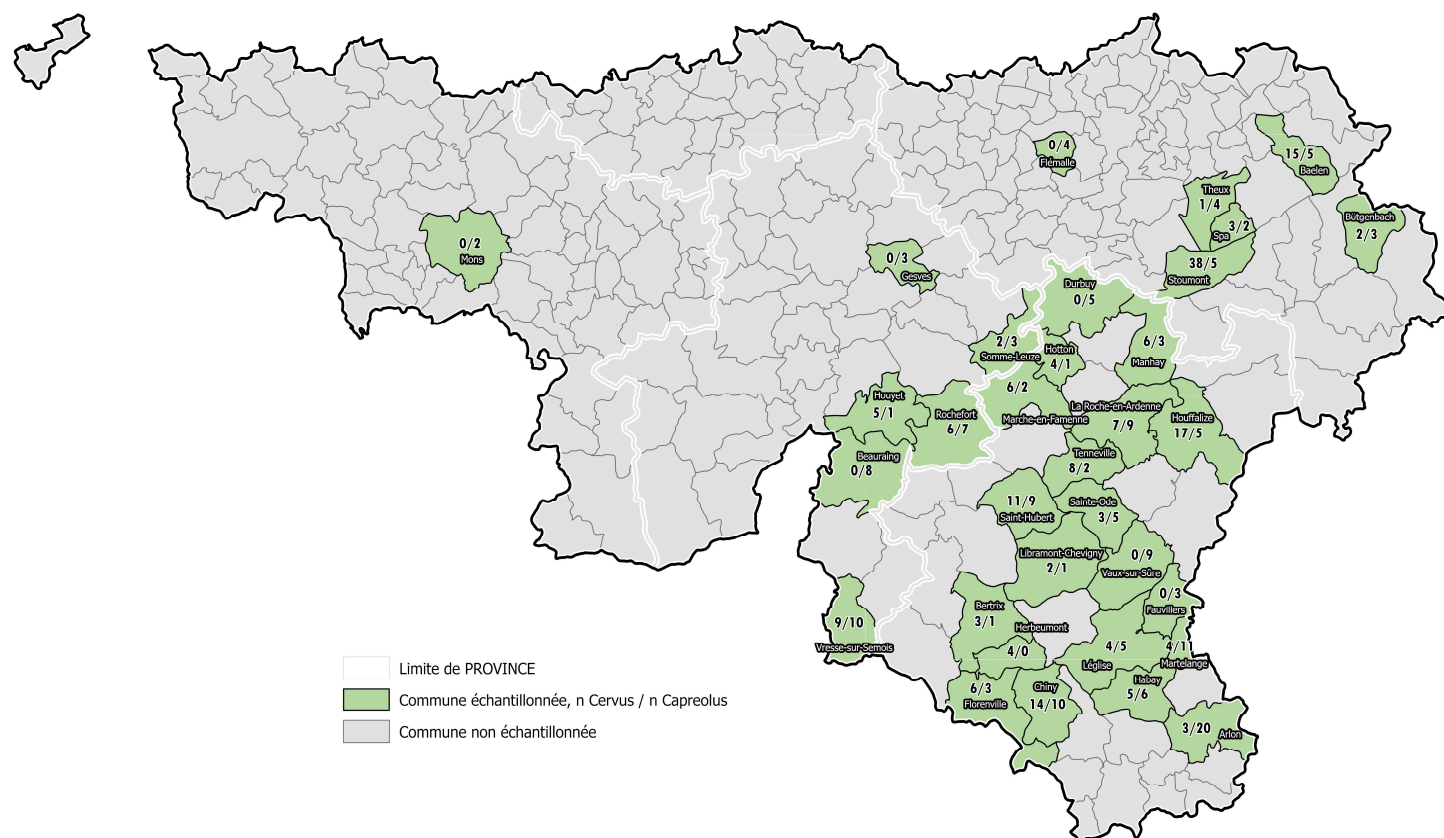
Méthode

Lors de la saison de chasse 2023, 370 échantillons sanguins ont été prélevés sur des animaux présumés sains (188 cerfs, 167 chevreuils, 6 daims et 9 mouflons) et sur différents territoires de chasse. Après centrifugation les sérums ont été testés pour détecter la présence d'anticorps anti-EHDV. Les critères de quantité et de qualité des sérums (pourcentage d'hémolyse) ont été notés. Un ELISA de compétition pour la détection des anticorps dirigés contre la protéine VP7 du EHDV (Innovative Diagnostics, référence EHDVC-5P) a été réalisé en duplicat. Les valeurs intrinsèques du kit ont été fournies par le fabricant (Se 99,8% et Sp 100%). Un sérum contrôle positif a systématiquement été inclus pour chaque plaque ELISA.

Résultats des analyses 2023

En 2023, tous les sérums testés pour détecter la présence d'anticorps anti-EHDV se sont révélés négatifs. Il est difficile d'anticiper la propagation de la MHE mais pour traquer une éventuelle émergence, l'étude sérologique sera maintenue en automne 2024. En surveillance passive, aucun cervidé sauvage autopsié en 2023 n'a présenté de lésions suggestives justifiant une recherche directe du EHDV. Et aucun évènement de mortalité anormal n'a été notifié dans ces populations en Wallonie.

Figure 5.1.1 : Répartition géographique des ruminants sauvages prélevés en Wallonie et testés pour détecter la présence d'anticorps anti EHDV en 2023.



5.2. Virus de la Peste porcine africaine

Pour rappel, en automne 2020 la Commission Européenne a approuvé la levée des zones réglementées (le 20/11/2020) et la Belgique a retrouvé son statut indemne de Peste porcine africaine (PPA) chez tous les suidés (porcs domestiques, sangliers sauvages et en captivité) selon l'OMSA le 21/12/2020.

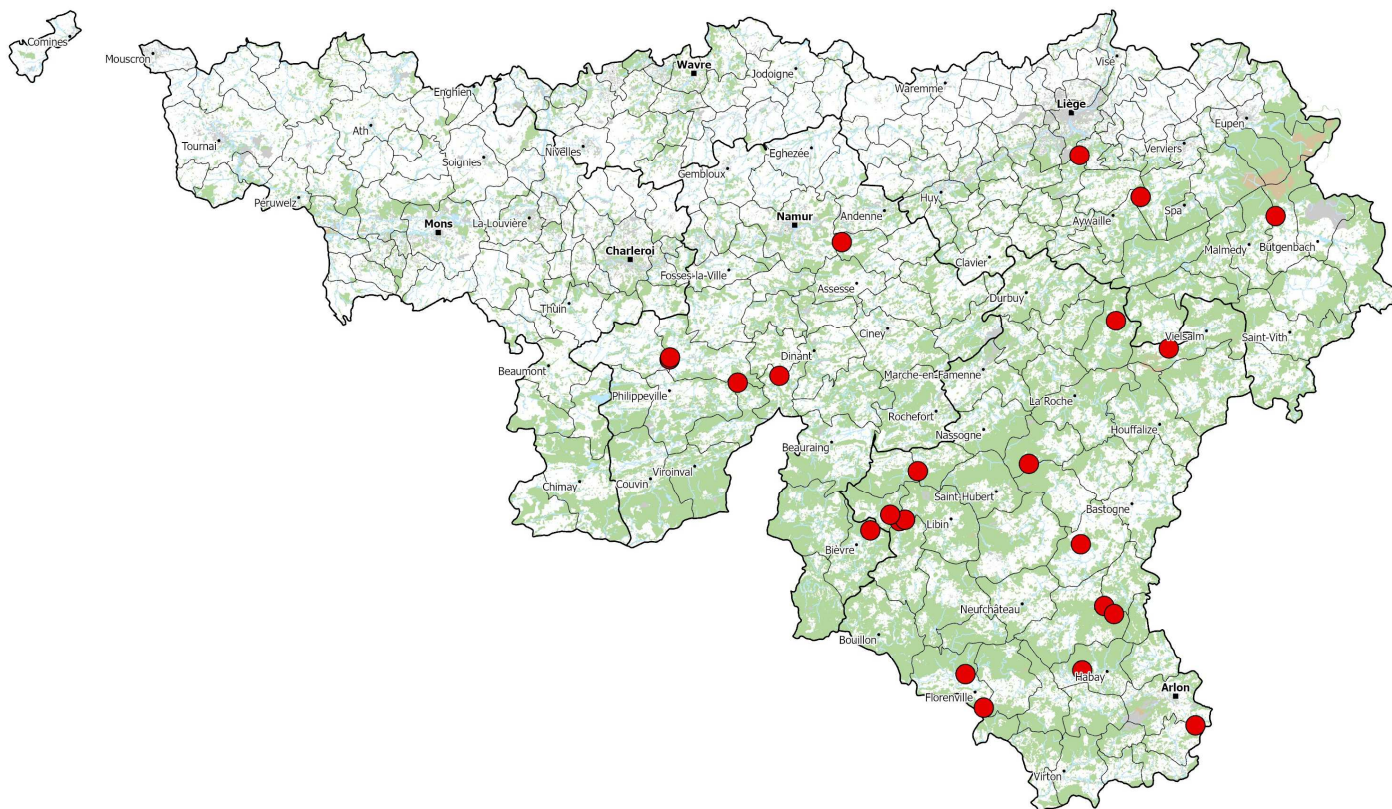
En 2023, le centre de Virton est resté fonctionnel jusqu'au 30 juin pour ensuite être définitivement démantelé le 01 juillet. Etant donné la situation en Europe, le niveau de vigilance PPA doit rester élevé en Wallonie. Le DEMNA a renforcé la surveillance passive notamment en augmentant le nombre de vétérinaires préleveurs (n = 24) et en intensifiant la communication dans le milieu cynégétique. Tout sanglier trouvé mort (à plus de 20 m d'une route) doit être analysé. En 2023, 40 sangliers ont été prélevés, dont 13 dans les anciennes zones PPA et 27 dans le reste de la Wallonie. Les échantillons ont été envoyés au LNR, Sciensano, pour les analyses virologiques. Le tableau ci-dessous détaille les résultats des analyses virologiques PPA en fonction du contexte de mort des sangliers (trouvés morts ou détruits).

En 2023, les 40 sangliers analysés en Wallonie étaient vironégatifs.

Tableau 5.2 : Analyses virologiques PPA réalisées en 2023 dans les anciennes Zones I et II, n = 13.

	ASF +	ASF -	Not applicable / Not valid	Total
Culled		3		3
Found dead		7		7
Road casualty		2		2
Sanitary shot		1		1
Total		13		13

Carte 5.2 : Répartition des sangliers analysés en 2023 hors des anciennes Zones I et II, n = 27.



5.3. Mycobactéries

5.3.1. *Mycobacterium avium paratuberculosis*

5.3.1.1. Contexte

La paratuberculose est une maladie chronique, causée par *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*), qui concerne essentiellement les ruminants et qui est responsable de pertes économiques importantes en spéculation bovine. Cette maladie est aussi connue chez les cervidés sauvages ou élevés en captivité. Des bovins peuvent, de manière indirecte, infecter des cervidés et inversement. Néanmoins, chez les bovins, les veaux s'infectent dès les premiers mois de vie (fenêtre de réceptivité maximale avant 8 semaines et infection possible jusqu'à 6 mois, les adultes étant beaucoup plus résistants à l'infection). Donc le premier facteur de risque pour un jeune veau, c'est le contact avec sa mère infectée (ingestion de colostrum/lait) et d'autres bovins. La faune sauvage ne doit pas être considérée comme le premier facteur de risque. Chez les cervidés, l'évolution est plus rapide que ce qui est décrit chez les bovins. Brièvement, la paratuberculose concerne aussi bien les jeunes cerfs que les adultes. Des individus juvéniles (moins d'un an) et sub-adultes (moins de deux ans) sont susceptibles de développer une paratuberculose clinique et d'en mourir avant l'âge adulte. En conditions naturelles, les cervidés sauvages atteints de paratuberculose peuvent être retrouvés morts dans un état de cachexie extrême et souvent polyparasités. Les lésions macroscopiques les plus fréquemment observées consistent en une adénomégalie mésentérique avec, parfois, des foyers de nécrose de liquéfaction ou de caséification. Les lésions d'entérite chronique peuvent être discrètes avec un épaissement de la sous-muqueuse parfois à peine perceptible sur un court segment de l'intestin grêle. Le tableau lésionnel est très variable même chez des animaux détectés *a posteriori* positifs en culture (Mackintosh et Griffin, 2010).

La voie oro-fécale (contamination de l'alimentation par les matières fécales - mécanisme horizontal de transmission d'un animal à un autre) et la voie pseudo-v verticale (mamelles des mères souillées par les matières fécales - transmission au petit lors de la tétée) sont des voies majeures de transmission de la bactérie. Cependant, des études ont démontré que la voie intra-utérine est plus fréquente chez les cervidés que chez les petits ruminants. La symptomatologie de la maladie est d'ailleurs plus précoce chez les faons (avec une évolution très aiguë de la maladie et des mortalités dès les premiers mois de vie) que chez les veaux (rarement avant 12 mois d'âge, la maladie est plus chronique chez les bovins et se déclare généralement entre 2 et 7 ans) (Thompson *et al.*, 2007).

5.3.1.2. Outils de diagnostic

L'extraction de l'ADN total des différentes matrices considérées (tissus et/ou matières fécales) est réalisée à l'aide du kit Nucleospin® DNA stool ou Nucleospin® tissue (Macherey-Nagel). L'ADN extrait est ensuite soumis à une PCR en temps réel, réalisée sous TaqMan, en duplex pour la présence des loci IS900 et F57, cibles utilisées pour l'identification de *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (Irenge *et al.*, 2009). De plus, une qPCR β -Actine spécifique est réalisée en parallèle afin de contrôler la qualité de l'ADN extrait ainsi que de la qualité du signal obtenu par qPCR MAP. Les amorces et sondes (Integrated DNA Technologies) utilisées pour cette expérience sont décrites ci-dessous.

Primer	Séquence (5'→ 3')
IS900-Fwd	5'-TGC TGA TCG CCT TGC TCA-3'
IS900-Rev	5'-GGG CCT GAT CGG CGA TGA T-3'
IS900-P	5'-CCG GGC AGC GGC TGC TTT ATA TTC-3'
F57-Fwd	5'-TTC ATC GAT ACC CAA ACT CAG AGA-3'
F57-Rev	5'-GTT CGC CGC TTG AAT GGT-3'
F57-P	5'-TGC CAG CCG CCC ACT CGT G-3'

Le mix PCR (20 µl) comprend 1X qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics), les amorces (0,375 µM), sondes (0,25 µM) et ≤ 100 ng d'ADN génomique extrait. Les conditions d'amplification sont en trois étapes : une première dénaturation de 3 minutes à 95°C suivie de 40 cycles composés d'un passage de 5 secondes à 95°C et d'une étape de 20 secondes à 60°C. Les analyses sont réalisées sur QuantStudio 1 (Applied Biosystems).

5.3.1.3. Analyses *Map* réalisées en 2023

Au total, 88 analyses *Map* ont été effectuées en 2023. En ce qui concerne les analyses sur cervidés, elles étaient réalisées si des lésions suggestives étaient détectées soit sur cervidés trouvés morts ou abattus pour raisons sanitaires soit sur cervidés présumés sains abattus à la chasse. Parmi les 34 cervidés analysés, 14 résultats étaient qPCR *Map* positifs (11 Cerfs élaphe et 3 Chevreuils). Concernant les autres espèces analysées (les blaireaux notamment), aucun cas positif n'a été détecté.

Tableau 5.3 : Cas positifs de *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* mis en évidence au cours de l'année 2023 par qPCR (n = 14).

Référence	Genre	Lieu de tir/découverte (Commune – CP)	Date de tir/découverte
Animaux trouvés morts			
W23-070	Cervus	Château de La Neuville (Stoumont – 4987)	16/03/23
W23-925	Cervus	Möderscheid (Amel – 4770)	16/07/23
W23-1443	Cervus	Borzée (La Roche – 6980)	30/09/23
W23-1444	Capreolus	Warnant-Dreye (Villers-le-Bouillet – 4530)	17/07/23
W23-1658	Capreolus	Petit-Thier (Vielsalm – 6690)	12/09/23
W23-1729	Cervus	Wibrin (Houffalize – 6666)	16/12/23
Achèvements sanitaires			
W23-1427	Cervus	Eimerscheid (Bullange – 4760)	21/09/23
W23-1429	Cervus	N829, Lavacherie (Sainte-Ode – 6680)	23/09/23
W23-2062	Capreolus	Opont (Paliseul – 6852)	08/03/23
Animaux de captivité/élevage			
W23-1654	Cervus	Flamisoul (Bertogne – 6887)	17/11/23
W23-1655	Cervus	Flamisoul (Bertogne – 6887)	17/11/23
W23-1656	Cervus	Flamisoul (Bertogne – 6887)	17/11/23
W23-1662	Cervus	Flamisoul (Bertogne – 6887)	24/11/23
Animaux prélevés sur les chasses			
C23-002	Cervus	St-Michel et Freyr (Saint-Hubert – 6870)	26/10/23

5.3.2. *Mycobacterium avium* spp. *avium* et *Mycobacterium avium* spp. *hominissuis*

5.3.2.1. Contexte

La tuberculose aviaire (*Mycobacterium avium* spp. *avium*, *Maa*) est une zoonose affectant à la fois les oiseaux, les mammifères et, de manière opportuniste, les humains immunodéprimés. Les voies d'entrée sont digestives et respiratoires. Les manifestations cliniques incluent l'émaciation, la diarrhée, ainsi que la formation de granulomes caséux, avec des calcifications possibles dans le foie, la rate, les intestins, et la moelle osseuse. Cette bactérie intracellulaire peut persister dans l'organisme très longtemps, rendant l'éradication difficile en raison du portage chronique et de l'excrétion continue.

Chez les cervidés, l'infection par *Maa* provoque des lésions purulentes ou granulomateuses dans les ganglions lymphatiques rétropharyngés et mésentériques. Ces lésions sont similaires, d'un point de vue macroscopique et histologique, à celles causées par *Mycobacterium bovis*. Une autre mycobactérie, *Mycobacterium avium* spp. *hominissuis* (*Mah*) est un pathogène ubiquitaire et opportuniste, principalement observé chez des humains immunodéprimés ou présentant des maladies pulmonaires préexistantes.

5.3.2.2. Outils de diagnostic

L'ADN extrait des échantillons est soumis à une PCR en temps réel (TaqMan) pour détecter les loci IS901 et IS1245, ce qui permet de différencier *Mycobacterium avium* spp. *avium* (IS901+ et IS1245+) de *Mycobacterium avium* spp. *hominissuis* (IS901- et IS1245+). Un contrôle interne pour la β -actine est également effectué.

Primer	Séquence (5' → 3')
IS901-Fwd	5'-GTG ATC AAG CAC CTT CGG AA-3'
IS901-Rev	5'-GCT GCG AGT AGC TTG ATG AG-3'
IS901-P	5'-AAC AAC ATC GAC ACG ATC GCC GAC AA-3'
IS1245-Fwd	5'-CCG GAT CTG CAA AGA CCT C-3'
IS1245-Rev	5'-CGA CAC CAC CCG ATG ATT C-3'
IS1245-P	5'-CCG TTG GGT TAT CAG CGC TTT C-3'

Le mix PCR (20 μ l) comprend 1X qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics), des amorces (0,375 μ M), sondes (0,25 μ M) et $\leq$ 100 ng d'ADN génomique extrait. Les conditions d'amplification sont en trois étapes : une première étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C suivie de 40 cycles composés d'un passage de 5 secondes à 95°C et d'une étape de 20 secondes à 60°C. Les analyses sont réalisées sur QuantStudio 1 (Applied Biosystems).

5.3.2.3. Analyses *Maa*/*Mah* réalisées en 2023

Au total, 90 animaux ont été analysés par qPCR en 2023. Parmi ces analyses, 5 résultats étaient positifs pour *Maa* et concernaient des oiseaux (4 cas positifs sur 8 oiseaux analysés) ainsi qu'un cervidé (1 cas sur 34 cervidés analysés). Aucun cas positif de *Mah* n'a été mis en évidence.

Tableau 5.3.2 : Cas positifs *Mycobacterium avium subsp. avium* mis en évidence au cours de l'année 2023 par qPCR (n = 5).

Référence	Genre	Lieu de tir/découverte (Commune – CP)	Date de tir/découverte
Achèvements sanitaires			
W23-1071	Cervus	Chefna (Stoumont – 4987)	7/08/23
Animaux de captivité/élevage			
W23-1427	Gallus	NC	NC
Animaux de CREAVES			
W23-058	Branta	Perwez (Perwez – 1360)	NC
W23-998	Falco	Les Waleffes (Faimies – 4317)	31/07/23
W23-1426	Buteo	Beauraing (Beauraing – 5570)	20/07/23

5.3.3. *Mycobacterium bovis* et autres mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Sur base du niveau de surveillance mis en place en Wallonie, la tuberculose bovine n'a, jusqu'à présent, pas été détectée en faune sauvage non captive. La situation sanitaire (en Belgique et dans les pays voisins) impose de classer *M. bovis* et autres MTC dans la liste prioritaire des pathogènes potentiellement émergents à rechercher. Il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire en Belgique et classée 'D + E' (ruminants sauvages et suidés) et 'E' (blaireaux) dans l'AHF. Pour les cervidés et suidés prélevés en période de chasse ou trouvés morts, toute lésion suggestive est soumise à une analyse moléculaire. Pour les blaireaux (notamment les accidentés sur les routes), les analyses moléculaires sont systématiquement réalisées. Tout résultat positif avec la qPCR de première ligne est automatiquement transmis au LNR (Sciensano).

Les analyses réalisées en 2023 dans le cadre du suivi WildTub sont détaillées en annexe.

5.4. Virus de la maladie d'Aujeszky

La maladie d'Aujeszky (*suid herpesvirus 1*) n'est pas zoonotique mais présente un impact économique important pour le secteur porcin. Les mesures d'éradication et la vaccination systématique en élevage ont fait en sorte que la plupart des pays de l'UE sont indemnes de la maladie d'Aujeszky. La Belgique est officiellement indemne depuis 2011 et la vaccination des porcs est interdite. Aucun cas clinique n'a été détecté dans les élevages porcins depuis cette date (source AFSCA).

Pourtant, le virus (Aujeszky Disease Virus, ADV) circule au sein des populations de sangliers en Wallonie et le risque de transmission du réservoir sauvage au porc domestique (population naïve non vaccinée) est non nul. En effet, si les contacts directs sangliers/porcs restent des événements rares, le virus peut aussi être transmis des sangliers aux porcs via des aérosols, par l'intermédiaire de personnes, de rongeurs et/ou du matériel contaminé (bottes, vêtements). Par conséquent, les mesures de biosécurité dans les élevages de porcs plein air doivent être drastiques. En France, des foyers d'Aujeszky ont été détectés dans des élevages de porcs plein air avec une source sauvage avérée. En Wallonie, le monitoring Aujeszky en faune sauvage a été interrompu en 2018 au moment de la crise de la peste porcine africaine. Le Service Faune sauvage a relancé des analyses en 2023. Ce monitoring des sangliers est important afin de suivre la circulation du virus dans l'espace et dans le temps. Si un foyer porcin devait émerger, il serait intéressant d'isoler des souches virales afin de les tracer au niveau moléculaire.

Méthode

Le programme de surveillance a couvert 4 des 5 provinces de Wallonie et les prises de sang ont été réalisées par l'équipe de ULiège pendant la saison de chasse, d'octobre à décembre 2023. Sur 369 animaux échantillonnés, 345 échantillons sanguins ont été testés (recherche d'anticorps dirigés contre ADV).

Les animaux ont été classés par catégorie d'âge sur base du phénotype et de la dentition : marcassins : 0 à 6 mois, juvéniles : 6 à 12 mois, sub-adultes : 12 à 24 mois et adultes : >24 mois

Les critères de quantité et de qualité des sérums (pourcentage d'hémolyse) ont été notés. Un test ELISA (ELISA Ac de compétition – IDEXX PRV/ADV gB Ab – 99-09732) ciblant la glycoprotéine B du virus a été utilisé et les échantillons ont été analysés en duplicat. Les valeurs intrinsèques du kit ont été fournies par le fabricant (Se 100% et Sp 99,5%). Un sérum contrôle positif a systématiquement été inclus pour chaque plaque ELISA.

Pour analyser les facteurs influençant les résultats des ELISA Ac Aujeszky, un modèle linéaire généralisé (GLM) binomial logistique a été utilisé. La variable dépendante est le résultat de l'ELISA Ac Aujeszky, tandis que les variables explicatives sont le sexe, l'âge et la province, toutes catégorielles. Le modèle est spécifié comme suit : Sérologie Aujeszky ~ Sexe + Age + Province.

Résultats des analyses 2023

Tableau récapitulatif des statistiques réalisées

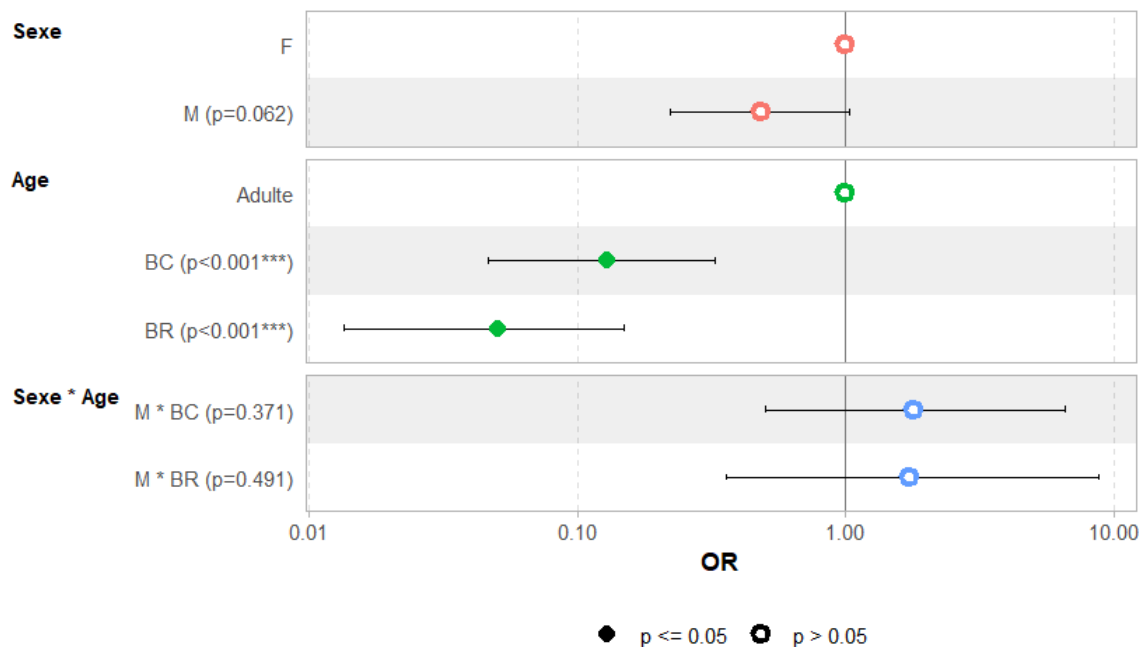
Caractéristique	OR ¹	95% IC ¹	p-valeur
Sexe			
M / F	0,58	0,33 – 1,03	0,065
Age			
BC / Adulte	0,16	0,07 – 0,36	<0,001
BR / Adulte	0,06	0,02 – 0,16	<0,001
BR / BC	0,38	0,14 – 1,09	0,078
Province			
Liège / Hainaut	0,21	0,01 – 4,59	0,6
Luxembourg / Hainaut	0,89	0,05 – 16,2	>0,9
Luxembourg / Liège	4,27	1,25 – 14,6	0,013
Namur / Hainaut	0,31	0,01 – 6,49	0,8
Namur / Liège	1,46	0,31 – 6,86	>0,9
Namur / Luxembourg	0,34	0,11 – 1,08	0,077

¹ OR = rapport de cotes, IC = intervalle de confiance

Caractéristique	Sérologie N/P ?			p-valeur ²
	Négatif N = 236 ¹	Positif N = 91 ¹	Overall N = 327 ¹	
Sexe				0,063
F	90 (38%)	45 (49%)	135 (41%)	
M	146 (62%)	46 (51%)	192 (59%)	
Province				0,002
Hainaut	3 (1,3%)	2 (2,2%)	5 (1,5%)	
Liège	51 (22%)	7 (7,7%)	58 (18%)	
Luxembourg	142 (60%)	73 (80%)	215 (66%)	
Namur	40 (17%)	9 (9,9%)	49 (15%)	
Age				<0,001
Adulte	50 (21%)	64 (70%)	114 (35%)	
BC	78 (33%)	18 (20%)	96 (29%)	
BR	102 (43%)	9 (9,9%)	111 (34%)	
Marcassin	6 (2,5%)	0 (0%)	6 (1,8%)	

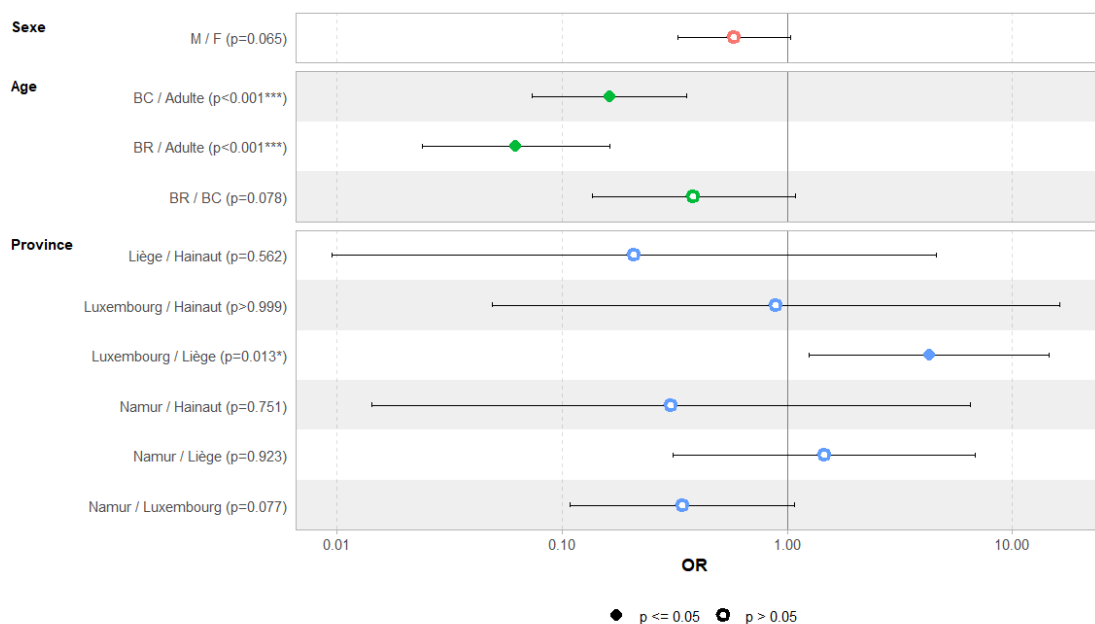
¹ n (%)

² test du khi-deux d'indépendance; test exact de Fisher



BC = Bêtes de compagnie pour 'subadultes'

BR = Bêtes rousses pour 'juvéniles'



BC = Bêtes de compagnie pour 'subadultes'

BR = Bêtes rousses pour 'juvéniles'

La séroprévalence apparente globale était de 26,96 % (IC 95% : 22,27 – 31,64) en 2023 pour l'ensemble de la Wallonie. Elle était de 30.65% (IC 95% : 26.87 – 34.43) en 2017, 32.28% (IC 95% : 28.86 – 35.70) en 2016 et 30.91% (IC 95% : 27.55 – 34.26) en 2015.

Les résultats présentés ici sont compatibles avec une circulation endémique du virus de la maladie d'Aujeszky dans les populations de sangliers vivant dans le sud de la Belgique. Les effets liés à l'âge, au sexe et à la zone de prélèvement seront présentés lors de la présentation orale.

Tableau 5.4 : Aujeszky 2023 - Séroprévalence apparente globale par catégorie d'âge des sangliers prélevés en Wallonie.

	Sangliers 2023 - ELISA Ac - IDEXX PRV/ADV gB					Total
	Marcassins	Juvéniles	Sub-adultes	Adultes	ND	
N	7	112	97	114	15	345
n Elisa positifs	0	9	18	64	2	93
n douteux	1		1			2
Prévalence (%)	0,00%	8,04%	18,56%	56,14%	13,33%	26,96%

ND = classe d'âge non-déterminée.

Figure 5.4.1 : Aujeszký 2023 - Séroprévalences par classe d'âge des sangliers prélevés en Wallonie.

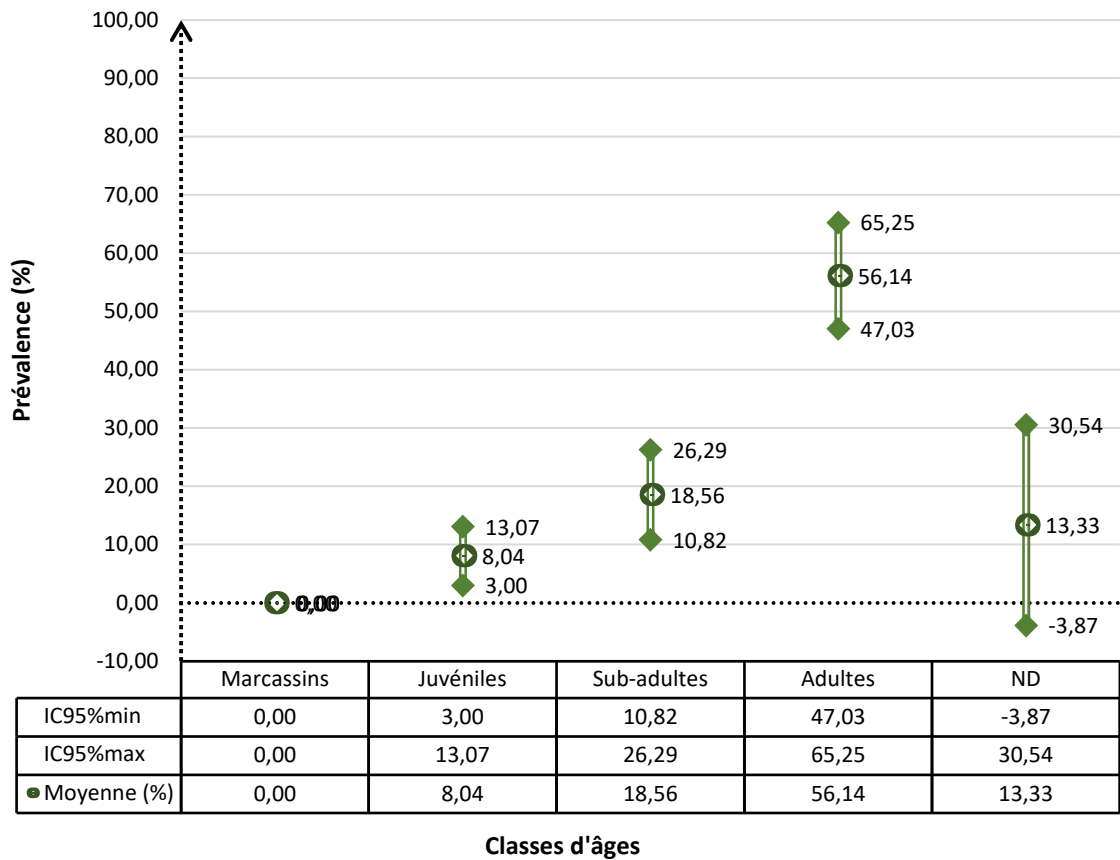


Figure 5.4.2 : Aujeszký 2023 - Séroprévalences par province des sangliers prélevés en Wallonie.

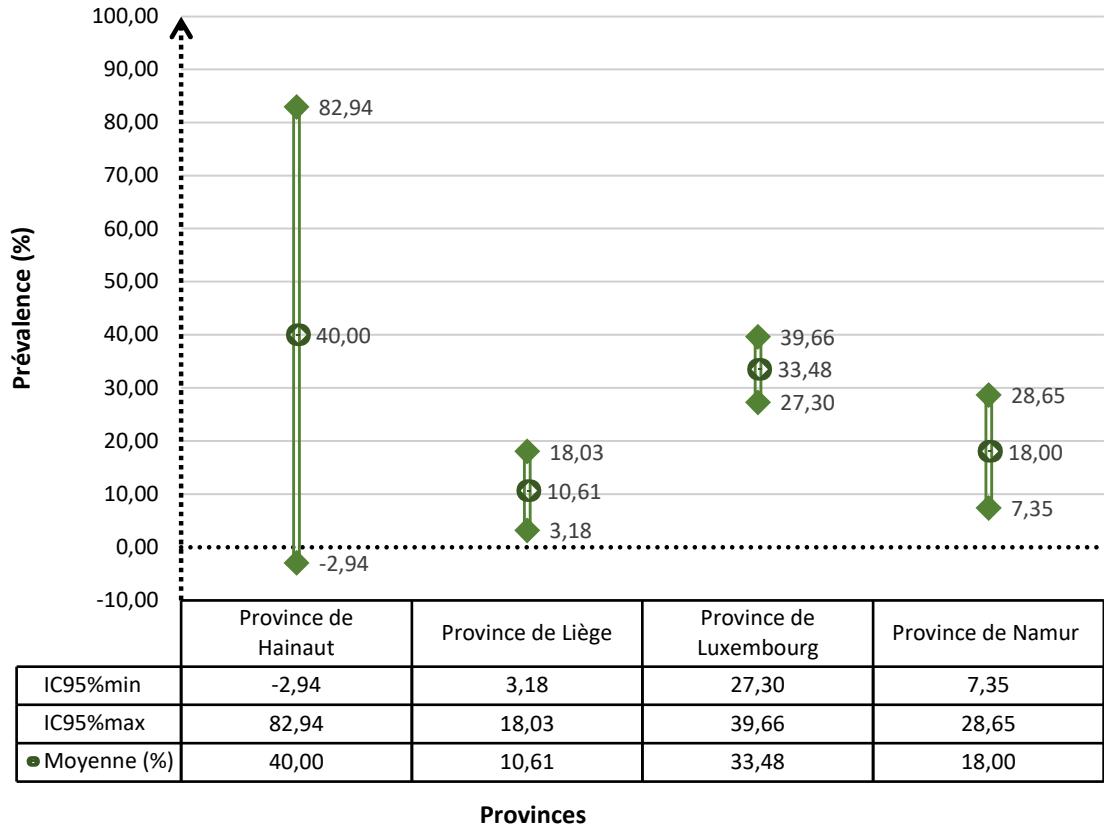
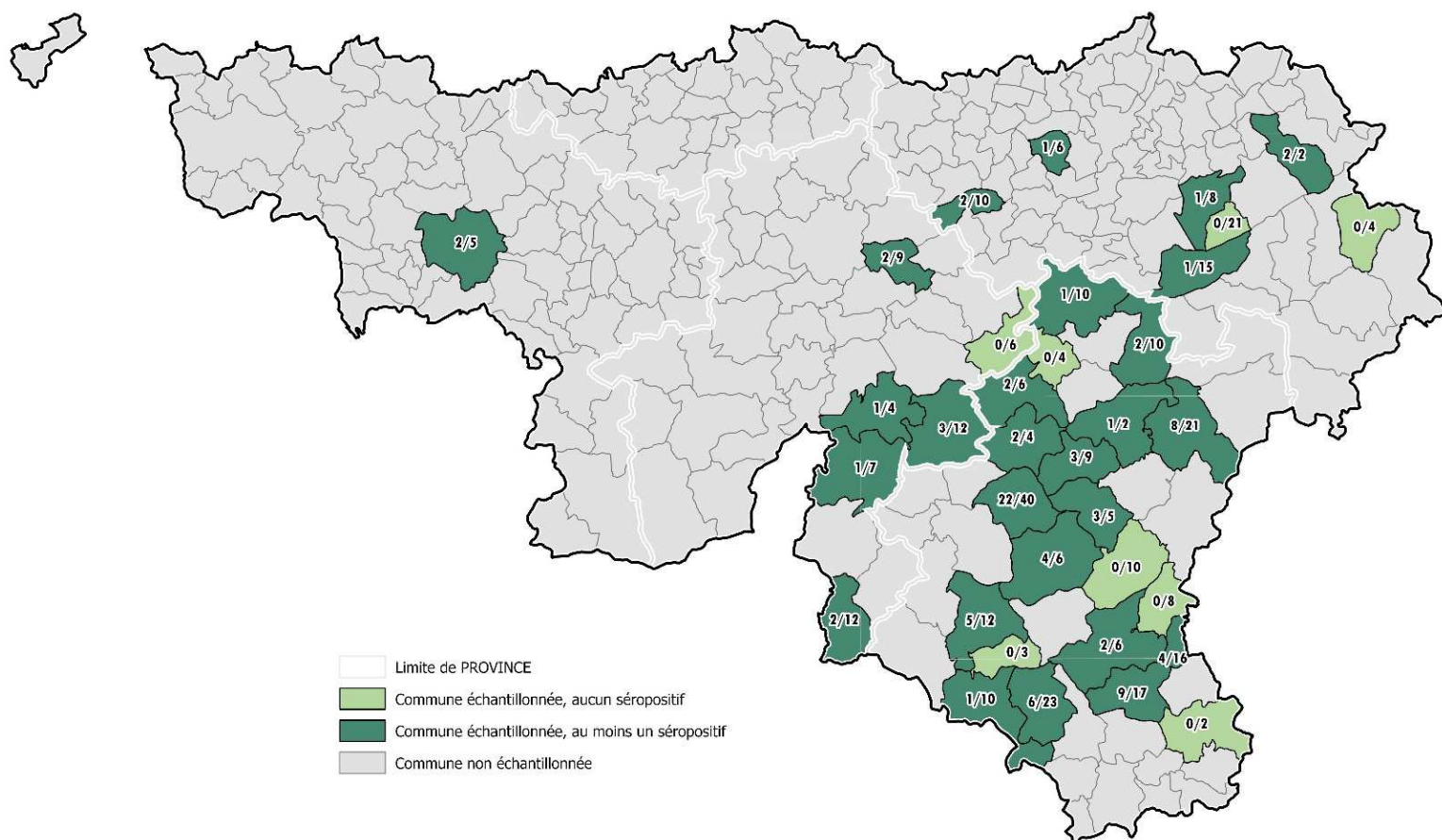


Figure 5.4.3 : Aujeszky 2023 - Distribution des sangliers séropositifs par commune (nombre d'animaux séropositifs / nombre d'animaux analysés).



La maladie d'Aujeszky chez le chien

Les porcs et sangliers sont les hôtes naturels du virus de la maladie d'Aujeszky. Celle-ci n'est pas transmissible à l'homme (sauf cas exceptionnels) mais certains hôtes accidentels, comme les carnivores et les ruminants, peuvent être infectés. Chez ces hôtes accidentels, le virus provoque une encéphalite rapidement mortelle.

En saison de chasse, les chiens risquent de contracter la maladie lors de contacts avec des sangliers infectés susceptibles d'excréter le virus via la salive, les sécrétions nasales et génitales. Chaque année, des cas mortels sont rapportés chez des chiens de chasse en Belgique et en France notamment. Il faut donc être particulièrement prudent avec les chiens mordants. Le chien peut également s'infecter en ingérant des abats de sangliers. Chez le chien, l'incubation dure 2 à 6 jours. Parmi les symptômes les plus fréquents (salivation, apathie, anorexie, tachypnée), on peut noter un prurit intense ; le chien infecté peut se gratter jusqu'à s'automutiler. D'autres signes moins fréquents sont décrits tels que rigidité de la nuque, vomissements, spasmes musculaires et agressivité. La mort survient dans 100 % des cas dans les 24 à 48 heures après l'apparition des premiers signes cliniques.

Maladie d'Aujeszky - Recommandations aux propriétaires de chiens de chasse

- limiter autant que possible les contacts entre les chiens et un sanglier blessé ;
- **ne jamais distribuer d'abats de sanglier aux chiens ;**
- vacciner éventuellement mais la protection n'est pas de 100 %

Vaccination* : il faut consulter votre vétérinaire qui administrera uniquement un vaccin **inactivé**. Le vaccin Auskipra BK (vaccin inactivé adjuvé) peut être utilisé chez le chien. Les vaccins vivants atténués sont formellement interdits chez le chien car ils sont capables d'induire la maladie.

Auskipra BK - Protocole d'administration :

- 1 ml par voie sous-cutanée
- Primovaccination : deux injections à 3 semaines d'intervalle. La deuxième injection doit être réalisée un mois avant la saison de chasse
- Rappel : tous les 6 mois

Il est important de souligner que ce vaccin n'est pas efficace à 100 % chez le chien. Par conséquent les mesures préventives restent indispensables : il ne faut jamais donner d'abats de sangliers même aux chiens vaccinés.

5.5. *Echinococcus multilocularis*

Le Service Faune sauvage travaille en collaboration avec les équipes du CHU (EchinoLiège.be) sur l'échinococcose alvéolaire. Les détails sur cette pathologie sont repris dans les rapports précédents. L'objectif *partim* faune sauvage est de déterminer la prévalence d'*E. multilocularis* principalement chez les renards (mais aussi chez d'autres espèces comme le loup gris et le raton laveur) provenant de différentes régions de Wallonie et de comparer les résultats entre zones péri-urbaines et agricoles. Des analyses sont donc réalisées sur ces espèces qui sont transmises au Service Faune sauvage.

Ce suivi permet d'informer le public de manière orientée (notamment si certaines zones sont plus à risque que d'autres) et de diffuser des recommandations. La vermifugation ciblée des chiens est préconisée dans les zones à risque et concerne surtout les chiens ruraux susceptibles de chasser les petits rongeurs. Selon des études européennes et japonaises, le déparasitage des hôtes définitifs sauvages ou errants au moyen d'appâts contenant des anthelminthiques a permis d'obtenir des baisses de prévalence d'*Echinococcus multilocularis* chez les renards (Takahashi *et al.*, 2013 ; Hegglin *et al.*, 2003). Néanmoins, ces techniques de vermifugation des carnivores sauvages sont onéreuses, difficiles à mettre en œuvre et nécessitent d'être répétées à intervalles réguliers.

Méthode

Figure 5.5 : Technique de prélèvement lors de l'autopsie d'un renard.



Au laboratoire, les échantillons sont stockés minimum 3 à 7 jours à -80°C afin d'inactiver les éventuels parasites présents. La technique de détection est une PCR en temps réel dirigée contre la grande sous-unité d'ARN ribosomal d'*Echinococcus multilocularis* (Knapp *et al.*, 2014). Le protocole consiste en une extraction de l'ADN total à l'aide du kit Nucleospin® DNA stool (Macherey-Nagel) à partir du contenu de l'intestin grêle et des matières fécales de renards. Un protocole similaire a été testé sur une cinquantaine de renards à partir d'écouvillons réalisés au niveau du rectum, mais ce protocole ne donne pas de résultats

concluants. L'ADN extrait est ensuite soumis à une PCR en temps réel, réalisée sous TaqMan, en duplex pour la présence du gène qui code pour la grande sous-unité d'ARN ribosomal d'*Echinococcus multilocularis* et le gène qui code pour la β -Actine.

Les amorces et sondes (Integrated DNA Technologies) utilisées pour cette expérience sont les suivantes :

Primer	séquence (5'→3')
Em_rrnL-f	CTG TGA TCT TGG TGT AGT AGT TGA GAT TT
Em_rrnL-r	GGC TTA CGC CGG TCT TAA CTC
Em_rrnL-p	[FAM]-TGG TCT GTT CGA CCT TTT TAG CCT CCA T-[BHQ1]
β -Act-F	CAG CAC AAT GAA GAT CAA GAT CAT C
β -Act-R	CGG ACT CAT CGT ACT CCT GCT T
β -Act-P	6-TAMN/TCG CTG TCC ACC TTC CAG CAG ATG T/3IAbRQSp

Le mix PCR (20 μ l) comprend 1X qPCRBIO Probe Mix Hi-ROX (Nippon Genetics), les amorces (0,375 μ M), les sondes (0,25 μ M) et $\leq$ 100 ng d'ADN génomique extrait. Les conditions d'amplification sont en trois étapes : une première dénaturation de 3 minutes à 95°C suivie de 40 cycles composés d'un passage de 5 secondes à 95°C et d'une étape de 20 secondes à 60°C. Les analyses sont réalisées sur QuantStudio 1 (Applied Biosystems).

Résultats des analyses 2023

Au total, 192 analyses ont été réalisées en 2023 et elles ont concerné 35 Ragondins, 47 Rats musqués et 1 Rat surmulot (voir pt 4. Rongeurs) ainsi que 42 Renards roux, 62 Ratons laveurs, 1 Castor d'Europe et 3 Loups gris. Les résultats des qPCR *E. multilocularis* étaient négatives pour les échantillons prélevés sur les 3 loups et le castor. Certaines analyses n'ont pas pu être finalisées (n = 6 ; 3 ratons laveurs, 1 rat musqué et 2 renards).

Renards

Au total, 42 renards ont été autopsiés en 2023.

Sur l'ensemble des renards testés par qPCR, 57 % (24/42) étaient porteurs du parasite. La répartition des renards analysés en 2023 est détaillée dans le tableau suivant. Les dépouilles sont transmises au service Faune sauvage sur base volontaire (par des agents forestiers ou des chasseurs) ou via les CREAVES, l'échantillonnage n'est pas représentatif de la population vulpine en Wallonie.

Tableau 5.5.1 : Distribution des Renards analysés pour *Echinococcus multilocularis* en 2023.

Provinces	Communes	Nombre de renards analysés	Nombre de cas positifs
Brabant flamand	Hoeilaart (1560)	1	0
Brabant wallon	Genappe (1474)	1	0
Hainaut	La Louvière (7100)	1	0
	Momignies (6592)	1	0
	Montigny-le-Tilleul (6110)	1	0
	Saint-Ghislain (7331)	1	0
	Thuin (6536)	2	1
Liège	Burdinne (4210)	1	1
	Burg-Reuland (4790)	1	1
	Héron (4217)	1	1

	Huy (4500)	1	1
	Liège (4020)	1	0
	Lierneux (4990)	1	1
	Limbourg (4834)	1	1
	Malmedy (4960)	1	1
	Neupré (4122)	1	1
	Saint-Vith (4780)	1	0
	Stoumont (4987)	1	0
Luxembourg	Bastogne (6600)	1	1
	Durbuy (6941)	1	1
	Erezée (6997)	1	1
	Gouvy (6671)	2	1
	Habay-la-Neuve (6721)	1	1
	Hotton (6990)	1	0
	Houffalize (6660)	3	2
	La Roche-en-Ardenne (6980)	1	1
	Léglise (6860)	2	1
	Rendeux (6987)	2	0
	Saint-Hubert (6870)	2	2
	Vaux-sur-sûre (6640)	2	2
Namur	Florennes (5620)	1	0
	Gedinne (5575)	1	1
NC	NC	2	1
TOTAL		42	24
Prévalence		57,14%	

Ratons laveurs

En 2023, 62 Ratons laveurs ont été analysés. Parmi eux, 3 cas (4, 8 %) étaient porteurs du parasite *Echinococcus multilocularis*.

Tableau 5.5.2 : Distribution des Ratons laveurs analysés pour *Echinococcus multilocularis* en 2023.

Provinces	Communes	Nombre de ratons-laveurs analysés	Nombre de cas positifs
Liège	Comblain-au-pont (4170)	1	0
	Esneux (4130)	4	0
	Ferrières (4190)	5	0
	Huy (4500)	2	0
	Jalhay (4845)	1	0
	Lierneux (4990)	1	0
	Malmedy (4960)	2	0
	Olne (4877)	1	0
	Ouffet (4590)	2	0
	Seraing (4100)	2	0
	Sprimont (4140)	3	0
	Stoumont (4987)	1	1
	Verviers (4800)	1	0
	Waimes (4950)	2	0
Luxembourg	Attert (6717)	1	0
	Bouillon (6830)	1	0
	Chiny (6810)	3	1
	Florenville (6820)	1	0
	Gouvy (6671)	1	0

	Habay (6720)	1	0
	Marche-en-famenne (6900)	1	0
	Martelange (6630)	1	0
	Nassogne (6950)	1	0
	Rouvroy (6767)	3	1
	Sainte-Ode (6680)	1	0
	Saint-Hubert (6870)	1	0
	Tellin (6927)	1	0
	Tenneville (6970)	8	0
	Vielsalm (6690)	1	0
Namur	Ciney (5590)	1	0
	Gedinne (5575)	1	0
NC	NC	6	0
TOTAL		62	3
Prévalence		4,83%	

Rongeurs

Les résultats *Echinococcus multilocularis* concernant les rongeurs sont détaillés dans le chapitre 4.

5.6. Influenza aviaire

Dans le cadre de l'Animal Health Law (AHL), le Règlement 2018/1882 entré en application en avril 2021, classe les HPAI en maladie de catégorie A+D+E et les LPAI (influenza aviaire faiblement pathogène) en maladie de catégorie D+E. Ce Règlement fixe les programmes de surveillance et les mesures de lutte. En Belgique, le LNR (Sciensano) est responsable des analyses des échantillons transmis par les régions. Depuis de nombreuses années, le Service Faune sauvage de la FMV collabore dans les démarches de surveillance active (oiseaux sauvages prélevés à la chasse) et autopsie également de nombreux oiseaux dans le cadre de ses activités de recherche dans les CREAES. Tout évènement suspect 'AI' est transféré au LNR (contact : Dr B. Lambrecht).

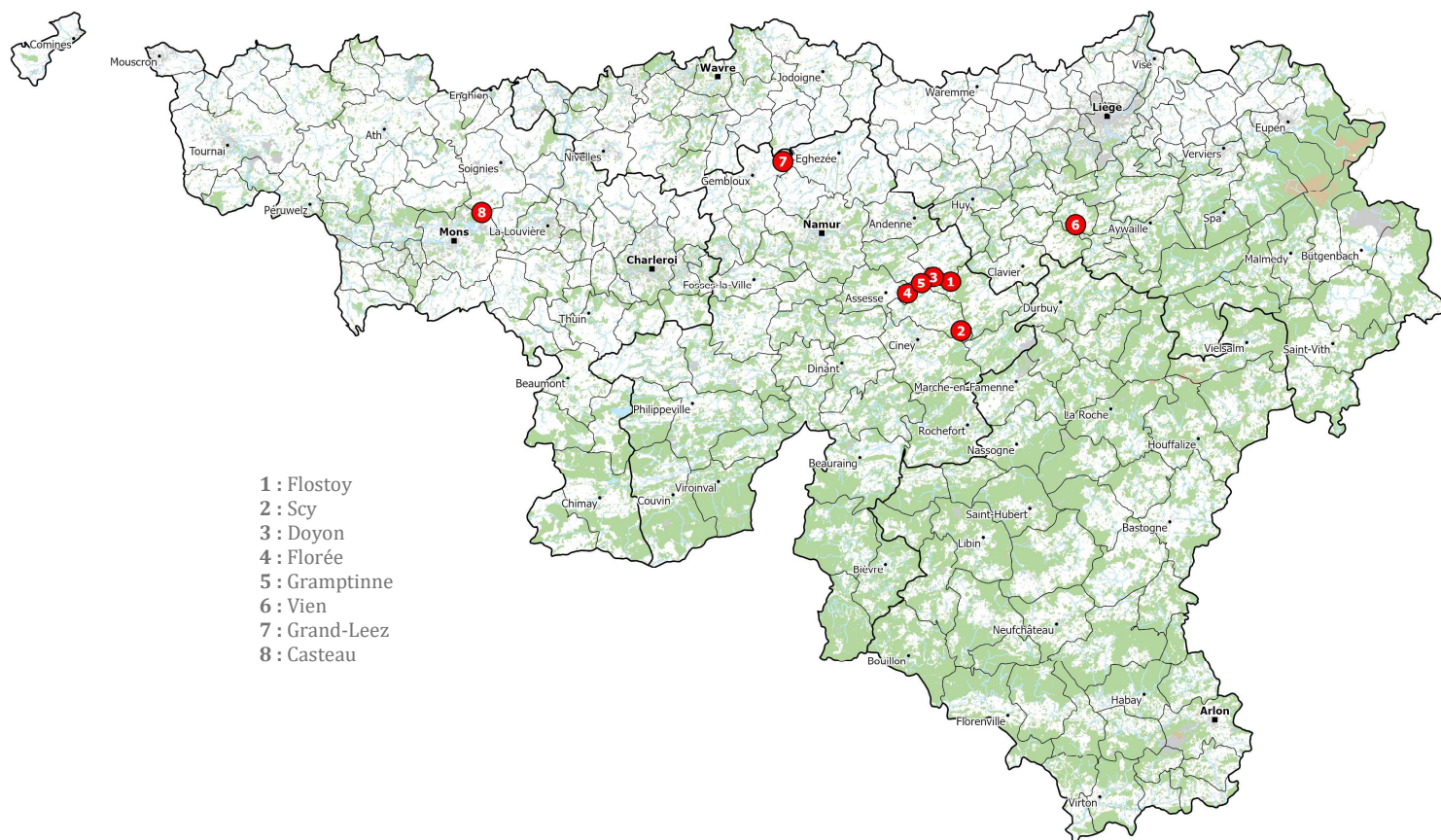
Le tableau récapitulatif des prélèvements (n = 257) effectués en 2023, dans le cadre du monitoring actif, par le Service Faune sauvage est présenté ci-dessous. Tous les prélèvements étaient négatifs pour les HPAI H5 et H7.

Tableau 5.6 : Prélèvements cloacaux effectués sur oiseaux d'eau abattus en période de chasse sur 8 territoires / n = 257.

Date	Territoire (Commune – CP)	Coordonnées GPS du territoire	Canard colvert	Autres	Total	Nombre de pool positif - LPAI		
						H5	H7	Non H5 Non H7
03/09/23	Flostoy (Havelange – 5370)	N 50° 23' 18.74" E 05° 11' 2.87"	30	0	30	0	0	0
07/09/23	Scy (Hamois – 5361)	N 50° 18' 23.9" E 05° 12' 38.0"	30	0	30	0	0	5
16/09/23	Doyon (Havelange – 5370)	N 50° 23' 46" E 05° 08' 31"	30	0	30	0	0	0
17/09/23	Florée (Assesse – 5334)	N 50° 22' 38.77" E 04° 04' 07.74"	30	0	30	0	0	4
23/09/23	Gramptinne (Gesves – 5364)	N 50° 22' 50" E 05° 06' 32"	30	0	30	0	0	0
29/10/23	Vien (Anthisnes – 4160)	N 50° 28' 32.84 E 05° 29' 45.02	30	0	30	0	0	0
15/12/23	Grand-Leez (Perwez – 5031)	N 50° 34' 55" E 04° 45' 55"	57	3	60	0	0	0
15/12/23	Casteau (Mons – 7034)	N 50° 29' 31" E 04° 45' 55"	17	0	17	0	0	1
			254	3	257			

Autres :
3 Bernaches du Canada.

Carte 5.6 : Répartition des territoires sur lesquels des prélèvements ont été réalisés dans le cadre du monitoring actif des oiseaux sauvages en Wallonie (Influenza aviaire).



6. Collaborations et analyses mises en œuvre dans les CREAVES

Les activités réalisées dans les CREAVES sont détaillées en annexe (point 8.2).

7. Rapports de terrain & Missions ponctuelles

Dans le cadre de ses missions, le Service Faune sauvage est régulièrement sollicité pour des études ponctuelles sur l'ensemble de la Région wallonne. L'équipe assure ses missions de communication et de conseils auprès des agents de terrain, gestionnaires de territoires de chasse, cantonnements et particuliers. Pour chaque animal trouvé mort et autopsié, un rapport d'autopsie circonstancié est systématiquement rédigé et envoyé aux personnes qui ont transmis l'animal.

En 2023, le Service Faune sauvage a rédigé 103 rapports aux différents collaborateurs qui ont sollicité le Service pour des autopsies.

Ces rapports concernent de nombreuses espèces animales et les examens complémentaires sont entrepris en fonction de l'anamnèse et des lésions observées en autopsie (par exemple examens radiographiques dans les cas de braconnage, outils de biologie moléculaire pour la détection d'agents infectieux précis, histopathologie, immunohistochimie, mises en culture, galeries biochimiques, raclages cutanés, etc.).

Quelques rapports d'autopsie, tels qu'ils ont été transmis aux personnes de contact, sont présentés en annexe (point 8.5).