



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

Original : anglais
Février 2017

RAPPORT DE LA RÉUNION DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

Paris, 22 février - 1^{er} mars 2017

La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE (ci-après désignée par la « Commission des animaux aquatiques ») s'est réunie au siège de l'OIE, à Paris, du 22 février au 1^{er} mars 2017. La liste des participants figure en **annexe 1**.

La Commission des animaux aquatiques a remercié les États membres suivants de lui avoir adressé des commentaires écrits sur les projets de textes destinés au *Code aquatique* et au *Manuel aquatique* et diffusés suite à sa réunion de septembre 2016 : l'Argentine, l'Australie, le Canada, la République populaire de Chine, le Taipei chinois, la Colombie, le Costa Rica, Cuba, Fiji, le Guatemala, le Japon, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, l'Arabie saoudite, Singapour, la Suisse, la Tanzanie, la Thaïlande, les États-Unis d'Amérique et les États membres de l'Union européenne (UE).

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires soumis par les États membres et amendé les textes figurant dans le *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (ci-après désigné par le « *Code aquatique* ») et dans le *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques* (ci-après désigné par le « *Manuel aquatique* »), chaque fois que nécessaire. Les amendements sont mis en exergue de la façon usuelle, c'est-à-dire par l'utilisation des fonctions « double souligné » et « ~~barré~~ » du logiciel de traitement de texte; ils peuvent être consultés dans les annexes du présent rapport. Les amendements effectués lors de cette réunion font l'objet d'un surlignage en couleur afin d'être différenciés de ceux effectués lors de la réunion de septembre 2016.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération tous les commentaires des États membres dès lors qu'ils étaient justifiés. Néanmoins, la Commission n'a pas été en capacité de fournir des explications détaillées quant aux raisons motivant l'acceptation ou le rejet de chacune des propositions recueillies.

La Commission des animaux aquatiques encourage les États membres à se référer aux précédents rapports lors de l'élaboration de leurs commentaires sur des questions anciennes non résolues. La Commission des animaux aquatiques attire également l'attention des États membres sur les rapports des groupes ad hoc, qui comportent des informations importantes et qui figurent en annexes des rapports de la Commission. La Commission encourage les États membres à examiner ces rapports en complément des siens. La Commission a rappelé aux États membres que l'ensemble des rapports des groupes ad hoc (à partir de l'année 2016) étaient disponibles sur le site internet de l'OIE et pouvaient être consultés de façon indépendante des rapports de la Commission des animaux aquatiques (accessibles à partir du lien hypertexte suivant : <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/commissions-specialisees-et-groupes/commission-scientifique-et-rapports/endorsed-ad-hoc-group-reports/>).

Le tableau ci-après fournit un récapitulatif des textes présentés dans les annexes. Les États membres doivent noter que les **annexes 3 à 25** leur sont soumises en vue de leur adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017. Les **annexes 26 à 28** leur sont présentées afin qu'ils formulent des commentaires. Enfin, les **annexes 29 à 31** leur sont soumises à titre informatif.

La Commission des animaux aquatiques encourage fortement les États membres à participer à l'élaboration des normes internationales de l'OIE, en préparant leur participation au processus d'adoption des textes figurant aux **annexes 3 à 25** lors de la 85^e Session générale. La Commission les invite également à lui soumettre leurs commentaires sur les **annexes 26 à 28** du présent rapport. Les commentaires doivent être soumis sous forme de propositions de modifications rédactionnelles, dûment étayées par des arguments scientifiques. Les propositions de suppression doivent être indiquées par des caractères barrés (fonction « ~~barré~~ ») et celles d'ajouts par l'emploi du double soulignement (fonction « double souligné »). Les États membres ne doivent pas utiliser la fonction « suivi des modifications » des logiciels de traitement de texte car les marques du suivi de correction disparaissent lors de l'intégration de leurs propositions aux documents de travail de la Commission des animaux aquatiques.

Les commentaires formulés sur les **annexes 26 à 28** du présent rapport devront être adressés au siège de l'OIE avant le **4 août 2017** afin que la Commission des animaux aquatiques puisse les examiner lors de sa réunion de septembre 2017. Les commentaires reçus après la date limite ne seront pas communiqués à la Commission des animaux aquatiques pour examen lors de sa réunion de septembre 2017.

L'ensemble des commentaires devra être adressé au Service des normes de l'OIE, dont l'adresse électronique est standards.dept@oie.int.

Numéro du point	Textes proposés à l'adoption	Numéro de l'annexe	Numéro du point
Code aquatique			
1	Commentaires d'ordre général	Aucune	1
2	Glossaire	Annexe 3	27
3	Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE (chapitre 1.2.)	Annexes 4A (sans suivi des modifications) et 4B (avec suivi des modifications)	29
4	Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)	Annexe 5	33
6	Désinfection des établissements d'aquaculture et de leur équipement (chapitre 4.3.)	Annexe 6	35
7	Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)	Annexe 7	45
8	Obligations générales liées à la certification (Article 5.1.4.)	Annexe 8	47
9.1	Peste de l'écrevisse (<i>Aphanomyces astaci</i>) (chapitre 9.1.)	Annexe 9	49
9.2	Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)	Annexe 10	57
9.3	Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.)	Annexe 11	65
9.4	Myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.)	Annexe 12	73
9.5	Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.)	Annexe 13	81
9.6	Syndrome de Taura (chapitre 9.6.)	Annexe 14	89
9.7	Maladie des points blancs (chapitre 9.7.)	Annexe 15	95
9.8	Maladie des queues blanches (chapitre 9.8.)	Annexe 16	103
10	Nouveau chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau chapitre 9.X.)	Annexe 17	109
11	Version révisée de l'article X.X.8. (sans et avec suivi des modifications)	Annexe 18A (sans suivi des modifications) et 18B (avec suivi des modifications)	115

Numéro du point	Textes proposés à l'adoption	Numéro de l'annexe	Numéro du point
Manuel aquatique			
18	Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau chapitre 2.2.X.)	Annexe 19	119
19	Peste de l'écrevisse (<i>Aphanomyces astaci</i>) (chapitre 2.2.1.)	Annexe 20	133
20	Nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse (chapitre 2.2.3.)	Annexe 21	155
21	Myonécrose infectieuse (chapitre 2.2.4.)	Annexe 22	177
22	Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 2.2.5.)	Annexe 23	191
23	Syndrome de Taura (chapitre 2.2.6.)	Annexe 24	205
24	Maladie des queues blanches (chapitre 2.2.8.)	Annexe 25	225
Numéro du point	Annexes soumises aux États membres pour commentaire	Numéro de l'annexe	Numéro du point
Code aquatique			
5	Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique (chapitre 1.5.)	Annexe 26	241
15	Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques (chapitre 5.4.)	Annexe 27	245
Manuel aquatique			
25	Maladie des points blancs (chapitre 2.2.7.)	Annexe 28	247
Numéro du point	Annexes soumises aux États membres pour commentaire	Numéro de l'annexe	Numéro du point
4.2	Version révisée de l'évaluation de l'infection à <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> au regard des critères d'inclusion dans la liste des maladies du <i>Code aquatique</i>	Annexe 29	263
4.4	Fiche technique pour le virus du tilapia lacustre	Annexe 30	269
J	Plan de travail 2017/2018 de la Commission pour les normes sanitaires des animaux aquatiques	Annexe 31	273

A. RÉUNION AVEC LE DIRECTEUR GÉNÉRAL ADJOINT

Les experts de la Commission des animaux aquatiques ont rencontré le docteur Matthew Stone, Directeur général adjoint (en charge des questions liées aux normes internationales et à la science), le 22 février 2017. Le docteur Stone a accueilli les membres de la Commission des animaux aquatiques et les a remerciés pour leur appui et leur engagement à atteindre les objectifs de l'OIE dans le domaine de la santé des animaux aquatiques.

Le docteur Stone a informé la Commission de la tenue prochaine de la session du Conseil et des propositions qui lui seront soumises, notamment celle concernant la nouvelle procédure d'élection des experts et celle relative au budget prévisionnel. Il a expliqué que les coûts liés aux travaux de normalisation de l'OIE (par exemple, l'établissement de groupes ad hoc) étaient en augmentation. Le docteur Stone a également souligné les efforts déployés par le siège de l'OIE pour améliorer l'efficacité du fonctionnement des Commissions spécialisées, par la mise en place de meilleurs systèmes de coordination, offrant ainsi une orientation plus claire et un soutien renforcé aux programmes de travail, améliorant la communication en interne et renforçant la compréhension des rôles et des responsabilités de chacun.

Le docteur Ingo Ernst, Président de la Commission des animaux aquatiques, a remercié le docteur Stone pour son allocation d'ouverture et a indiqué que la Commission des animaux aquatiques avait un programme de travail ambitieux, qui incluait des améliorations significatives à apporter au *Code aquatique* comme au *Code terrestre*. Le docteur Ernst a souligné que le soutien du siège de l'OIE et du personnel du Secrétariat, notamment dans l'organisation du fonctionnement des groupes ad hoc, était essentiel à la mise en œuvre du plan de travail de la Commission des animaux aquatiques et à sa réponse aux attentes des États membres.

B. ADOPTION DE L'ORDRE DU JOUR

Le projet d'ordre du jour, adressé préalablement à la tenue de la réunion, a été discuté, mis à jour et validé. L'ordre du jour de la réunion adopté figure en **annexe 2**.

C. RÉUNION AVEC LE PRÉSIDENT DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX TERRESTRES DE L'OIE

Le Président de la Commission des animaux aquatiques a rencontré, pendant la semaine où les deux Commissions tenaient leur réunion respective, le Président de la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres (ci-après désignée par la « Commission du Code »), afin d'aborder les sujets d'intérêt commun au *Code* et au *Manuel aquatiques*, notamment l'harmonisation des termes du glossaire (en particulier la définition de « zonage » ainsi que la révision en cours des définitions utilisées dans le *Code terrestre*), la proposition de révisions à apporter au chapitre 1.2. du *Code aquatique* (relatif aux critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la liste de l'OIE), ainsi que la proposition d'élaborer un document d'orientation sur l'application des critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la liste de l'OIE.

La Commission des animaux aquatiques a rappelé que ces réunions étaient importantes car elles facilitaient le travail d'harmonisation des chapitres horizontaux correspondants des deux Codes.

D. EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES CONCERNANT LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

Point 1. Commentaires d'ordre général

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par l'Argentine, l'Australie, la Colombie, le Costa Rica, Fiji, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, la Thaïlande et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a souscrit à un commentaire d'État membre rappelant que, bien que l'harmonisation entre les *Codes aquatique* et *terrestre* soit souhaitable, il demeurera toujours des aspects pour lesquels cette démarche ne sera pas appropriée en raison des différences entre animaux aquatiques et terrestres. Il a été cité, comme exemple, le grand nombre d'espèces d'animaux aquatiques ainsi que la diversité des facteurs environnementaux et agents pathogènes auxquels ils sont exposés.

En réponse à un commentaire d'État membre relatif aux orientations sur les risques de maladie et le stress généré par le transport chez les animaux aquatiques, la Commission des animaux aquatiques a rappelé que ces aspects étaient traités au chapitre 5.5. relatif au contrôle des risques sanitaires encourus par les animaux aquatiques pendant le transport et au chapitre 7.2. relatif au bien-être des poissons d'élevage pendant le transport.

Un État membre a également fait savoir que le sens de certains mots du *Code aquatique* était difficile à interpréter, notamment « *est probablement* », « *l'éventualité /la probabilité* » et « *serait probablement* ». La Commission des animaux aquatiques a examiné l'utilisation qui était faite de ces termes dans le *Code aquatique* et en a conclu que le sens donné était clair au regard des paragraphes dans lesquels ils apparaissaient. Par exemple, le terme « *probabilité* » est utilisé dans le chapitre 2.1. relatif à l'analyse des risques du *Code aquatique*.

Un État membre a demandé que soit justifiée l'inclusion du texte suivant aux articles X.X.9. et X.X.11. : « peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise susvisé à des fins autres que la consommation humaine. ». La Commission des animaux aquatiques a indiqué que les produits auxquels il est fait référence à l'article X.X.11. ne sont pas nécessairement indemnes d'agents pathogènes viables et que des contrôles peuvent être envisagés afin d'interrompre le cycle de transmission et de prévenir l'exposition des animaux sensibles. Par conséquent, le texte ajouté a pour objectif d'alerter les États membres de ce risque potentiel et de les encourager à mettre en place des mesures internes appropriées visant à atténuer les risques lorsque cela s'avère nécessaire.

Point 2. Glossaire

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par la République populaire de Chine, la Colombie, le Costa Rica, Fiji, le Guatemala, la Nouvelle-Zélande, l'Arabie Saoudite, la Tanzanie et l'UE.

Animaux aquatiques

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que la définition actuelle du terme « animaux aquatiques » inclut aussi bien les animaux aquatiques d'élevage que les animaux aquatiques sauvages. Les mesures proposées dans le *Code aquatique* s'appliquent aux animaux aquatiques sensibles, indépendamment de leur milieu d'origine, qu'il s'agisse du milieu sauvage ou d'un élevage.

La Commission des animaux aquatiques a refusé la demande d'un État membre de définir les animaux aquatiques comme les animaux provenant d'un écosystème aquatique, en arguant du fait que le *Code aquatique* n'était pas destiné aux espèces terrestres.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un État membre de supprimer l'adjectif « viable » figurant dans la version révisée de la définition car elle considère qu'il contribue à la clarté de la définition du terme défini.

Zonage

En réponse aux commentaires de plusieurs États membres et aux propositions de modifications de la définition du terme « zone » formulées par la Commission du Code, la Commission des animaux aquatiques a procédé, lorsque cela s'avérait nécessaire, à des amendements permettant d'en garantir l'harmonisation avec la définition figurant dans le *Code terrestre* ainsi que l'amélioration de la lisibilité et de la clarté. La Commission a abondé dans le sens d'un État membre estimant que le terme « système hydrologique ininterrompu » était peu clair et a décidé de supprimer ce texte jugé inutile.

Produits biologiques

La Commission des animaux aquatiques a indiqué que les mots « agents infectieux » seraient remplacés par les mots « agents pathogènes » afin de poursuivre la démarche entreprise pour que le terme défini « agent pathogène » soit employé de façon systématique dans tout le *Code aquatique* (voir texte ci-dessous).

Maladie

La Commission des animaux aquatiques a indiqué que les mots « agents étiologiques » seraient remplacés par les mots « agents pathogènes » afin de poursuivre la démarche entreprise pour que le terme défini « agent pathogène » soit employé de façon systématique dans tout le *Code aquatique* (voir texte ci-dessous).

Utilisation du terme agent pathogène

La Commission des animaux aquatiques a fait remarquer qu'en dépit du travail engagé pour instituer de façon progressive l'emploi systématique du terme défini « agent pathogène » dans l'ensemble du *Code aquatique*, il demeurerait encore plusieurs paragraphes dans lesquels d'autres termes, tels que « pathogène » et « agent étiologique », étaient utilisés, notamment dans les chapitres horizontaux (titres 1 à 7). Elle a ajouté qu'il était nécessaire de procéder à la substitution de ces termes par le terme « agent pathogène ». La Commission des animaux aquatiques est convenue d'effectuer les amendements de façon progressive, au gré des révisions de chapitres entreprises pour chacun de ces titres. La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que des révisions similaires seraient progressivement réalisées dans les chapitres traitant des maladies spécifiques (titres 8 à 11), dans le cadre des travaux en cours de mise à jour des listes d'espèces sensibles.

Autre information d'intérêt

La Commission des animaux aquatiques a examiné la version révisée des définitions figurant dans le glossaire du *Code terrestre*, qui sera proposée à l'adoption en mai 2017. Elle a également examiné les propositions de modifications de définitions visant à garantir l'harmonisation entre les définitions des deux Codes, qui seront soumises aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires. La Commission des animaux aquatiques est convenue de réviser les définitions correspondantes du *Code aquatique* dès lors que la version révisée des définitions du *Code terrestre* aura été adoptée.

La version révisée du glossaire est présentée en **annexe 3** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 3. Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE (chapitre 1.2.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par l'Australie, le Canada, la République populaire de Chine, l'Arabie Saoudite, la Tanzanie, la Thaïlande et les États-Unis d'Amérique et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a indiqué que la majorité des commentaires des États membres étaient en faveur de la version révisée des critères. Elle a ajouté que plusieurs des commentaires reçus lui avaient déjà été soumis antérieurement et avaient fait l'objet d'une réponse de sa part lors de précédentes réunions.

En réponse à un commentaire d'État membre concernant les difficultés rencontrées pour interpréter les critères, la Commission des animaux aquatiques est convenue d'élaborer un document d'orientations afin de faciliter leur application. La Commission des animaux aquatiques utilisera ce document d'orientations lors de l'examen des évaluations afin de s'assurer de la cohérence de l'interprétation des critères. La Commission des animaux aquatiques communiquera ce document à la Commission du Code.

La Commission des animaux aquatiques a rappelé que la justification du non alignement du texte du critère 1 de l'article 1.2.2. sur celui figurant dans le *Code terrestre* (dans lequel figure « a été prouvée » et non « est probable »), figure dans le rapport de réunion de septembre 2016 :

« La Commission des animaux aquatiques a souligné à nouveau que l'objectif de l'inclusion dans la Liste des maladies était d'« empêcher la propagation transfrontalière de maladies importantes affectant les animaux aquatiques au moyen de pratiques transparentes et cohérentes de déclaration. » La Commission des animaux aquatiques a insisté sur le fait qu'il serait contraire à l'objectif de l'inclusion d'un agent pathogène dans la Liste des maladies d'attendre que soit prouvée « la propagation internationale d'un agent » alors que des preuves scientifiques et le modèle d'échanges internationaux indiquent que la propagation est probable. Cela est particulièrement important pour les maladies des animaux aquatiques car il est le plus souvent impossible de les éradiquer une fois qu'elles se sont propagées. »

La Commission des animaux aquatiques a souligné qu'elle refusait de remplacer le « peut (démontrer) » par « a (démontré) » dans la partie concernant la démonstration de l'absence de maladie dans le pays et a rappelé qu'elle avait répondu de la sorte à ce même commentaire lors de sa réunion d'octobre 2015. Le mot « peut (démontrer) » est plus approprié car il est exigé de la part des États membres qu'ils aient mis en place des conditions de sécurité biologique élémentaires depuis au moins 2 ans pour pouvoir déposer une auto-déclaration d'absence d'une des maladies listées par l'OIE.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un État membre d'ajouter du texte ayant trait aux maladies émergentes. En effet, rapporter leur apparition, par l'intermédiaire du Système mondial d'information zoonitaire de l'OIE (WAHIS), est une obligation faite aux États membres, conformément aux dispositions de l'article 1.1.6. du *Code aquatique*. La Commission des animaux aquatiques a rappelé que cet article était un article particulièrement important du *Code aquatique* en raison de l'apparition régulière de maladies émergentes chez les animaux aquatiques.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un État membre de définir les termes « précise » et « fiable » figurant au critère 3, en expliquant que l'utilisation de ces termes était cohérente avec la définition qui en était donnée dans l'Oxford English Dictionary et au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique*.

Après avoir examiné l'ensemble des commentaires formulés par les États membres, la Commission des animaux aquatiques a estimé de ne plus avoir à procéder à des amendements supplémentaires du texte puisqu'aucun nouveau sujet n'a été soulevé.

La version révisée du chapitre 1.2. *Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE* est présentée en **annexe 4A** (version exempte du suivi des modifications) et en **annexe 4B** (version avec suivi des modifications) ; elle sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 4. Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par le Canada, la République populaire de Chine, le Costa Rica, le Guatemala, la Tanzanie et l'UE.

En réponse à la proposition d'un État membre d'amender le texte figurant dans le préambule de façon à ce qu'il intègre les amendements proposés à l'adoption dans le texte correspondant du chapitre 1.3. du *Code terrestre*, la Commission des animaux aquatiques s'est dit prête à initier le travail d'harmonisation dans le *Code aquatique* dès lors que la version révisée du texte aura été adoptée dans le *Code terrestre*.

4.1. Noms amendés des maladies des crustacés

Les commentaires des États membres étaient en faveur des amendements proposés concernant les noms de huit des maladies de crustacés listées à l'article 1.3.3.

La Commission des animaux aquatiques a refusé la proposition d'un État membre d'inclure « *Candidatus* » dans le nom de la maladie listée « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) ». Toutefois, la Commission a accepté de faire figurer « *Candidatus* » à l'article 9.5.1., où il est fait référence à la classification taxonomique de cette bactérie.

4.2. *Batrachochytrium salamandrivorans*

Plusieurs États membres étaient en faveur de l'inclusion de cette maladie dans la Liste de l'OIE. Toutefois, certains États membres n'étaient pas convaincus que le critère n°8 de l'article 1.2.2. soit satisfait. La Commission des animaux aquatiques a donc procédé à nouveau à l'évaluation de la méthode PCR (amplification en chaîne par polymérase [*polymerase chain reaction*]) en temps réel disponible (Blooi *et al.*, 2013), notant que l'étape 1 de la validation était achevée et que l'étape 2 avait été initiée et était toujours en cours. La Commission des animaux aquatiques a fait remarquer que si cette nouvelle méthode était appliquée, il fallait s'attendre à ce que les informations complémentaires requises deviennent enfin disponibles et permettent de faire progresser le processus de validation du test. La Commission des animaux aquatiques a actualisé le texte figurant au critère 8 de l'évaluation (voir annexe 29).

En réponse à un commentaire d'État membre, la Commission des animaux aquatiques est convenue que la nomination d'un Laboratoire de référence pour les infections à *Batrachochytrium* spp. serait souhaitable. Des mesures ont été prises afin d'identifier des candidats potentiels.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les nouvelles exigences réglementaires des États-Unis d'Amérique (information disponible à partir du lien hypertexte suivant : <https://www.federalregister.gov/documents/2016/01/13/2016-00452/injurious-wildlife-species-listing-salamanders-due-to-risk-of-salamander-chytrid-fungus>) ainsi que le rapport relatif à *Bsal*¹ de l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) et actualisé son évaluation en conséquence (voir annexe 29).

¹(AESAs), Baláž V., Gortázar Schmidt C., Murray K., Carnesecchi E., Garcia A., Gervelmeyer A., Martino L., Munoz Guajardo I., Verdonck F., Zancanaro G. & Fabris C. (2017). Scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) in the EU. *EFSA Journal* 2017;15 (2), 4739, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4739.

La Commission des animaux aquatiques a réitéré sa proposition d'inclure *Batrachochytrium salamandrivorans* dans la Liste des maladies de l'OIE.

La version révisée de l'évaluation de l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans* est présentée aux États membres en **annexe 29** à titre informatif. Elle constitue un appui à la proposition d'inclusion cette maladie dans la Liste de l'OIE.

4.3. Infection à Ranavirus

La Commission des animaux aquatiques a de nouveau amendé la version du nom de maladie qu'elle avait révisé, « infection à *Ranavirus* spp. », en « infection par des espèces du genre *Ranavirus* », car la nomenclature binomiale n'est pas communément employée dans le cas des virus. Le champ d'application de cette maladie listée (décrite au chapitre 8.2.) couvre l'ensemble des espèces appartenant au genre *Ranavirus* (à l'exception de l'espèce responsable de la nécrose hématopoïétique épizootique, qui est listé séparément). La Commission des animaux aquatiques estime que la version révisée du nom est plus en adéquation avec ce champ d'application.

En réponse à un État membre suggérant que chacune des espèces de ranavirus devrait faire l'objet d'une inclusion individuelle dans la Liste des maladies de l'OIE, la Commission des animaux aquatiques a indiqué que le Comité international de taxonomie des virus étudiait la classification des ranavirus. Les résultats de ces travaux devraient constituer une aide à la décision concernant les amendements à apporter à la liste actuelle de ranavirus.

La version révisée du chapitre 1.3. *Maladies listées par l'OIE* est présentée en **annexe 5** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

4.4. Évaluation conduite pour un nouveau virus proche des orthomyxovirus, le virus du tilapia lacustre (TiLV)

En raison d'une publication récente sur les méthodes de diagnostic pour le virus du tilapia lacustre (TiLV), la Commission des animaux aquatiques a de nouveau procédé à l'évaluation de l'infection par le TiLV au regard du critère n°8 (Existence d'une méthode pratique et reproductible de détection ou de diagnostic) des critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE (chapitre 1.2.). La Commission des animaux aquatiques a examiné les nouvelles informations disponibles et en a conclu qu'elles ne modifiaient en rien les résultats de sa précédente évaluation, à savoir que la maladie ne pouvait pas être listée pour le moment, en raison de l'absence de méthodes de diagnostic spécifiques pour le TiLV.

La Commission des animaux aquatiques a reconnu l'intérêt potentiel que revêtait le TiLV pour de nombreux pays, en raison de l'importance de l'élevage et du commerce du tilapia dans le monde. La Commission des animaux aquatiques a indiqué que l'infection par le TiLV répondait à la définition de « maladie émergente » et que, par conséquent, elle devait être déclarée conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

La Commission des animaux aquatiques a constaté que de récents événements sanitaires associés à la présence du TiLV n'avaient pas été déclarés à l'OIE, conformément aux obligations décrites au chapitre 1.1. Les États membres sont encouragés à investiguer les épisodes de mortalité et de morbidité chez les tilapiinés. En effet, la connaissance de la distribution géographique du TiLV est essentielle pour orienter les efforts dans la lutte contre sa propagation potentielle.

Afin de fournir aux États membres des informations sur les méthodes de détection disponibles et les risques de transmission du virus, la Commission des animaux aquatiques a finalisé la fiche technique sur le TiLV. Cette fiche technique pourra être téléchargée à partir du site Internet de l'OIE début avril 2017 (cliquer sur le lien hypertexte suivant : <http://www.oie.int/fr/normes-internationales/commissions-specialisees-et-groupes/commission-animaux-aquatiques-et-rapports/disease-information-cards/>).

La fiche technique sur le virus du tilapia lacustre (TiLV) est présentée aux États membres en **annexe 30** à titre informatif.

Point 5. Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique (chapitre 1.5.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Nouvelle-Zélande, l'Arabie Saoudite, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

Plusieurs États membres ont approuvé le nouvel article 1.5.9. Toutefois, d'autres États membres ont exprimé certaines inquiétudes, notamment concernant la difficulté à définir clairement ce qu'on entend par « un nombre important d'hôtes » et les implications que lister des espèces sensibles au niveau d'un groupe taxonomique pourrait avoir.

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que l'objectif du *Code aquatique* était de prévenir la propagation des maladies des animaux aquatiques et d'assurer la sécurité sanitaire des échanges commerciaux internationaux dont ils font l'objet. L'application des critères actuels à des maladies pour lesquelles il a été prouvé que le nombre d'hôtes était important (par exemple, l'infection à *Aphanomyces astaci* et l'infection par le virus du syndrome des points blancs) aurait comme résultat une réduction substantielle de la liste des espèces sensibles à ces maladies. Par conséquent, les mesures prévues pour ces maladies dans le *Code aquatique* ne s'appliqueraient plus à de nombreuses espèces hôtes probablement sensibles mais pour lesquelles les informations scientifiques font défaut. La Commission des animaux aquatiques a indiqué qu'une telle situation serait contraire aux objectifs du *Code aquatique* et pourrait engendrer la propagation de maladies listées.

La Commission des animaux aquatiques a proposé une nouvelle version de l'article 1.5.9. en réponse au problème soulevé, en y incluant un mécanisme permettant de lister des groupes taxonomiques d'espèces comme étant sensibles. Ce mécanisme est destiné à n'être appliqué qu'aux maladies pour lesquelles le nombre d'hôtes est important.

La Commission des animaux aquatiques a pris en compte les commentaires de certains États membres pour amender le nouvel article 1.5.9. Elle a notamment clarifié les conditions à remplir pour que les dispositions de cet article soient appliquées. La Commission des animaux aquatiques a également amendé le texte des articles 1.5.1. et 1.5.2. afin qu'il soit cohérent avec le texte du nouvel article 1.5.9.

En outre, la Commission des animaux aquatiques a demandé que le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE procède à l'évaluation de l'infection à *Aphanomyces astaci* en s'appuyant sur la version révisée du chapitre 1.5. Cette évaluation constituera, pour les États membres, un exemple d'application des critères révisés, notamment du nouvel article 1.5.9. La Commission des animaux aquatiques a demandé que le groupe ad hoc conduise ses travaux par voie électronique et lui adresse un rapport avant sa réunion de septembre 2017.

La version révisée du chapitre 1.5. *Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique* est présentée aux États membres en **annexe 26** afin qu'ils la commentent.

Point 6. Désinfection des établissements d'aquaculture et de leur équipement (chapitre 4.3.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par la République populaire de Chine, le Costa Rica, le Guatemala, la Nouvelle-Zélande, l'Arabie Saoudite, la Tanzanie, la Thaïlande, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération les commentaires reçus des États membres et a procédé aux amendements en conséquence, afin d'améliorer la clarté et la lisibilité du texte. Notant que ce nouveau chapitre avait déjà fait l'objet de nombreux échanges avec les États membres préalablement à son adoption en 2016, la Commission a uniquement proposé des amendements améliorant de façon significative la clarté du texte.

La version révisée du chapitre 4.3. « Désinfection des établissements d'aquaculture et de leur équipement » est présentée en **annexe 6** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 7. Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par la Norvège et l'UE.

Après avoir examiné les commentaires de plusieurs États membres, la Commission des animaux aquatiques est convenue de cesser d'amender le texte, ses membres estimant que la version proposée était suffisamment claire.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté le commentaire d'un État membre proposant d'inclure une recommandation sur l'élimination appropriée des solutions de désinfectant à des fins de protection de l'environnement. Elle a indiqué que cette proposition d'ajout n'entrait pas dans le champ d'application du chapitre.

La Commission des animaux aquatiques est convenu de ne pas remplacer le terme « pathogène » par le terme « agent pathogène » à l'article 4.4.2. En effet, son emploi dans le contexte du chapitre n'est pas pertinent car il n'est pas question d'un agent pathogène spécifique.

La version révisée du chapitre 4.4. *Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés* est présentée en **annexe 7** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 8. Obligations générales liées à la certification (chapitre 5.1.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par l'Argentine, l'Australie, l'Arabie Saoudite, la Thaïlande et l'UE.

Au regard des commentaires qui lui ont été adressés par les États membres, la Commission des animaux aquatiques a décidé de ne plus amender le texte, ses membres estimant que la version proposée était suffisamment claire.

La Commission des animaux aquatiques a souhaité rappeler que le terme « période d'incubation », qui figure dans un article similaire du *Code terrestre*, n'apparaissait pas dans ce texte car il n'était pas utilisé dans le *Code aquatique*. La Commission s'est attachée à rappeler qu'en raison de la grande variété des espèces hôtes et des paramètres environnementaux, il est inenvisageable de déterminer la période d'incubation des agents pathogènes affectant les animaux aquatiques, contrairement à ce qui est observé chez les animaux terrestres.

La version révisée du chapitre 5.1. *Obligations générales liées à la certification* est présentée en **annexe 8** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 9. Amendements apportés aux chapitres traitant des maladies spécifiques des crustacés

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par le Canada, le Costa Rica, le Guatemala, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, la Tanzanie et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres pour chacun des chapitres traitant des maladies des crustacés, les a amendés en conséquence et s'est assurée de leur harmonisation.

La Commission des animaux aquatiques a convenu i) de supprimer la référence aux « animaux aquatiques » figurant aux articles X.X.3. et X.X.11. puisque seuls les produits issus d'animaux aquatiques sont listés dans ces articles ; ii) d'ajouter les produits issus d'animaux aquatiques à l'article X.X.10. car cet article s'applique également à ces produits ; iii) d'amender le point 2) des articles X.X.9. et X.X.10. afin d'en améliorer la lisibilité et d'y inclure une référence au chapitre 5.5. et iv) d'ajouter un point 3) aux articles X.X.9. et X.X.10. afin de traiter de façon séparée la gestion des effluents et des déchets.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un État membre de désigner les espèces par un nom abrégé lorsqu'il était utilisé pour la seconde fois dans l'article X.X.2. L'ordonnancement des espèces sensibles étant réalisée selon l'ordre alphabétique, la Commission des animaux aquatiques a estimé que l'inclusion du nom du genre en toutes lettres était nécessaire afin d'assurer la clarté du texte.

La Commission des animaux aquatiques a noté que l'article X.X.8. avait été amendé conformément au modèle d'article X.X.8. (voir point 11).

9.1. Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) (chapitre 9.1.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que la liste des espèces sensibles figurant à l'article 9.1.2. de l'édition 2016 du *Code aquatique* demeurera inchangée tant que la question des espèces ayant un nombre important d'hôtes n'aura pas été résolue (voir point 5).

La version révisée du chapitre 9.1. *Peste de l'écrevisse (Aphanomyces astaci)* est présentée en **annexe 9** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.2. Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La version révisée du chapitre 9.2. *Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune* est présentée en **annexe 10** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.3. Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un État membre de supprimer *Macrobrachium rosenbergii* de la liste des espèces sensibles figurant à l'article 9.3.2. car elle considère que les preuves disponibles suffisent à justifier de son inclusion dans la liste. La Commission des animaux aquatiques a demandé au groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE de réviser son évaluation en prenant en compte la référence fournie. Le groupe ad hoc a défendu à nouveau la validité scientifique de l'article de Hsieh *et al.* (2006). Ce document décrit une infection naturelle et appuie ainsi fortement l'hypothèse selon laquelle *M. rosenbergii* est sensible à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse. Le virus a non seulement pu être détecté par PCR mais également par hybridation *in situ* dans les noyaux infectés. En outre, des signes cliniques évocateurs de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ont été observés.

Référence : Hsieh C.Y., Chuang P.C., Chen L.C., Tu C., Chien M.S., Huang K.C., Kao H.F., Tung M.C. & Tsai S.S. (2006). Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 258, 73–79.

À la lumière de l'avis exprimé par cet expert, la Commission des animaux aquatiques a décidé que *Macrobrachium rosenbergii* demeurerait dans la liste des espèces sensibles figurant à l'article 9.3.2.

La version révisée du chapitre 9.3. *Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* est présentée en **annexe 11** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.4. Myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La version révisée du chapitre 9.4. *Myonécrose infectieuse* est présentée en **annexe 12** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.5. Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

En réponse à un commentaire d'État membre, la Commission des animaux aquatiques a accepté d'intégrer le terme « *Candidatus* » au nom taxonomique de la bactérie figurant à l'article 9.5.1. Toutefois, dans un souci de simplicité, le terme « *Candidatus* » ne sera pas inclus dans la proposition de nom officiel de la maladie « Infection par *Hepatobacter penaei* » (voir point 4.1. ci-dessus).

La version révisée du chapitre 9.5 *Hépatopancréatite nécrosante* est présentée en **annexe 13** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.6. Syndrome de Taura (chapitre 9.6.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La version révisée du chapitre 9.6 *Syndrome de Taura* est présentée en **annexe 14** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.7. Maladie des points blancs (chapitre 9.7.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que la liste des espèces sensibles figurant à l'article 9.7.2. de l'édition 2016 du *Code aquatique* demeurera inchangée tant que la question des espèces ayant un nombre important d'hôtes n'aura pas été résolue (voir point 5).

La version révisée du chapitre 9.7. *Maladie des points blancs* est présentée en **annexe 15** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

9.8. Maladie des queues blanches (chapitre 9.8.)

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme convenu ci-dessus.

La version révisée du chapitre 9.8. *Maladie des queues blanches* est présentée en **annexe 16** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 10. Nouveau chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau chapitre 9.X.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par le Canada, le Costa Rica, le Guatemala et la Nouvelle-Zélande.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence.

La Commission des animaux aquatiques a décidé d'appliquer les modifications ayant un caractère horizontal comme indiqué au point 9 ci-dessus.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un État membre de remplacer le nom « maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe » par « infection par *Vp_{AHPND}* » car elle estime que les espèces de *Vibrio* associées à la maladie vont probablement évoluer au cours du temps. Utiliser un nom générique pour désigner la maladie devrait permettre de faciliter l'ajout de nouveaux agents pathogènes dans la définition de la maladie figurant à l'article 9.X.1.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition de plusieurs États membres d'étendre le champ d'application de l'article 9.X.1. à d'autres espèces que *Vibrio parahaemolyticus*. La Commission des animaux aquatiques a justifié son refus par l'insuffisance de données publiées démontrant le rôle d'autres espèces de *Vibrio* comme agents causatifs de la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe. La Commission des animaux aquatiques assurera la veille scientifique concernant la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe et amendera l'article 9.X.1. si de nouvelles données pertinentes le justifient.

La Commission des animaux aquatiques a corrigé une erreur identifiée par un État membre dans le rapport du groupe ad hoc sur la sécurité sanitaire des produits issus d'animaux aquatiques d'août 2016, à savoir que les produits à base de crustacés pasteurisés ont été évalués au regard des critères de l'article 5.4.1. Le rapport du groupe ad hoc est accessible à partir du lien hypertexte suivant: <http://www.oie.int/en/standard-setting/specialists-commissions-working-groups/scientific-commission-reports/ad-hoc-groups-reports/>.

La version révisée du chapitre 9.X. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe » est présentée en **annexe 17** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 11. Version révisée du modèle d'article X.X.8.

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par l'Australie, le Costa Rica, le Guatemala et la Nouvelle-Zélande.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence.

En réponse à la proposition d'un État membre d'amender le terme « quarantaine », l'estimant non compatible avec un « maintien à vie », la Commission des animaux aquatiques a rappelé que la définition de « quarantaine » figurant dans le *Code aquatique* prévoyait qu'elle dure pendant « une période de temps déterminée ». Elle a souligné que, lorsque des animaux aquatiques sont importés depuis un pays non indemne d'un agent pathogène spécifique, leur maintien à vie en quarantaine se justifiait pleinement. La Commission des animaux aquatiques a également ajouté le mot « importés » à plusieurs endroits du texte afin de clarifier la référence faite aux animaux aquatiques importés.

La Commission des animaux aquatiques a expliqué qu'au point 3)a)ii, le « statut sanitaire élevé » faisait référence au meilleur statut sanitaire possible au regard d'une maladie listée spécifique. Elle a précisé que cet article s'appliquerait aux pays non indemnes d'une maladie spécifique.

La Commission des animaux aquatiques a indiqué qu'en cas d'adoption de ce modèle d'article X.X.8., il serait alors intégré dans l'ensemble des chapitres traitant des maladies spécifiques.

La version révisée de l'article X.X.8. est présentée en **annexe 18A** (version exempte du suivi des modifications) et en **annexe 18B** (version avec suivi des modifications) ; elle sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 12. Inclusion de recommandations relatives à la désinfection de surface des œufs d'espèces autres que les salmonidés. Il doit s'agir d'espèces pour lesquelles la désinfection des œufs est couramment pratiquée et importante pour garantir la sécurité sanitaire des échanges commerciaux.

La Commission des animaux aquatiques a accueilli favorablement les suggestions de plusieurs États membres concernant le possible ajout des protocoles de désinfection de surface des œufs d'espèces autres que les salmonidés. Toutefois, la Commission des animaux aquatiques a indiqué qu'aucun protocole de désinfection validé ne lui avait été communiqué. Elle a donc pris la décision de renoncer à l'élaboration de recommandations spécifiques pour les œufs d'espèces autres que les salmonidés.

En raison du risque significatif associé à cette voie de transmission des maladies, la Commission des animaux aquatiques veut inciter les États membres à lui fournir des informations sur des protocoles validés afin d'être en mesure de pouvoir réexaminer cette question. La Commission des animaux aquatiques encourage également les États membres à soutenir les démarches entreprises au niveau national pour valider les méthodes commerciales normalisées utilisées pour la désinfection des œufs et larves d'animaux aquatiques.

Point 13. Iridovirose de la daurade japonaise (chapitre 10.8.)

Des commentaires spécifiques ont été adressés à la Commission des animaux aquatiques. Ils ont été formulés par l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a relevé une erreur dans les *Code* et *Manuel aquatiques* dans lesquels l'espèce *Thunnus thynnus* est désignée par le nom vernaculaire « Albacore ». La Commission des animaux aquatiques a indiqué que cette question ne pourrait pas être résolue simplement en modifiant le nom scientifique ou le nom vernaculaire. Elle a ajouté qu'elle serait examinée dans le cadre du travail entrepris par le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de poissons [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE.

E. AUTRES POINTS CONCERNANT LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE ET LES TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS**Point 14. Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques (chapitre 5.4.)**

La Commission des animaux aquatiques a relevé un certain nombre d'incohérences entre le texte du chapitre 5.4. relatif aux critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques et celui des articles connexes X.X.3. et X.X.11./12. figurant dans les chapitres traitant des maladies spécifiques. Il a été procédé aux amendements concernés, notamment le retrait des références aux animaux aquatiques car ce chapitre est destiné à être appliqué aux produits issus d'animaux aquatiques.

La version révisée du chapitre 5.4. « Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques » est présentée aux États membres en **annexe 27** afin qu'ils la commentent.

Point 15. Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de poissons [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a été informée que le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de poissons [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE s'est réuni pour la première fois en décembre 2016 et a conduit les évaluations sur la sensibilité des espèces de poisson (conformément aux dispositions figurant à l'article 1.5.3. du chapitre 1.5. du *Code aquatique*) à i) la nécrose hémato-poïétique infectieuse, ii) l'infection à *Gyrodactylus salaris* et iii) l'herpès-virose de la carpe koï. Le groupe ad hoc finalisera ces trois évaluations et initiera ses travaux de révision sur la virémie printanière de la carpe, l'infection par l'alphavirus des salmonidés et l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon lors de sa prochaine réunion, en avril 2017.

La Commission des animaux aquatiques a apprécié l'excellent travail réalisé par le groupe ad hoc à ce jour et a demandé que lui soit soumis un rapport incluant les listes révisées des espèces sensibles pour les six maladies, pour lequel elle tiendra compte des conclusions lors de sa réunion en septembre 2017.

Point 16. Groupe ad hoc sur l'auto-déclaration d'absence de maladie

La Commission des animaux aquatiques a examiné le projet de rapport du groupe ad hoc sur l'auto-déclaration d'absence de maladie, qui s'est réuni du 17 au 19 janvier 2017. La Commission des animaux aquatiques a également tenu une téléconférence avec le président de ce groupe ad hoc. Elle a reconnu qu'il s'agissait d'un domaine de travail important et complexe, en relation avec de nombreuses autres parties du *Code aquatique*. La Commission des animaux aquatiques a demandé que le groupe ad hoc se réunisse à nouveau afin d'achever l'élaboration d'un modèle de texte destiné aux chapitres traitant des maladies spécifiques. Elle a également demandé qu'il lui fasse parvenir un rapport avant la tenue de sa réunion de septembre 2017.

Point 17. Groupe ad hoc sur la sécurité biologique appliquée aux animaux aquatiques

La Commission des animaux aquatiques a été informée qu'un groupe ad hoc sur la sécurité biologique appliquée aux animaux aquatiques dans les établissements d'aquaculture sera réuni pour initier ces travaux. Cette réunion sera organisée avant la tenue de la prochaine réunion de la Commission des animaux aquatiques en septembre 2017.

F. EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES CONCERNANT LE MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Canada, la République populaire de Chine, le Japon, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, Singapour, la Suisse, la Thaïlande, Tapei chinois, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres concernant les chapitres sur les maladies de crustacés et amendé le texte en conséquence.

La Commission des animaux aquatiques a examiné la proposition d'un État membre d'amender la définition d'un cas confirmé d'infection par l'alphavirus des salmonidés. Bien que ce chapitre ne soit pas en cours de révision, la Commission a convenu d'examiner cette proposition dans le cadre de la révision du chapitre selon le nouveau modèle en cours d'élaboration par le groupe ad hoc sur le *Manuel aquatique* (voir point 26).

La Commission des animaux aquatiques a invité l'État membre à se référer au point 14 de son rapport de réunion de septembre 2016, intitulé « *Examen de la littérature traitant de la taxonomie des crevettes du genre Penaeus* », dans lequel figure les arguments sur lesquels repose sa décision de conserver le nom de genre *Penaeus*.

En réponse à plusieurs propositions d'États membres d'amender les titres de certains paragraphes des chapitres du *Manuel aquatique*, la Commission des animaux aquatiques a rappelé que l'ensemble des titres de paragraphes ferait l'objet d'une révision dès lors que le nouveau modèle de chapitre élaboré par le groupe ad hoc sur le *Manuel aquatique* aura été approuvé et intégré au document (voir point 26).

À plusieurs reprises, des amendements aux protocoles d'essai mettant en œuvre la technique PCR ont été proposés. La Commission des animaux aquatiques a indiqué que les États membres devaient fournir une justification aux propositions de modifications des protocoles tels que publiés et démontrer que la performance du test dans les nouvelles conditions de fonctionnement devait être équivalente. Elle a également ajouté qu'il était préférable que la version amendée des protocoles ait fait l'objet d'une validation et d'une publication.

La Commission des animaux aquatiques a décidé de demander aux experts des Laboratoires de référence d'évaluer attentivement les protocoles des tests figurant dans chacun des chapitres et de supprimer toutes les références inutiles à des marques commerciales de produits.

Plusieurs demandes d'ajout ou de suppression d'espèces des paragraphes « *Susceptible host species* » et « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » ont été formulées. La Commission des animaux aquatiques a transféré ces demandes ainsi que les références bibliographiques justificatives les accompagnant au groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE afin qu'il les examine.

Point 18. Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau projet de chapitre 2.2.X.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Canada, la République populaire de Chine, le Japon, la Nouvelle-Zélande, Singapour, la Thaïlande et les États-Unis d'Amérique.

Un État membre a proposé d'inclure d'autres souches de *Vibrio* dans le champ d'application du chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe. La Commission des animaux aquatiques a examiné cette question en la replaçant dans son contexte, à savoir le chapitre du *Code aquatique* dédié à cette maladie. Elle a conclu que, malgré la présence rapportée d'autres espèces de *Vibrio* dans des cas de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, les preuves démontrant que ces espèces pouvaient causer la maladie demeuraient insuffisantes à ce jour.

Dans le paragraphe du chapitre intitulé « Disease information, agent factors », un État membre a demandé le remplacement d'une des références par ce qu'il estimait être la première publication signalant la maladie. La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté cette proposition car si la référence en question décrit effectivement la pathogénicité d'une souche de *Vibrio parahaemolyticus*, ce n'est pas en association avec un cas de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe.

En réponse à une demande de faire figurer les références bibliographiques dans les paragraphes intitulés « *Susceptible host species* » et « *Species with incomplete evidence for susceptibility* », la Commission des animaux aquatiques a rappelé que l'ensemble de ces références était disponible dans le rapport du groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE.

La version révisée du chapitre 2.2.X. *Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe* est présentée en **annexe 19** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 19. Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) (chapitre 2.2.1.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Canada, la République populaire de Chine, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, Singapour, Suisse et l'UE.

En réponse à une proposition de nouvelle mise à jour de ce chapitre, la Commission des animaux aquatiques a voulu rappeler aux États membres qu'une fois que la version révisée de chapitre serait approuvée et intégrée au *Manuel aquatique* (voir point 26), elle servirait de modèle pour la révision de tous les chapitres, dont l'information pertinente serait mise à jour en conséquence.

La Commission des animaux aquatiques a confirmé que, conformément à l'article 9.1.2. du *Code aquatique*, toutes les espèces d'écrevisses des familles des Cambaridae, Astacidae et Parastacidae étaient considérées comme étant sensibles à l'infection à *Aphanomyces astaci*. Par conséquent, les mesures figurant dans le *Code aquatique* s'appliquent à ces espèces lorsqu'elles font l'objet d'échanges commerciaux à l'échelle internationale.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence, en concertation avec les experts des Laboratoires de référence.

La version révisée du chapitre 2.2.1. *Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*)* est présentée en **annexe 20** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 20. Nécrose hypodermique et hématoïétique infectieuse (chapitre 2.2.3.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par la Nouvelle-Zélande, Singapour, la Thaïlande et les États-Unis d'Amérique.

Un État membre a demandé la suppression d'une espèce (le bouquet géant, *Macrobrachium rosenbergii*) du paragraphe intitulé « *Susceptible host species* ». La Commission des animaux aquatiques a indiqué que cette demande avait déjà été traitée par le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE, qui avait confirmé les conclusions de sa précédente évaluation.

Un État membre a signalé que, dans les protocoles des tests de diagnostic moléculaire, il était fréquemment fait référence à des produits commerciaux. La Commission des animaux aquatiques est convenue de demander à l'expert du Laboratoire de référence de supprimer ces références à des produits commerciaux (à moins qu'elles ne soient absolument nécessaires) et de réduire la longueur des protocoles en éliminant les détails superflus.

Plusieurs propositions de modifications des protocoles des tests de diagnostic moléculaire ont été adressées. Le Laboratoire de référence de l'OIE sera sollicité afin d'examiner ces propositions. Dans le cas où elles contribueraient à l'amélioration des protocoles publiés, il serait alors nécessaire d'ajouter une phrase pour préciser de quelle manière les effets sur la performance de l'essai ont été évalués.

Un commentaire d'État membre concernant la définition d'un cas confirmé sera examiné une fois que le nouveau modèle de chapitre élaboré par le groupe ad hoc sur le *Manuel aquatique* aura été approuvé et intégré au *Manuel aquatique* (voir point 26).

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence, en concertation avec les experts des Laboratoires de référence.

La version révisée du chapitre 2.2.3. *Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* est présentée en **annexe 21** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 21. Myonécrose infectieuse (chapitre 2.2.4.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Japon, la Nouvelle-Zélande, Singapour et les États-Unis d'Amérique.

Plusieurs propositions de modifications des protocoles des tests de diagnostic moléculaire ont été adressées. La Commission des animaux aquatiques a demandé que ces propositions soient accompagnées d'éléments de justification et de preuves démontrant l'équivalence de la performance du test ainsi modifié (en tenant compte des nouveaux paramètres).

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence, en concertation avec les experts des Laboratoires de référence.

La version révisée du chapitre 2.2.4. *Myonécrose infectieuse* est présentée en **annexe 22** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 22. Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 2.2.5.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Canada, la Nouvelle-Zélande, Singapour et les États-Unis d'Amérique.

Un État membre a proposé de créer une nouvelle sous-partie au paragraphe 2.2.2. « *Species with incomplete evidence for susceptibility* », qui traiterait uniquement des espèces pour lesquelles les résultats obtenus au test PCR sont positifs. La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté cette proposition car les résultats positifs au test PCR sont déjà mentionnés au paragraphe 2.2.2. Leur allouer une sous-partie spécifique leur donnerait plus d'importance qu'ils n'en ont réellement.

Un État membre a proposé d'apporter des amendements au protocole du test PCR, notamment en introduisant la possibilité de faire le test sur des échantillons de fèces. La Commission des animaux aquatiques a accepté que les fèces puissent faire partie des types d'échantillons à prélever sous réserve que des informations sur la validation de ce type d'essai lui soient communiquées.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence, en concertation avec les experts des Laboratoires de référence.

La version révisée du chapitre 2.2.5. *Hépatopancréatite nécrosante* est présentée en **annexe 23** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 23. Syndrome de Taura (chapitre 2.2.6.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Canada, la Nouvelle-Zélande, Singapour, la Thaïlande, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

Plusieurs propositions de modifications des protocoles des tests de diagnostic moléculaire ont été adressées. La Commission des animaux aquatiques a demandé que ces propositions soient accompagnées d'éléments de justification et de preuves démontrant l'équivalence de la performance du test ainsi modifié (en tenant compte des nouveaux paramètres).

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence, en concertation avec les experts des Laboratoires de référence.

La version révisée du chapitre 2.2.6. *Syndrome de Taura* est présentée en **annexe 24** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 24. Maladie des queues blanches (chapitre 2.2.8.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par le Canada, la République populaire de Chine, la Nouvelle-Zélande, Singapour, la Thaïlande et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et amendé le texte en conséquence, en concertation avec les experts des Laboratoires de référence.

La version révisée du chapitre 2.2.8. *Maladie des queues blanches* est présentée en **annexe 25** et sera proposée à l'adoption lors de la 85^e Session générale en mai 2017.

Point 25. Maladie des points blancs (chapitre 2.2.7.)

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par la République populaire de Chine.

Lors de sa précédente réunion, en septembre 2016, la Commission des animaux aquatiques est convenue de suspendre la révision de ce chapitre en attendant que soit entreprise la révision de la liste des espèces sensibles. Elle a toutefois proposé une révision du titre et du champ d'application en ligne avec les amendements proposés pour les autres chapitres traitant des maladies des crustacés.

La Commission des animaux aquatiques a révisé le chapitre et y a introduit le nouveau nom de la maladie, « infection par le virus du syndrome des points blancs ». La Commission des animaux aquatiques a décidé de réviser la définition de cas figurant dans ce chapitre. Bien qu'il soit prévu que le groupe ad hoc sur le *Manuel aquatique* procède à la révision prochaine de la définition de cas de ce chapitre dans le cadre de ses travaux, la Commission des animaux aquatiques a estimé qu'elle devait s'y consacrer immédiatement car la définition actuelle laissait trop à désirer.

La version révisée du chapitre 2.2.7. *Maladie des points blancs* est présentée aux États membres en **annexe 28** afin qu'ils la commentent.

**G. AUTRES POINTS CONCERNANT LE MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC
POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE ET TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS**

Point 26. Examen du rapport du groupe ad hoc sur le Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques

En janvier 2017, le groupe ad hoc de l'OIE sur le *Manuel aquatique* s'est réuni pour la seconde fois. L'objectif de cette réunion était d'améliorer le nouveau modèle de chapitre de maladie ainsi que les trois chapitres auxquels le groupe ad hoc a appliqué ledit modèle lors de sa réunion d'avril 2016, tout en prenant en considération les commentaires de la Commission des animaux aquatiques. Le nouveau modèle de chapitre fait figurer les améliorations proposées pour la structure du paragraphe 4 « *Diagnostic methods* (Méthodes de diagnostic) », notamment une version révisée du tableau récapitulant les méthodes de tests disponibles pour la surveillance et le diagnostic, ainsi que pour la structure du paragraphe 6 « *Corroborative diagnostic criteria* (Critères corroborant le diagnostic) ».

La Commission des animaux aquatiques a remercié le groupe ad hoc pour le travail effectué, qui ne manquera pas d'apporter de nombreuses améliorations en termes de cohérence, qualité, clarté et valeur des informations présentées dans le *Manuel aquatique*. La Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe ad hoc, ses recommandations ainsi que la proposition d'un nouveau modèle de chapitre pour les maladies des mollusques. En retour, elle a fourni des informations au groupe ad hoc.

La Commission des animaux aquatiques a recommandé que le groupe ad hoc poursuive ses efforts d'amélioration du modèle de chapitre en le testant sur les trois chapitres de maladie, afin d'affiner son approche. Une fois que le modèle aura été finalisé, les membres du groupe ad hoc apporteront leur appui aux experts des Laboratoires de référence afin qu'ils l'appliquent à l'ensemble des chapitres traitant des maladies des crustacés. Lors de sa prochaine réunion en septembre 2017, la Commission des animaux aquatiques examinera la version finalisée du modèle de chapitre ainsi que les chapitres traitant des maladies des crustacés ayant déjà fait l'objet d'une révision.

H. CENTRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE

Point 27. Examen des rapports d'activité des Laboratoires de référence et Centres collaborateurs concernés

Le personnel du siège de l'OIE a remis à la Commission des animaux aquatiques une analyse des activités des Centres de référence, élaborée à partir des rapports annuels soumis par les Centres de référence de l'OIE pour les animaux aquatiques. Au 27 février 2017, 33 des 44 Laboratoires de référence (soit 75 %) ainsi que les deux Centres collaborateurs (soit 100 %) avaient soumis leur rapport annuel (année 2016) à l'OIE. Les laboratoires n'ayant pas encore soumis leur rapport annuel se verront rappeler leurs obligations. En effet, la soumission d'un rapport annuel est un des critères d'évaluation de la performance des laboratoires de référence de l'OIE.

La Commission des animaux aquatiques a tenu à faire part de son appréciation des Centres de référence de l'OIE, pour leur soutien et leur expertise. La Commission des animaux aquatiques s'est réjouie de l'augmentation du nombre de réponses positives concernant la mise en place de système de gestion de la qualité reconnus internationalement.

Point 28. Candidatures au statut de Centre de référence de l'OIE ou changements d'expert

La Commission des animaux aquatiques a recommandé l'acceptation de la candidature suivante au statut de centre de référence de l'OIE :

Laboratoire de référence de l'OIE pour la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe

Aquaculture Pathology Laboratory, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, UNITED STATES OF AMERICA Tel.: (+1-520) 621.44.38; Fax: (+1-520) 626.56.02; Courriel: fengjyu@u.arizona.edu Site internet: <http://acbs.cals.arizona.edu/aqua>. Expert référent désigné: Dr Kathy Tang-Nelson.

Le Délégué de l'État membre concerné a soumis à l'OIE une demande de changement d'expert pour deux Laboratoires de référence. La Commission des animaux aquatiques recommande leur acceptation.

Laboratoire de référence de l'OIE pour la nécrose hématopoïétique épizootique et Laboratoire de référence de l'OIE pour l'infection à ranavirus

Le docteur Paul Hick remplacera le professeur Richard Whittington à l'University of Sydney, Faculty of Veterinary Science, en Australie.

Point 29. Retrait du statut de Laboratoire de référence de l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a pris connaissance de la demande de retrait du statut de Laboratoire de référence de l'OIE pour les encéphalopathie et rétinopathie virales de la Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, au Japon, suite au départ en retraite du l'expert désigné, le professeur Toshihiro Nakai. La Commission a souhaité remercier le professeur Nakai pour sa précieuse contribution aux travaux de l'OIE depuis la nomination du Laboratoire de référence en 2000.

Point 30. Progrès accomplis concernant la mise en place de systèmes de gestion de la qualité dans les Laboratoires de référence

La Commission des animaux aquatiques a examiné les progrès accomplis par les Laboratoires de référence dans leur démarche d'accréditation selon la norme ISO 17025 ou un système de gestion de la qualité équivalent. Les rapports soumis avant le 27 février 2017 ainsi que les réponses antérieures adressées par les Laboratoires de référence ont été utilisés afin de mesurer les progrès accomplis ; les chiffres suivants témoignent de l'avancement global de la démarche d'accréditation :

- 61,9 % des Laboratoires de référence sont accrédités selon la norme ISO 17025 ;
- 19 % des Laboratoires de référence sont en cours d'accréditation selon la norme ISO 17025 ;
- 4,8 % des Laboratoires de référence sont accrédités selon un système équivalent de gestion de la qualité;
- 14,3 % des Laboratoires de référence n'ont pas obtenu et n'obtiendront pas l'accréditation selon la norme 17025 ou un système de gestion de la qualité équivalent. Par conséquent, le statut de Laboratoire de référence de l'OIE leur sera retiré à la fin de l'année 2017.

La Commission des animaux aquatiques a fait part de son appréciation des efforts engagés par tant de laboratoires pour obtenir le statut de laboratoire accrédité.

La Commission des animaux aquatiques a été informée que la Commission des normes biologiques avait examiné des documents adressés par les Laboratoires de référence de l'OIE en Amérique du Nord prouvant que leur système de gestion de la qualité était équivalent à celui de la norme ISO 17025.

Point 31. Poursuite du développement de procédures opérationnelles normalisées pour l'acceptation et le maintien du statut de Laboratoire de référence

La Commission des animaux aquatiques a révisé les procédures opérationnelles normalisées pour la désignation des Laboratoires de référence, qui ont été élaborées par la Commission des normes biologiques, en concertation avec la Commission des animaux aquatiques. Le document comporte désormais cinq critères d'évaluation de la performance des laboratoires :

- i) soumission d'un rapport annuel ;
- ii) obtention de l'accréditation selon la norme ISO 17025 ou un système équivalent de gestion de la qualité, idéalement avec les tests d'intérêt compris dans le champ d'accréditation ;
- iii) activité de diagnostic ou de production et approvisionnement en matériel de référence en relation avec la maladie ou l'agent pathogène suffisante ;
- iv) réponse rapide aux demandes d'expertises scientifiques du siège de l'OIE ;
- v) réponse rapide aux demandes de l'OIE concernant les questions administratives relatives à la transparence et à la confidentialité (par exemple, le renouvellement des déclarations des conflits d'intérêt potentiels et le dépôt d'un engagement de confidentialité).

La Commission des animaux aquatiques a noté que les mots « avec les tests d'intérêt compris dans le champ d'accréditation » avaient été ajoutés au critère ii) et au point 5 des *Recommandations pour les candidats à la désignation comme Laboratoire de référence de l'OIE* après les mots « accréditation selon la norme ISO 17025 ou un système équivalent de gestion de la qualité ». La Commission des animaux aquatiques a indiqué que cet ajout serait problématique pour certains laboratoires lors du développement et de la validation d'épreuves de diagnostic pour de nouvelles maladies ou dans le cas où les épreuves de diagnostic existantes nécessiteraient d'être améliorées afin de tenir compte des nouvelles informations disponibles sur la maladie (par exemple des nouvelles souches de l'agent pathogène). La Commission des animaux aquatiques a considéré qu'il ne serait pas approprié de procéder au retrait du statut de Laboratoire de référence dans ces cas. Afin de répondre à cette préoccupation, la Commission des animaux aquatiques a proposé que le mot « idéalement » soit ajouté au début de la proposition. Cette proposition d'amendement a été transmise au Président de la Commission des normes biologiques, qui l'a acceptée.

Le document sera soumis au Conseil de l'OIE pour approbation puis sera présentée en vue de son adoption par l'Assemblée mondiale des Délégués lors de la Session générale, en mai 2017.

Point 32. Projets de jumelage

La Commission des animaux aquatiques a été informée de l'avancement des projets de jumelage portant sur les maladies des animaux aquatiques.

En février 2017, deux projets étaient achevés (projet du Canada et du Chili sur l'anémie infectieuse du saumon; projet des États-Unis d'Amérique et de la Chine sur la nécrose hématoïétique infectieuse) et cinq projets étaient toujours en cours (projet de la Norvège et du Brésil sur l'anémie infectieuse du saumon ; projet du Japon et de l'Indonésie sur l'herpès-virose de la carpe ; projet des États-Unis d'Amérique et de l'Arabie saoudite sur une maladie des crevettes ; projet du Danemark et de la République de Corée sur la septicémie hémorragique virale). La Commission des animaux aquatiques a pris note des résultats du projet mené par les États-Unis d'Amérique et la Chine sur la nécrose hématoïétique infectieuse, qui a été achevé récemment.

La Commission des animaux aquatiques a pris connaissance d'une proposition de jumelage entre l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Laboratoire parent) de Padoue, en Italie, et l'Institut de la Recherche Vétérinaire de Tunisie (Laboratoire candidat), en Tunisie. Le projet adressé porte sur l'encéphalopathie et la rétinopathie virales. La Commission des animaux aquatiques a examiné la proposition de projet et formulé des commentaires d'ordre technique.

I. AUTRES POINTS

Point 33. Le point sur les activités de l'OIE dans le domaine de la résistance aux agents antimicrobiens

La Commission des animaux aquatiques a été informée des activités de l'OIE relatives à la résistance aux agents antimicrobiens, notamment des travaux en cours du groupe ad hoc sur l'antibio-résistance. La Commission des animaux aquatiques a rappelé qu'il était nécessaire de suivre cet important sujet et a actualisé le *Code aquatique* et le *Manuel aquatique* en conséquence.

Point 34. Auto-déclaration d'absence d'une des maladies listées par l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a été informée que l'OIE avait initié un examen de ses procédures relatives à l'auto-déclaration de l'absence de maladie pour un pays, une zone ou un compartiment au regard des maladies des animaux aquatiques et terrestres incluses dans la Liste des maladies de l'OIE. Bien que l'auto-déclaration d'absence de maladie ne relève pas de la responsabilité de l'OIE, elle peut, à la demande d'un État membre, être publiée dans le *Bulletin* de l'OIE afin que les autres États membres en soient informés. L'OIE entreprend ces travaux afin d'améliorer les procédures de soumission, d'examen et de publication des auto-déclarations.

La Commission des animaux aquatiques a souligné qu'il s'agissait d'un sujet important pour les États membres car il n'existe aucun processus de reconnaissance du statut officiel pour les maladies des animaux aquatiques incluses dans la Liste de l'OIE. La Commission des animaux aquatiques continuera de suivre l'avancement de cet important projet et a demandé d'être tenue informée de ses évolutions.

Point 35. Protocole de Nagoya

La Commission des animaux aquatiques a été informée par le siège de l'OIE sur le Protocole de Nagoya, qui a été adopté en octobre 2010 lors de la réunion de la Conférence des Parties à la Convention sur la diversité biologique des Nations-Unies. Ce protocole prévoit l'accès et le partage juste et équitable des avantages entre les pays découlant des échanges d'échantillons contenant du matériel génétique à des fins de recherche. La Commission des animaux aquatiques a été informée que la Commission des normes biologiques et le groupe de travail sur la faune sauvage avaient discuté de ce point lors de leur réunion respective en 2016 afin de déterminer le retour d'expérience des États membres sur ce protocole et ses possibles conséquences sur le transport international des spécimens animaux.

La Commission des animaux aquatiques a été informée qu'une réunion du groupe ad hoc de l'OIE sur le transport des matériels biologiques sera organisée en 2017 afin de mettre à jour le chapitre 1.1.3. «*Transport of specimens of animal origin* (transport des spécimens d'origine animale) » du *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*, en prenant en considération les aspects relatifs au Protocole de Nagoya.

J. PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES POUR 2017 - 2018

La Commission des animaux aquatiques a révisé et mis à jour son plan de travail en prenant en considération les commentaires des États membres ainsi que ceux du Siège. Elle a ensuite achevé ses travaux.

La version révisée du plan de travail est présentée aux États membres en **annexe 31** à titre informatif.

K. ACTIVITÉS DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

La Commission des animaux aquatiques a souhaité informer les États membres des activités auxquelles ont participé ses membres en tant que Membres de la Commission des animaux aquatiques depuis la réunion de septembre 2016.

Les membres de la Commission des animaux aquatiques ont participé aux activités suivantes:

Le docteur Ingo Ernst a animé une téléconférence le 8 décembre 2016 à laquelle ont participé les Délégués de l'OIE et les Points focaux pour les animaux aquatiques de la région Asie et Pacifique. Cette téléconférence a été organisée par la Représentation régionale de l'OIE pour l'Asie et le Pacifique. L'objectif de la téléconférence était d'expliquer aux États membres présents le contenu du rapport de la réunion de septembre 2016 de la Commission des animaux aquatiques, notamment les annexes qui avaient été soumises aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires.

La docteure Joanne Constantine a participé à une conférence en ligne le 20 décembre 2016, organisée pour les Délégués de l'OIE, les Points focaux pour les animaux aquatiques et d'autres participants de la région des Amériques, organisée par la Représentation régionale de l'OIE pour les Amériques. L'objectif de cette conférence en ligne était d'expliquer aux États membres présents le contenu du rapport de la réunion de septembre 2016 de la Commission des animaux aquatiques, notamment les annexes qui avaient été soumises aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires. La docteure Constantine a effectué une présentation récapitulant des points importants du rapport de septembre et a répondu aux questions des États membres. Le rapport de la réunion de la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres de septembre 2016 a également fait l'objet de discussions.

Le docteur Peeler a accepté l'invitation de la Commission européenne à participer un groupe de travail d'experts qui s'est réuni le 24 novembre 2016 afin de coordonner la réponse de l'UE au rapport de la réunion de la Commission des animaux aquatiques de septembre 2016. Le docteur Peeler a répondu aux questions posées et a discuté du futur plan de travail de la Commission des animaux aquatiques.

Le professeur Mohamed Shariff Bin Mohamed Din a représenté l'OIE lors de la 15^e réunion du Comité consultatif de la Région Asie sur la santé des animaux aquatiques du Réseau des centres d'aquaculture en Asie-Pacifique (NACA), qui s'est tenue à Bangkok du 21 au 23 novembre 2016. Il a présenté au Comité consultatif des exposés sur les normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE adoptées lors de la 84^e Session générale en mai 2016 ainsi que les résultats de la réunion de septembre 2016 de la Commission des animaux aquatiques. Les rapports des réunions du Comité consultatif sont disponibles sur le site Internet de NACA (www.enaca.org).

L. COLLABORATION

Point 36. Collaboration avec l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)

La Docteure Melba Reantaso, représentante de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, a pu prendre part à la réunion de la Commission des animaux aquatiques lors d'une téléconférence. Elle a fait un point sur l'avancement des programmes de coopération techniques de la FAO d'intérêt, notamment ceux se rapportant au virus du tilapia lacustre en Égypte et en Asie. Elle a également fait part d'un projet de renforcement des capacités, des politiques et des plans d'action nationaux de la FAO sur l'utilisation prudente et responsable des agents antimicrobiens en aquaculture, qui sera initié en avril 2017, en Inde. En retour, le docteur Ernst a fait un point sur les activités de la Commission des animaux aquatiques susceptibles d'intéresser la FAO.

Les membres de la Commission des animaux aquatiques se sont réjouis de cet échange d'informations régulier, en rappelant l'importance du maintien des relations avec la FAO.

M. PROCHAINE RÉUNION

La prochaine réunion de la Commission des animaux aquatiques se tiendra en septembre 2017, du 12 au 19 inclus.

.../Annexes

**RÉUNION DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES
POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE**

Paris, 22 février -1^{er} mars 2017

Liste des participants

MEMBRES DE LA COMMISSION

**Dr Ingo Ernst
(Président)**

Director Aquatic Pest and Health Policy
Animal Division
Department of Agriculture and Water
Resources
GPO Box 858 Canberra ACT 2601
AUSTRALIE
Tél. : +61 2 6272 5615
Mèl. : ingo.ernst@agriculture.gov.au

Dr Maxwell Barson

Senior lecturer
(Parasitology & histopathology)
University of Zimbabwe
Department of Biological Sciences
Box MP 167 Mt. Pleasant
ZIMBABWE
Tél. : +263 4 303 211
Mèl. : barson001@yahoo.co.uk
Mèl. : banson@science.uz.ac.zw

Dr Joanne Constantine

National Manager
Animal Health Import/Export, Aquatics
Section
Canadian Food Inspection Avenue
Floor 3 E, Room 116
59 Camelot Drive
Ottawa ON K1A 0Y9
CANADA
Tél. : + 1-613-773-7426
Mèl. :
joanne.constantine@inspection.gc.ca

**Dr Alicia Gallardo Lagno
(Vice-président)**

Subdirectora nacional de acuicultura
Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura
Calle Victoria 2832
CHILI
Tél. : +56 32 281 9282
Mèl. : agallardol@sernapesca.cl

**Dr Edmund Peeler
(Vice-président)**

Group Manager Aquatic Pest &
Pathogens
CEFAS
Barrack Road, Weymouth
Dorset, DT4 8UB UK
ROYAUME-UNI
Tél. : +44 (0)1305 206746
Mèl. : ed.peeler@cefasc.co.uk

**Prof. Mohamed Shariff Bin
Mohamed Din**

Faculty of Veterinary Medicine
Universiti Putra Malaysia
43400 Serdang, Selangor
MALAISIE
Tél. : +6012 2839 845
Mèl. : shariff@upm.edu.my
Mèl. : pshariff@gmail.com

AUTRES PARTICIPANTS

Dr Nick Moody

CSIRO
Australian Animal Health Laboratory
Private Bag 24 (Ryrie Street)
Geelong
Victoria 3220
AUSTRALIE
Mèl. : nick.moody@csiro.au

SIÈGE DE L'OIE

Dr Gillian Mylrea

Adjointe
Service des normes
Mèl. : g.mylrea@oie.int

Ms Sara Linnane

Secrétaire de rédaction scientifique
Service des sciences et des nouvelles
technologies
Mèl. : s.linnane@oie.int

Dr Stian Johnsen

Chargé de mission
Service des normes
Mèl. : s.johnsen@oie.int

**RÉUNION DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES
POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE**

Paris, 22 février -1^e mars 2017

Ordre du jour adopté

- A. RÉUNION AVEC LE DIRECTEUR GÉNÉRAL ADJOINT**
- B. ADOPTION DE L'ORDRE DU JOUR**
- C. RÉUNION AVEC LE PRÉSIDENT DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX TERRESTRES DE L'OIE**
- D. EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES CONCERNANT LE *CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE***
 - Point 1. Commentaires d'ordre général
 - Point 2. Glossaire
 - Point 3. Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE (chapitre 1.2.)
 - Point 4. Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)
 - 4.1. Noms amendés des maladies des crustacés
 - 4.2. *Batrachochytrium salamandrivorans*
 - 4.3. Infection à Ranavirus
 - 4.4. Évaluation conduite pour un nouveau virus proche des orthomyxovirus, le virus du tilapia lacustre (TiLV)
 - Point 5. Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique (chapitre 1.5.)
 - Point 6. Désinfection des établissements d'aquaculture et de leur équipement (chapitre 4.3.)
 - Point 7. Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)
 - Point 8. Obligations générales liées à la certification (chapitre 5.1.)
 - Point 9. Amendements apportés aux chapitres traitant des maladies spécifiques des crustacés
 - 9.1. Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) (chapitre 9.1.)
 - 9.2. Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)
 - 9.3. Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.)
 - 9.4. Myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.)
 - 9.5. Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.)
 - 9.6. Syndrome de Taura (chapitre 9.6.)
 - 9.7. Maladie des points blancs (chapitre 9.7.)
 - 9.8. Maladie des queues blanches (chapitre 9.8.)
 - Point 10. Nouveau chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau chapitre 9.X.)

Annexe 2 (suite)

Point 11. Version révisée du modèle d'article X.X.8

Point 12. Inclusion de recommandations relatives à la désinfection de surface des œufs d'espèces autres que les salmonidés. Il doit s'agir d'espèces pour lesquelles la désinfection des œufs est couramment pratiquée et importante pour garantir la sécurité sanitaire des échanges commerciaux.

Point 13. Iridovirose de la daurade japonaise (chapitre 10.8.)

E. AUTRES POINTS CONCERNANT LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE ET LES TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS

Point 14. Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques (chapitre 5.4.)

Point 15. Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de poissons [à l'infection par des] aux maladies listées par l'OIE

Point 16. Groupe ad hoc sur l'auto-déclaration d'absence de maladie

Point 17. Groupe ad hoc sur la sécurité biologique appliquée aux animaux aquatiques

F. EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES CONCERNANT LE MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

Point 18. Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau projet de chapitre 2.2.X.)

Point 19. Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) (chapitre 2.2.1.)

Point 20. Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 2.2.3.)

Point 21. Myonécrose infectieuse (chapitre 2.2.4.)

Point 22. Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 2.2.5.)

Point 23. Syndrome de Taura (chapitre 2.2.6.)

Point 24. Maladie des queues blanches (chapitre 2.2.8.)

Point 25. Maladie des points blancs (chapitre 2.2.7.)

G. AUTRES POINTS CONCERNANT LE MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE ET TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS

Point 26. Examen du rapport du groupe ad hoc sur le *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques*

H. CENTRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE

Point 27. Examen des rapports d'activité des Laboratoires de référence et Centres collaborateurs concernés

Point 28. Candidatures au statut de Centre de référence de l'OIE ou changements d'expert

Point 29. Retrait du statut de Laboratoire de référence de l'OIE

Point 30. Progrès accomplis concernant la mise en place de systèmes de gestion de la qualité dans les Laboratoires de référence

Point 31. Poursuite du développement de procédures opérationnelles normalisées pour l'acceptation et le maintien du statut de Laboratoire de référence

Point 32. Projets de jumelage

I. AUTRES POINTS

Point 33. Le point sur les activités de l'OIE dans le domaine de la résistance aux agents antimicrobiens

Point 34. Auto-déclaration d'absence d'une des maladies listées par l'OIE

Point 35. Protocole de Nagoya

J. PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES POUR 2017 - 2018**K. COLLABORATION**

Point 36. Collaboration avec l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)

L. PROCHAINE RÉUNION

GLOSSAIRE

ANIMAUX AQUATIQUES

désigne tous les stades de développement viables des les poissons, mollusques, crustacés et amphibiens (œufs et gamètes y compris), quel qu'en soit le stade de développement, provenant d'établissements d'aquaculture ou du milieu naturel capturés dans le milieu naturel, lorsqu'ils sont destinés à l'élevage, au repeuplement du milieu naturel, à la consommation humaine ou à l'usage ornemental.

PRODUITS BIOLOGIQUES

désigne :

- a) les réactifs biologiques utilisés pour le *diagnostic* de certaines *maladies* ;
- b) les sérums utilisés dans la prévention ou le traitement de certaines *maladies* ;
- c) les vaccins, inactivés ou modifiés, utilisés pour la prophylaxie de certaines *maladies* ;
- d) le matériel génétique d'*agents infectieux pathogènes* ;
- e) les tissus endocrines provenant de poissons ou utilisés chez les poissons.

MALADIE

désigne une infection, clinique ou non, provoquée par un ou plusieurs *agents étiologiques pathogènes*.

ZONE

désigne une partie aire clairement délimitée d'un pays ou d'un ensemble de pays consistant en un système hydrologique ininterrompu, dans lequel évolue une population d'*animaux aquatiques* caractérisée par un statut zoosanitaire spécifique distinct au regard d'une ou plusieurs maladies particulières, contre pour laquelle ou lesquelles des mesures de *surveillance* et de *contrôle* sont appliquées et ainsi que des conditions élémentaires de sécurité biologique sont appliquées satisfaites. Ces zones doivent être clairement documentées La zone doit être définie par l'*Autorité compétente*, ou les Autorités compétentes concernées.

désigne une portion d'un pays ou d'un ensemble de pays comprenant :

- a) un bassin versant entier depuis la source d'un cours d'eau jusqu'à l'estuaire ou le lac, ou
- b) plus d'un bassin versant, ou
- c) une section d'un bassin versant depuis la source d'un cours d'eau jusqu'à une barrière qui empêche l'introduction d'une ou plusieurs maladies particulières, ou
- d) une partie de zone littorale aux contours géographiques clairement délimités, ou
- e) un estuaire aux contours géographiques clairement délimités,

et représentant un système hydrologique ininterrompu caractérisé par un statut zoosanitaire distinct au regard d'une ou plusieurs maladies particulières. Les zones doivent être clairement documentées par l'*Autorité compétente* ou les *Autorités compétentes concernées* (sur une carte géographique ou à l'aide d'un localisateur de précision, utilisant les coordonnées GPS [Global Positioning System ou système de positionnement global]).

 — Texte supprimé

CHAPITRE 1.2.

CRITÈRES D'INCLUSION DES MALADIES DANS LA LISTE DE L'OIE

Article 1.2.1.

Introduction

Le présent chapitre décrit les critères servant à l'inclusion des *maladies* au chapitre 1.3.

L'inclusion de *maladies* dans la liste de l'OIE a pour but de fournir les informations nécessaires aux États membres pour prendre des mesures appropriées visant à empêcher la propagation transfrontalière de *maladies* importantes affectant les *animaux aquatiques*. Cela est réalisé au moyen de procédures transparentes, rapides et cohérentes de *notification*.

Pour chaque *maladie listée* figure généralement un chapitre correspondant destiné à soutenir les efforts d'harmonisation des États membres pour la détection, la prévention et le contrôle de la *maladie* concernée et présentant les normes relatives à la sécurité sanitaire des *échanges internationaux d'animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques*.

Les exigences en matière de *notification* sont décrites en détail au chapitre 1.1.

Les principes et méthodes de validation des tests de diagnostic sont décrits au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique*.

Article 1.2.2.

Les critères d'inclusion d'une *maladie* dans la liste de l'OIE sont les suivants :

1) La propagation internationale de l'*agent pathogène* (via des *animaux aquatiques* vivants, des *produits issus d'animaux aquatiques*, des *vecteurs* ou des matériels contaminés) est probable.

ET

2) Au moins un pays peut démontrer l'absence de la *maladie* sur son territoire ou dans une *zone* chez les *animaux aquatiques* sensibles, conformément aux dispositions du chapitre 1.4.

ET

3) Une *définition de cas* précise est disponible et il existe une méthode fiable de détection et de *diagnostic*.

ET

4)

a) La transmission naturelle à l'homme a été prouvée, et la présence de l'infection chez l'homme est associée à des conséquences graves.

OU

b) Lorsqu'elle apparaît, il est prouvé que la *maladie* affecte la santé des *animaux aquatiques* d'élevage à l'échelle d'un pays ou d'une *zone*, avec des lourdes conséquences telles que des pertes de production, une morbidité ou une mortalité constatées au niveau du pays ou de la *zone*.

OU

c) On a montré la présence de la *maladie* ou on dispose de preuves scientifiques indiquant que la *maladie* affecterait la santé des *animaux aquatiques* sauvages avec de lourdes conséquences, telles que, par exemple, une morbidité ou une mortalité à l'échelle de la population, une baisse de productivité ou des répercussions sur l'écologie.

CHAPITRE 1.2.

CRITÈRES D'INCLUSION D'UNE DES MALADIES DES ANIMAUX AQUATIQUES DANS LA LISTE DE L'OIE

Article 1.2.1.

Introduction

Le présent chapitre décrit les critères servant à l'inclusion dans la liste de l'OIE des *maladies* figurant au chapitre 1.3. L'inclusion de *maladies* dans cette la liste de l'OIE a pour but de fournir les informations nécessaires aux États membres pour prendre des mesures appropriées visant à soutenir les efforts déployés par les États membres pour prévenir empêcher la propagation transfrontalière de *maladies* importantes affectant les *animaux aquatiques*. Cela est réalisé au moyen de pratiques procédures transparentes, rapides et cohérentes de déclaration notification.

Pour chaque maladie listée Chacune des *maladies listées* selon les critères énoncés à l'article 1.2.2. fait l'objet d'un chapitre dédié, figure généralement un chapitre correspondant dans le *Code aquatique*, destiné à soutenir les efforts d'harmonisation des États membres pour la détection, la prévention et le contrôle de la maladie concernée, et qui présente présentant les normes relatives à la sûreté sécurité au plan sanitaire des échanges internationaux d'*animaux aquatiques* et de *produits* qui en sont issus d'animaux aquatiques.

Les exigences en matière de *notification des maladies listées* sont décrites en détail au chapitre 1.1.

Les principes ou la sélection et méthodes de validation des tests de diagnostic sont fournis décrits au chapitre 1.1.2. du Manuel aquatique.

Article 1.2.2.

Les critères d'inclusion d'une *maladie des animaux aquatiques* dans la liste de l'OIE sont les suivants :

Les maladies dont l'inclusion dans la liste de l'OIE est proposée doivent répondre aux critères applicables figurant aux points suivants : A. Conséquences, B. Propagation et C. Diagnostic. Ainsi, pour être incluse dans la liste, une maladie doit présenter les caractéristiques suivantes : 1 ou 2 ou 3 ; et 4 ou 5 ; et 6 ; et 7 ; et 8. Ces propositions doivent être accompagnées d'une définition de cas pour la maladie considérée.

N°		Critères d'inclusion	Notes explicatives
A. Conséquences			
1. Ou	b.	Lorsqu'elle apparaît, il est prouvé que la <i>maladie</i> provoque des pertes significatives de production au niveau national ou multinational (zones ou régions), <u>a un impact significatif sur affecte la santé des animaux aquatiques</u> d'élevage à l'échelle d'un pays ou d'une zone, <u>en tenant compte de l'apparition et de la sévérité des signes cliniques avec des lourdes conséquences impacts graves</u> telles que des pertes de production, une morbidité <u>et ou</u> une mortalité constatées au niveau du pays ou de la zone, notamment des pertes de production directes et une mortalité.	Il existe un schéma général selon lequel la maladie aboutit à des pertes chez les espèces sensibles, et la morbidité ou la mortalité est en relation principalement avec l'agent infectieux et non avec des pratiques d'élevage ou des facteurs liés à l'environnement. (La morbidité inclut, par exemple, les pertes de production dues à des baisses de ponte.) L'impact économique direct de la maladie est lié à sa morbidité, à sa mortalité et à son effet sur la qualité du produit.
2. Ou	c. Ou	On a montré la présence de la <i>maladie</i> ou on dispose de preuves scientifiques indiquant que la <i>maladie</i> est susceptible de provoquer <u>aurait un impact grave sur affecterait la santé des</u> une morbidité ou une mortalité importante au sein des populations d' <u>des animaux aquatiques sauvages, avec de lourdes conséquences,</u> telles que, par exemple, une morbidité <u>et ou</u> une mortalité à l'échelle de la population, <u>une baisse de productivité ou ainsi que</u> des répercussions sur l'écologie, <u>en tenant compte de l'apparition et de la sévérité des signes cliniques, notamment des pertes de production directes, une mortalité et des menaces écologiques.</u>	Une population d'animaux aquatiques sauvages peut être exploitée à des fins commerciales (pêcheries de poissons sauvages) et représenter ainsi une valeur économique. Cette valeur peut aussi être de nature écologique ou environnementale. Il en est ainsi par exemple si la population est constituée d'une espèce menacée d'animaux aquatiques ou d'un animal aquatique potentiellement mis en danger par la maladie

Annexe 4B (suite)

N°.		Critères d'inclusion	Notes explicatives
3.4.	<u>a</u> Ou	L'agent infectieux représente une menace pour la santé publique. La transmission naturelle à l'homme a été prouvée, et la présence de l'infection chez l'homme est associée à des conséquences graves.	
Et B. Propagation			
4.	-	Une étiologie infectieuse de la maladie est prouvée.	Des maladies infectieuses d'étiologie inconnue peuvent avoir des implications à tout aussi haut risque que les maladies dont l'étiologie infectieuse est prouvée. Tout en recueillant des données sur l'apparition de la maladie, il convient de faire des recherches pour élucider l'étiologie de la maladie, et d'en diffuser les résultats dans un délai raisonnable.
5.	Ou	Un agent infectieux est fortement associé à la maladie, mais l'étiologie est encore inconnue.	Des maladies infectieuses d'étiologie inconnue peuvent avoir des implications à tout aussi haut risque que les maladies dont l'étiologie infectieuse est prouvée. Tout en recueillant des données sur l'apparition de la maladie, il convient de faire des recherches pour élucider l'étiologie de la maladie, et d'en diffuser les résultats dans un délai raisonnable.
N°		Critères d'inclusion	Notes explicatives
Et B. Propagation			
6.1.	Et	Probabilité de La propagation internationale de la maladie de l'agent pathogène, y compris (via des animaux aquatiques vivants, leurs des produits issus d'animaux aquatiques, des vecteurs ou des matériels contaminés) est probable a été prouvée.	Des échanges internationaux d'espèces d'animaux aquatiques sensibles à la maladie sont pratiqués ou sont envisagés. Selon les pratiques commerciales internationales, la pénétration et l'installation de la maladie représentent une certaine probabilité.
<u>ET</u>			
7.2.	Et	Au moins un pays a démontré qu'il était indemne ou qu'il recouvrait son statut indemne de maladie chez les populations d'animaux aquatiques sensibles ou une zone peut démontrer l'absence de la maladie sur son territoire ou dans une zone chez les animaux aquatiques sensibles. Plusieurs pays ou zones peuvent être déclarés indemnes de la maladie, conformément aux principes généraux de surveillance énoncés au aux dispositions des du chapitres 1.4. et 1.5.	Les pays ou zones indemnes peuvent toujours être protégés. L'inclusion des maladies qui sont partout présentes ou extrêmement répandues rendrait la notification impossible, mais les pays qui appliquent un programme de lutte contre une telle maladie peuvent proposer son inclusion à condition d'avoir entrepris une évaluation scientifique à l'appui de leur demande. On peut citer en exemple la protection du cheptel contre les maladies largement répandues, ou la protection des dernières zones indemnes subsistantes contre une maladie largement répandue.
Et C. Diagnostic			
<u>ET</u>			
8.3.		Une définition de cas précise est disponible et il existe Une méthode pratique et reproductible fiable de détection ou et de diagnostic. et une définition de cas précise, permettant d'identifier clairement les cas et de les différencier des cas d'autres maladies, est disponible.	Une épreuve de diagnostic doit être largement disponible, ou avoir subi un processus officiel de normalisation et de validation utilisant des échantillons prélevés systématiquement sur place (voir Manuel aquatique) ou bien il doit exister une définition de cas solide permettant d'identifier clairement les cas et de les distinguer des autres pathologies.

 — Texte supprimé

CHAPITRE 1.3.

MALADIES LISTÉES PAR L'OIE

Préambule : les *maladies* énumérées ci-après sont listées par l'OIE en appliquant les critères d'inclusion d'une *maladie* affectant les *animaux aquatiques* qui sont énoncés à l'article 1.2.2.

En cas d'adoption, par l'Assemblée mondiale des Délégués, d'un amendement ayant pour objet d'actualiser la présente liste de *maladies* affectant les *animaux aquatiques*, la nouvelle liste entrera en vigueur le 1^{er} janvier de l'année suivante.

[...]

Article 1.3.3.

Sont listées par l'OIE, dans la catégorie des *maladies* des crustacés, les *maladies* suivantes :

- Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë
- Infection par *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) ~~Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*)~~
- Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune
- Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ~~Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse~~
- Infection par le virus de la myonécrose infectieuse ~~Myonécrose infectieuse~~
- Infection par *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) ~~Hépatopancréatite nécrosante~~
- Infection par le virus du syndrome de Taura ~~Syndrome de Taura~~
- Infection par le virus du syndrome des points blancs ~~Maladie des points blancs~~
- Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (maladie des queues blanches)

Article 1.3.4.

Sont listées par l'OIE, dans la catégorie des *maladies* des amphibiens, les *maladies* suivantes :

- Infection à *Batrachochytrium dendrobatidis*
- ≡ Infection à *Batrachochytrium salamandrivorans*
- ≡ Infection par les espèces du genre *Ranavirus* à *Ranavirus* spp. ~~*Ranavirus* spp.~~ ranavirus.

 – Texte supprimé

CHAPITRE 4.3.

DÉSINFECTION DES ÉTABLISSEMENTS D'AQUACULTURE ET DE LEUR ÉQUIPEMENT

Article 4.3.1.

Objectif

L'objectif du présent chapitre est de fournir des recommandations sur la planification et la mise en place des procédés de *désinfection* afin d'empêcher l'introduction, l'établissement ou la propagation des *agents pathogènes*.

Article 4.3.2.

Champ d'application

Le présent chapitre détaille les recommandations sur les procédés de *désinfection* des *établissements d'aquaculture* et de l'équipement dans le cadre des opérations courantes en matière de sécurité biologique et de réponse aux urgences sanitaires. Des éléments d'orientation sur les principes généraux, la planification et la mise en place des opérations de *désinfection* sont fournis.

Les méthodes spécifiques d'inactivation des agents pathogènes figurent dans les chapitres traitant spécifiquement des *maladies* du *Manuel aquatique*.

Article 4.3.3.

Introduction

La *désinfection* est employée comme outil de lutte contre les *maladies* dans les *établissements d'aquaculture*, dans le cadre du *plan de sécurité biologique*. La *désinfection* est utilisée pour empêcher l'entrée ou la sortie des *agents pathogènes* visés d'un *établissement d'aquaculture* ou d'un *compartiment* ainsi que leur propagation au sein de cet *établissement*. La *désinfection* peut être utilisée dans le cadre d'une réponse à une situation d'urgence sanitaire, afin de contribuer au maintien de *zones* de contrôle des *maladies* et de permettre leur élimination (procédures d'abattage sanitaire) des *établissements d'aquaculture* atteints. L'objectif spécifique de la *désinfection* déterminera le choix de la stratégie utilisée et son application.

Dans la mesure du possible, la propagation des *agents pathogènes* doit être prévenue en évitant leur transmission plutôt qu'en tentant de gérer leur présence au moyen de la *désinfection*. Par exemple, les pièces d'équipement difficiles à désinfecter (par exemple, les gants, l'équipement de plongée et de récupération, les cordes et les filets), doivent être dédiées à un site spécifique plutôt que déplacées d'une unité de production à l'autre ou d'un *établissement d'aquaculture* à l'autre après la *désinfection*.

Article 4.3.4.

Principes généraux

La *désinfection* est un processus structuré qui met en œuvre des procédés physiques et chimiques afin d'éliminer la matière organique et de détruire ou d'inactiver les *agents pathogènes*. Le processus doit inclure une planification et la mise en place d'étapes qui prennent en compte les options éventuelles, l'efficacité et les *risques*.

Le processus de *désinfection* est susceptible de varier selon que l'objectif global est la prévention, le contrôle ou l'éradication des *maladies*. Les procédés utilisés à des fins d'éradication impliqueront généralement le retrait de l'ensemble des *animaux aquatiques* ainsi qu'une *désinfection* des *établissements d'aquaculture* et de leur équipement. Les procédés utilisés à des fins de contrôle des *maladies* auront plutôt comme objectif de limiter la propagation des *maladies* entre ou au sein des *établissements d'aquaculture*. Bien que différentes approches puissent être utilisées pour atteindre l'objectif identifié, les principes généraux décrits ci-après doivent être appliqués à tous les cas.

1) Le processus de *désinfection* doit inclure les étapes suivantes :

a) Nettoyage et lavage

Le nettoyage et le lavage des surfaces et de l'équipement sont nécessaires à l'élimination des déchets solides, de la matière organique (y compris les salissures biologiques) et des résidus de produits chimiques car leur présence est susceptible de réduire l'efficacité des désinfectants représentent une partie importante du processus de désinfection et doivent systématiquement précéder l'application des désinfectants. L'usage de détergent est également important pour permettre l'élimination du biofilm. Il est nécessaire d'éliminer les déchets solides, la matière organique (y compris les salissures biologiques) et les résidus de produits chimiques, car leur présence est susceptible de réduire l'efficacité des désinfectants. Le détergent utilisé doit être compatible avec le *désinfectant* et la surface traitée. À l'issue de la procédure de du nettoyage, l'excédent d'eau doit être drainé et, avant toute l'application d'un de désinfectants, toutes les surfaces et l'équipement doivent être inspectés afin de s'assurer qu'il ne subsiste plus aucune trace de matière organique.

Annexe 6 (suite)

De même, dans le cas des eaux à traiter, la présence de solides en suspension peut réduire l'efficacité de certains *désinfectants*. L'élimination de ces solides en suspension par différents procédés, tels que la filtration, la sédimentation, la coagulation ou la floculation, doit être réalisée.

Les biofilms, souvent qualifiés de couche visqueuse, sont de fines pellicules constituées de microorganismes et de substances polymériques extracellulaires, qui adhèrent aux surfaces. Les biofilms forment une barrière physique, protégeant les microorganismes qui les constituent de l'action des *désinfectants*. Pour une *désinfection* efficace, il est primordial d'éliminer les biofilms lors de l'étape de nettoyage et de lavage, préalablement à l'application d'un *désinfectant*.

Tous les déchets générés doivent être éliminés dans des conditions de sécurité biologique adéquates, car ils peuvent contenir des *agents pathogènes* viables et susceptibles de propager l'*infection* s'ils ne sont pas maîtrisés.

b) Application d'un désinfectant

Cette étape implique l'application de composés chimiques ou de processus physiques appropriés pour inactiver l'*agent pathogène*.

L'application de *désinfectants* doit prendre en compte le type de matériel nécessitant une *désinfection* et le mode d'application des *désinfectants*. Les matériaux durs et non perméables (par exemple, les surfaces en métal poli, les plastiques et le béton peint) peuvent être parfaitement nettoyés et supportent le contact du *désinfectant*, car ils ne présentent pas d'aspérités dans lesquelles du matériel infectieux pourrait se loger. L'efficacité de la *désinfection* diminuera si la surface est corrodée, piquetée ou si la peinture est écaillée. Par conséquent, l'entretien approprié des surfaces et de l'équipement est essentiel. Dans le cas des surfaces et matériels perméables (par exemple, le matériel en bois, les filets et le sol), une concentration élevée de *désinfectant* et un temps de contact prolongé sont requis parce que la surface de la zone à traiter est plus importante, que les produits chimiques ne peuvent pas pénétrer facilement et que de la matière organique résiduelle peut être présente.

La méthode d'application choisie doit permettre à toutes les surfaces d'entrer en contact avec l'agent pour la durée requise. L'application de *désinfectants* doit être entreprise de façon méthodique (par exemple, en utilisant un quadrillage) afin de s'assurer que la surface traitée est complètement couverte et que les temps de contact préconisés sont respectés. Chaque étape doit être initiée à partir du point le plus élevé et se poursuivre vers le point le plus bas, en commençant par les zones les moins contaminées. Cependant, pour certains équipements, le rinçage des surfaces avec le *désinfectant* peut suffire. Lorsque les *désinfectants* sont appliqués sur des surfaces verticales, il convient de veiller à ce que le temps de contact minimal préconisé soit respecté avant qu'ils ne s'écoulent. Les surfaces verticales peuvent nécessiter le renouvellement du traitement ou requérir l'addition des d'agents moussants compatibles afin de prolonger son adhérence aux surfaces.

Concernant les tuyaux et les biofiltres, il est nécessaire de les remplir entièrement avec la solution de *désinfectant* afin qu'elle entre en contact avec toutes les surfaces. Le recours à la fumigation ou à des équipements de pulvérisation doit être envisagé en cas d'accès difficile ou de zones agencées de façon complexe.

c) Élimination ou inactivation du désinfectant

L'élimination ou l'inactivation des résidus de produits chimiques est cruciale pour éviter les risques de toxicité pour les *animaux aquatiques*, la corrosion des équipements et les impacts sur l'environnement. Parmi les procédés pouvant être employés pour l'élimination ou l'inactivation des résidus chimiques figurent le rinçage des surfaces, la dilution à des niveaux acceptables, l'application de traitements inactivant les agents chimiques ou la mise en place d'un temps d'attente suffisant à la désactivation ou la dissipation du composé actif. Ces procédés peuvent être utilisés indépendamment les uns des autres ou de façon combinée.

- 2) Les *désinfectants* doivent être utilisés conformément à la législation applicable. Les *désinfectants* peuvent présenter des *risques* pour la santé des personnes et des *animaux aquatiques* ainsi que pour l'environnement. Les *désinfectants* chimiques doivent être entreposés, utilisés et éliminés conformément aux dispositions réglementaires et aux instructions du fabricant.
- 3) L'opération de *désinfection* doit être contrôlée afin de s'assurer que la dose de *désinfectant* utilisée est appropriée et qu'elle est efficace. Selon le processus d'application et l'*agent pathogène* concerné, ce contrôle peut être exercé de différentes façons. Par exemple, il est possible de mesurer la concentration de l'agent actif (par exemple, les teneurs en chlore résiduel), de mesurer son activité de façon indirecte à l'aide d'un indicateur de suivi du processus (par exemple, la mesure du potentiel d'oxydoréduction) et de mesurer son efficacité à l'aide de bactéries indicatrices (par exemple, par dénombrement des colonies de bactéries hétérotrophes sur gélose).

Dans les installations ayant été vidées de leurs *animaux aquatiques* et ayant fait l'objet d'une *désinfection*, l'utilisation d'une population sentinelle, préalablement à la réintroduction d'animaux, peut être envisagée. La population sentinelle doit être sensible à l'*agent pathogène* d'intérêt et exposée à des conditions favorisant l'expression clinique de la *maladie*, dût l'*agent pathogène* demeurer viable.

- 4) Les *établissements d'aquaculture* doivent conserver un registre de réalisation des processus de *désinfection* appliqués. Les registres doivent être tenus de façon à permettre l'évaluation du plan de *désinfection*.

Article 4.3.5.

Planification

Un plan de *désinfection* doit être élaboré et inclure une évaluation des voies de transmission, le type de matériel à désinfecter, les *agents pathogènes* à inactiver, les consignes en matière de santé et de sécurité et les mesures de contrôle requises ainsi que l'environnement dans lequel le processus devra être réalisé. Le plan de *désinfection* doit être régulièrement révisé et prévoir un mécanisme permettant d'en déterminer l'efficacité. Le plan de désinfection doit être régulièrement révisé afin de garantir que le processus de désinfection demeure efficace et efficient. Toutes les modifications apportées au plan de *désinfection* doivent également être documentées.

Le processus de planification doit permettre d'évaluer les points de contrôle critiques où la *désinfection* sera la plus efficace. Les priorités en matière de *désinfection* doivent être déterminées au regard des voies de propagation potentielles des *agents pathogènes* et de la probabilité relative de contamination. Pour réaliser une *désinfection* efficace des installations (par exemple, des bassins), il est nécessaire que le processus de *désinfection* prévienne d'exclure, d'éliminer ou de détruire les *vecteurs* qu'elles hébergent.

Un inventaire de toutes les pièces d'équipements nécessitant une *désinfection* doit être dressé lorsque cela est réalisable. Il doit être procédé à une évaluation des matériaux de fabrication utilisés, de la porosité de leurs surfaces, de leur résistance aux dommages chimiques et de leur accessibilité à la *désinfection*. Puis, la méthode de *désinfection* appropriée doit être décidée pour chacune de ces pièces d'équipement.

Le niveau de nettoyage requis avant de procéder à la *désinfection* doit être évalué pour chaque type d'équipement. Si d'importantes salissures, formées par accumulation de solides et de particules, sont observées, il convient d'accorder une attention toute particulière au processus de nettoyage et les ressources nécessaires à sa réalisation. Le processus de nettoyage physique ou chimique doit être compatible avec le *désinfectant* choisi.

Le personnel, l'équipement et les matériels à désinfecter doivent faire l'objet d'une évaluation, en tenant compte du type et du nombre de pièces d'équipements à traiter et de la façon dont les déchets seront gérés.

La capacité à contrôler le débit et les volumes d'eau doit être prise en considération lors de l'étape de planification et dépendra des caractéristiques de l'établissement (systèmes clos en circuit recirculé ou ouvert et systèmes ouverts). L'eau peut être désinfectée au moyen de méthodes variées, tel que décrit à l'article 4.3.11.

Article 4.3.6.

Désinfection dans le cadre d'une réponse aux situations d'urgences sanitaires

La *désinfection* constitue un élément essentiel de toute réponse aux situations d'urgences sanitaires et sur laquelle reposent les activités de contrôle des *maladies* telles que la mise en quarantaine des *établissements d'aquaculture* et la réalisation de procédures d'abattage sanitaire. Les conditions de réalisation de la *désinfection* lors d'une réponse aux situations d'urgences sanitaires diffèrent de celles habituellement observées dans le cadre des activités relevant de la sécurité biologique. Il doit être tenu compte du niveau élevé de *risque de maladie* (en raison de l'importance de la *maladie*), de la concentration importante en agents pathogènes, des volumes potentiellement conséquents d'*animaux aquatiques* infectés et de déchets, des vastes surfaces requérant une *désinfection* et des volumes considérables d'eau contaminée. La planification doit prendre en considération ces circonstances, intégrer une évaluation des *risques* et inclure des méthodes de contrôle efficaces.

Dans le cadre d'une réponse à une situation d'urgence sanitaire, il peut être préférable d'empêcher la transmission plutôt que de s'appuyer sur la *désinfection*. L'équipement ne doit pas sortir d'un *établissement d'aquaculture* infecté sauf si une *désinfection* efficace y a été effectuée. Dans certaines circonstances, l'équipement ou le matériel, difficile à désinfecter ou présentant une forte probabilité de contamination, pourra être détruit, dans des conditions de sécurité biologique adéquates, plutôt que désinfecté.

Article 4.3.7.

Types de désinfectants

Parmi les types de *désinfectants* communément utilisés en *aquaculture* figurent :

1. Agents oxydants

La majorité des agents oxydants a une action relativement rapide et constitue des *désinfectants* efficaces contre un grand nombre de micro-organismes. Ces composés sont inactivés par la matière organique et, par conséquent, doivent être utilisés après la réalisation d'une étape de nettoyage efficace. La matière organique consomme les agents oxydants, dont la concentration initiale (dose de charge) peut ainsi chuter rapidement, rendant difficile la prédiction des niveaux de concentrations (concentration résiduelle). Ainsi, les niveaux de concentrations résiduelles doivent systématiquement être contrôlés afin de s'assurer qu'ils demeurent supérieurs aux concentrations minimales pendant la durée requise.

Annexe 6 (suite)

Les agents oxydants peuvent être toxiques pour les *animaux aquatiques* et, par conséquent, doivent être éliminés ou inactivés.

Les agents oxydants communément utilisés sont les composés chlorés, la chloramine-T, les iodophores, les peroxydes, le dioxyde de chlore et l'ozone.

2. Modificateurs de pH (alcalins et acides)

La modification du pH peut être réalisée par addition de composés alcalins ou acides. L'utilisation de modificateurs de pH présente comme avantages qu'il est aisé de déterminer les concentrations nécessaires et qu'ils ne sont pas inactivés par la matière organique. Les modificateurs de pH peuvent également être utilisés dans les zones où l'application d'autres désinfectants efficaces n'est pas réalisable, comme, par exemple, dans la tuyauterie et les filtres biologiques. Les modificateurs de pH sont des composés alcalins ou acides utilisés afin de modifier le pH de l'environnement. Ils présentent L'utilisation de modificateurs de pH présente comme avantages une mesure aisée de la concentration et de ne pas être le fait qu'ils ne soient pas inactivés par la matière organique, et donc de pouvoir Les modificateurs de pH peuvent être utilisés dans les zones où une étape de nettoyage efficace n'est pas réalisable, comme, par exemple, dans la tuyauterie et les filtres biologiques.

3. Aldéhydes

Les aldéhydes agissent en dénaturant les protéines. Le formaldéhyde et le glutaraldéhyde sont deux composés à base d'aldéhyde qui peuvent être utilisés pour décontaminer les *établissements d'aquaculture*. Ils sont extrêmement efficaces contre un grand nombre d'organismes mais nécessitent un temps de contact prolongé. Les aldéhydes conservent leur efficacité d'action en présence de matière organique et sont peu corrosifs. Le glutaraldéhyde est utilisé sous forme d'une solution liquide pour la stérilisation à froid, notamment de l'équipement sensible à la chaleur. Le formaldéhyde peut être utilisé sous forme de pulvérisation (solution liquide) ou de fumigation (gaz).

4. Biguanides

Parmi les nombreux biguanides disponibles, la chlorhexidine est la plus communément utilisée. Les biguanides ne sont pas actifs dans les eaux dures ou alcalines et ils sont moins efficaces que d'autres groupes de *désinfectants* pour lutter contre nombre d'*agents pathogènes*. Toutefois, ces composés sont comparativement moins corrosifs et relativement sans danger. De ce fait, ils sont communément utilisés pour la *désinfection* des surfaces cutanées et des équipements fragiles.

5. Composés d'ammonium quaternaire

L'activité biocide des composés d'ammonium quaternaire est variable et sélective. Ils sont efficaces contre quelques bactéries (forme végétative) et champignons mais pas contre tous les virus. Les composés d'ammonium quaternaire sont particulièrement actifs contre les bactéries gram positif ; leur action contre les bactéries gram négatif est lente et certaines souches y sont résistantes. Ces composés ne sont pas efficaces contre les spores. Les composés d'ammonium quaternaires présentent comme avantages d'être non corrosifs et de posséder des propriétés mouillantes, qui augmentent leur contact avec les surfaces. Les composés d'ammonium quaternaire peuvent être toxiques pour les *animaux aquatiques* et doivent donc être éliminés des surfaces à l'issue des procédés de désinfection.

6. Irradiation aux rayons ultra-violet

L'irradiation aux rayons ultra-violet (UV) est une option valable pour le traitement de l'eau entrant ou sortant des *établissements d'aquaculture* dans lesquels un certain contrôle du débit d'eau transitant dans les systèmes en circuit recirculé ou ouvert est exercé. L'irradiation aux rayons UV doit être utilisée sur de l'eau ayant été convenablement filtrée, car la présence de solides en suspension réduit la transmission des rayons UV et l'efficacité de cette méthode.

7. Traitement thermique

La sensibilité des *agents pathogènes* au traitement thermique varie de façon significative. Par conséquent, les caractéristiques de l'agent pathogène visé doivent être prises en considération. Dans la plupart des conditions, la chaleur humide s'avère plus efficace que la chaleur sèche.

8. Dessiccation

La dessiccation peut être une méthode efficace de *désinfection* contre les *agents pathogènes* sensibles ; elle peut être utilisée dans des circonstances rendant irréalisable le recours aux autres méthodes de *désinfection* ou comme méthode de *désinfection* complémentaire.

La dessiccation ne peut être considérée comme une méthode de *désinfection* que si le séchage complet d'une pièce d'équipement donné est obtenu ; en effet, l'absence d'eau permet l'élimination de nombreux *agents pathogènes*. Toutefois, le taux d'humidité peut être difficile à mesurer dans certaines circonstances. L'efficacité de cette méthode dépendra des conditions environnementales telles que la température et l'humidité.

9. Combinaison de méthodes de désinfection

La combinaison de méthodes de *désinfection* doit être envisagée dès lors que ces dernières agissent de façon synergique et offrent une meilleure garantie de l'inactivation efficace de l'*agent pathogène*. Par exemple :

- a) l'association de l'exposition directe à la lumière du soleil et de la dessiccation constitue une méthode de *désinfection* combinant trois actions potentielles que sont l'irradiation aux rayons UV, le chauffage et la dessiccation ; cette méthode a un coût opérationnel nul et peut être utilisée consécutivement à d'autres méthodes ;
- b) l'association en série de l'ozonisation et de l'irradiation aux rayons UV est souvent utilisée en complément d'autres méthodes de *désinfection* ; elles présentent des modes d'action différents ; l'irradiation aux rayons UV présente également comme avantage d'éliminer les résidus d'ozone de l'eau traitée.

Des effets antagonistes peuvent être observés en cas de combinaison d'agents chimiques ou de détergents.

Article 4.3.8.

Sélection d'un désinfectant

Le *désinfectant* doit être choisi en prenant en considération les éléments suivants :

- l'efficacité contre les *agents pathogènes* ;
- la concentration efficace et le temps d'exposition ;
- la capacité d'évaluation de l'efficacité ;
- la nature des pièces d'équipement à désinfecter et la possibilité qu'elles soient endommagées ;
- la compatibilité avec le type d'eau disponible (eau douce, eau dure ou eau de mer par exemple) ;
- la disponibilité du *désinfectant* et de l'équipement ;
- la facilité d'application ;
- la capacité à éliminer la matière organique ;
- le coût ;
- l'impact des résidus sur les *animaux aquatiques* et l'environnement, et
- la sécurité de l'utilisateur.

Article 4.3.9.

Types d'établissements d'aquaculture et d'équipement

Les caractéristiques des différents types d'*établissements d'aquaculture* et de leur équipement sont extrêmement variables. Le présent article décrit certains aspects à prendre en considération pour procéder à la réalisation efficace de la *désinfection* des différents types d'*établissements d'aquaculture* et de leur équipement.

1. Bassins

Les bassins sont généralement de grande taille, peuvent être creusés à même la terre ou être dotés d'un revêtement en plastique. Ces caractéristiques, conjuguées à la présence de conséquents volumes d'eau, rendent difficile le nettoyage précédant la décontamination, d'autant plus que les charges en matière organique peuvent affecter l'action de nombreux *désinfectants*. Les bassins doivent être vidangés de leur eau et curés autant que possible de leur matière organique, préalablement à la *désinfection*. L'eau **Toutes les eaux** et la matière organique doivent être désinfectés ou éliminés dans des conditions de sécurité biologique adéquates. Les bassins en terre doivent être minutieusement asséchés puis chaulés afin d'élever le pH et donc de faciliter le processus d'inactivation des *agents pathogènes*. Le **raclement, et le labourage ou le dallage** des fonds des bassins sans revêtement facilitera également l'incorporation de la chaux et l'assèchement.

Annexe 6 (suite)

2. Cuves

Les matériaux utilisés dans la fabrication des cuves (par exemple, la fibre de verre, le béton ou le plastique) sont déterminants dans le choix de la méthode de *désinfection* utilisée. Les cuves en béton nu sont sensibles à la corrosion par les acides et aux dommages potentiellement occasionnés par les pulvérisateurs à haute pression. Ils sont également poreux. Par conséquent, il est nécessaire de prévoir un temps de contact prolongé avec les produits chimiques pour assurer leur *désinfection*. La *désinfection* des cuves en plastique, peintes et en fibre de verre est plus facile en raison de leur surface, lisse et non poreuse, qui en permet le nettoyage minutieux et qui résiste à la plupart des produits chimiques.

Les bassins doivent être vidangés de leur eau et la matière organique doit être éliminée autant que possible préalablement à la *désinfection*. L'eau et la matière organique doivent être désinfectées ou éliminées dans des conditions de sécurité biologique adéquates. L'équipement des cuves doit être retiré et faire l'objet d'un nettoyage et d'une *désinfection* séparés. Les déchets organiques et les débris doivent être éliminés. La surface des cuves doit être lavée à l'aide de vaporisateurs à haute pression ou d'un broyage mécanique, en association avec des produits détergents, afin d'éliminer les salissures comme les algues et les biofilms. De l'eau chaude peut être utilisée pour améliorer le processus de nettoyage. Tout excédent d'eau doit être éliminé avant l'application des désinfectants. Préalablement à l'application de désinfectants, tout excédent d'eau doit être drainé et désinfecté ou éliminé dans des conditions de sécurité biologique adéquates.

Lorsque les *désinfectants* sont appliqués sur des surfaces verticales, il convient de s'assurer que le temps de contact approprié est respecté avant que le *désinfectant* ne s'écoule. À l'issue de la phase de *désinfection*, il doit être procédé au rinçage des cuves, afin d'éliminer tous les résidus, et à leur assèchement total.

3. Tuyaux

La *désinfection* des tuyaux peut être difficile en raison de la difficulté d'accès aux surfaces. Les matériaux utilisés pour fabriquer les tuyaux doivent être pris en considération lors de la sélection de la méthode de *désinfection*.

Les tuyaux peuvent être efficacement nettoyés au moyen de solutions alcalines ou acides, ou bien de systèmes de nettoyage projetant de la mousse. Afin de permettre un nettoyage efficace, il doit être procédé à Afin qu'elle soit efficace, la désinfection du système de tuyauterie nécessite l'élimination du biofilm, puis à l'évacuation des particules en suspension générées et, enfin, à un rinçage complet.

Une fois les tuyaux nettoyés, des *désinfectants* chimiques ou un courant d'eau chaude peuvent être utilisés. Quelle que soit l'étape, les tuyaux doivent être entièrement remplis afin que les surfaces internes soient traitées.

4. Filets des cages et autres matériels fibreux

Les filets utilisés dans la conception des cages d'*aquaculture* sont souvent de grande taille, difficiles à manipuler et sont le siège d'une accumulation significative de salissures biologiques. Ils sont généralement fabriqués à partir de matériaux fibreux qui piègent la matière organique et l'humidité. L'utilisation des filets doit être réservée à un seul établissement d'*aquaculture* ou une seule zone car ils présentent une probabilité élevée de contamination et peuvent s'avérer difficiles à désinfecter.

Une fois le filet retiré de l'eau, il doit être directement transféré sur le site dédié au lavage des filets. Les filets doivent être complètement nettoyés préalablement à la *désinfection* afin d'éliminer la matière organique et de faciliter la pénétration des *désinfectants* chimiques. La méthode de nettoyage des filets la plus efficace consiste à éliminer en premier lieu les salissures de grande taille puis de procéder à leur lavage avec une solution de détergent. L'eau et la matière organique doivent être éliminées dans des conditions de sécurité biologique adéquate.

À l'issue du nettoyage, les filets peuvent être désinfectés par immersion totale dans une solution de produits chimiques désinfectants ou dans de l'eau chaude. La durée du traitement doit être suffisante afin de permettre sa pénétration dans les matériaux constitutifs des filets. La méthode de traitement doit être choisie en tenant compte de sa capacité à fragiliser ou endommager les filets. Le traitement peut avoir un effet délétère sur la solidité des filets. Il doit en être tenu compte dans le choix de la méthode de traitement à appliquer afin de ne pas compromettre l'intégrité des filets. À l'issue de la *désinfection*, les filets doivent faire l'objet d'un séchage préalablement à leur entreposage. Si les filets ne sont pas convenablement séchés avant d'être enroulés, ils conserveront une certaine humidité susceptible de favoriser la survie des *agents pathogènes*.

Les autres matériaux fibreux tels que le bois, les cordes et les filets des époussettes présentent des caractéristiques similaires à celles des filets des cages. Elles nécessitent donc une attention particulière. Dans la mesure du possible, il est recommandé que l'utilisation d'équipement comportant des matériaux fibreux soit réservée à un site spécifique.

5. Véhicules

La probabilité de contamination des *véhicules* sera déterminée au regard de l'usage qui en est fait (par exemple, transport d'*animaux aquatiques* morts, vivants ou venant d'être récupérés). Toutes les surfaces extérieures et intérieures potentiellement contaminées doivent être désinfectées. Il convient de veiller tout particulièrement aux zones susceptibles d'être contaminées, telles que la surface interne des *conteneurs*, des tuyaux, de l'eau de transport et des déchets. L'application de *désinfectants* corrosifs aux *véhicules* doit être évitée ; dans le cas contraire, l'élimination des résidus présentant une action corrosive doit être réalisée au moyen d'un rinçage minutieux. Les composés oxydants tels que le chlore sont les *désinfectants* les plus communément utilisés pour les *véhicules*.

Tous les bateaux doivent être fréquemment désinfectés afin d'empêcher le transfert d'agents pathogènes. Le niveau de contamination des bateaux sera déterminé selon l'usage qui en est fait. Les bateaux utilisés pour la récupération des animaux aquatiques vivants ou morts sur les sites d'aquaculture doivent être considérés comme présentant une forte probabilité d'être contaminés. La matière organique doit être régulièrement nettoyée des ponts et des aires de travail.

Le processus de planification de la désinfection doit intégrer une évaluation permettant l'identification des sites susceptibles d'être contaminés, tels que l'intérieur et la proximité de la machinerie, des cuves, des cales et de la tuyauterie. Toutes les pièces d'équipement démontables sont retirées, préalablement nettoyées et désinfectées au cours d'une étape distincte de l'étape de la désinfection du bateau. Des procédures complémentaires doivent être élaborées pour les bateaux à viviers, car ils peuvent potentiellement être à l'origine du transfert d'agents pathogènes lors du rejet de l'eau contaminée. Les effluents contaminés doivent être désinfectés préalablement à leur rejet (voir article 4.3.11.).

Dans la mesure du possible, les bateaux doivent être mis à terre ou en cale sèche pour procéder à l'opération de désinfection afin de limiter le rejet d'eaux usées dans l'environnement aquatique et de pouvoir accéder à la coque et aux renforcements. Les organismes constitutifs des salissures biologiques, qui peuvent jouer le rôle de vecteurs, et les matériels contaminés doivent être éliminés.

Lorsque les bateaux ne peuvent pas être mis à terre ou en cale sèche, le choix de la méthode de désinfection doit porter sur celle qui génère le moins de rejets de produits chimiques toxiques dans l'environnement aquatique. L'inspection et le nettoyage des coques doivent être effectués par les plongeurs. Le cas échéant, le recours à des méthodes mécaniques, telles que la pulvérisation à haute pression ou le nettoyage à la vapeur, doit être envisagé comme alternative à la désinfection chimique pour le nettoyage de part et d'autre de la ligne de flottaison. La fumigation peut être également envisagée pour les grandes surfaces, sous réserve que les bateaux puissent être rendus étanches au gaz de façon adéquate.

6. Bâtiments

Dans les établissements d'aquaculture se trouvent des bâtiments destinés à l'élevage, la récupération et la transformation des animaux aquatiques ainsi que des bâtiments destinés à l'entreposage des aliments pour animaux aquatiques et de l'équipement.

L'approche utilisée en matière de désinfection est susceptible de varier selon la structure du bâtiment et l'importance de son degré d'exposition aux matériels et équipement contaminés.

Les bâtiments doivent être conçus de façon à permettre un nettoyage efficace et une application minutieuse des désinfectants sur toutes les surfaces intérieures. Certains bâtiments hébergent des systèmes de tuyauterie complexes, de machinerie et de cuves qui rendent l'opération de désinfection difficile. Dans la mesure du possible, les bâtiments devront être nettoyés de tous leurs débris et vidés de leur équipement avant qu'il ne soit procédé à leur désinfection.

L'utilisation de produits pulvérulents ou moussants doit être envisagée pour la désinfection des zones agencées de façon complexe et des surfaces verticales. La fumigation doit être envisagée pour les surfaces importantes, sous réserve que les bâtiments puissent être rendus étanches au gaz de façon adéquate.

7. Conteneurs

Le terme de conteneur désigne aussi bien les simples bacs en plastique, utilisés pour le transport des produits issus d'animaux aquatiques récoltés ou des animaux morts, que les systèmes complexes de cuves utilisés pour le transport des animaux aquatiques vivants.

Les conteneurs sont généralement conçus à partir de matériaux non poreux (par exemple, le plastique ou l'acier inoxydable) qui peuvent être aisément désinfectés. Ils doivent être considérés comme étant des pièces d'équipement à haut risque, car ils sont en contact étroit avec les animaux aquatiques ou leurs produits (par exemple, du sang ou des animaux aquatiques malades). En outre, leur nécessaire déplacement d'un lieu à l'autre en fait des matériels contaminés potentiels, susceptibles de propager les agents pathogènes. Aux fins du transport des animaux aquatiques vivants, les conteneurs peuvent être dotés de systèmes de tuyauterie et de pompage, à l'origine de la création de zones confinées qui doivent également être désinfectées.

Le conteneur doit être complètement vidangé de son eau, vidé de tous les animaux aquatiques puis nettoyé de ses matières fécales et organiques au moyen d'un rinçage avec de l'eau propre, qui doivent être éliminés dans des conditions de sécurité biologique adéquates. Tous les tuyaux et les pompes qui lui sont associés doivent être inspectés et rincés. Le lavage des conteneurs doit être effectué au moyen de détergents chimiques appropriés, en combinaison avec des nettoyeurs à haute pression ou un brossage mécanique.

Les surfaces internes et externes des conteneurs doivent être traitées selon une méthode de désinfection appropriée. Ils doivent ensuite être rincés et inspectés, afin de s'assurer de l'absence de résidus organiques, puis entreposés de façon à faciliter l'égouttage et le séchage rapides.

8. Bateaux

~~Tous les bateaux doivent être fréquemment désinfectés afin d'empêcher le transfert d'agents pathogènes. Le niveau de contamination des bateaux sera déterminé selon l'usage qui en est fait. Les bateaux utilisés pour la récupération des animaux aquatiques vivants ou morts sur les sites d'aquaculture doivent être considérés comme présentant une forte probabilité d'être contaminés. La matière organique doit être régulièrement nettoyée des ponts et des aires de travail.~~

Annexe 6 (suite)

Le processus de planification de la *désinfection* doit intégrer une évaluation permettant l'identification des sites susceptibles d'être contaminés, tels que l'intérieur et la proximité de la machinerie, des cuves, des cales et de la tuyauterie. Toutes les pièces d'équipement démontables sont retirées préalablement à la *désinfection*. Des procédures complémentaires doivent être élaborées pour les bateaux à viviers, car ils peuvent potentiellement être à l'origine du transfert d'agents pathogènes lors du rejet de l'eau contaminée. Les effluents contaminés doivent être désinfectés préalablement à leur rejet (voir article 4.3.11.).

Dans la mesure du possible, les bateaux doivent être mis à terre pour procéder à l'opération de *désinfection* afin de limiter le rejet d'eaux usées dans l'environnement aquatique et de pouvoir accéder à la coque. Les organismes constitutifs des salissures biologiques, qui peuvent jouer le rôle de vecteurs et de fomites doivent être éliminés.

Lorsque les bateaux ne peuvent pas être mis à terre, le choix de la méthode de *désinfection* doit porter sur celle qui génère le moins de rejets de produits chimiques toxiques dans l'environnement aquatique. L'inspection et le nettoyage des coques doivent être effectués par les plongeurs. Le cas échéant, le recours à des méthodes mécaniques, telles que la pulvérisation à haute pression ou le nettoyage à la vapeur, doit être envisagé comme alternative à la *désinfection* chimique pour le nettoyage de part et d'autre de la ligne de flottaison. La fumigation peut être également envisagée pour les grandes surfaces, sous réserve que les bateaux puissent être rendus étanches au gaz de façon adéquate.

9. 8. Biofiltres

Les biofiltres utilisés dans les systèmes de production clos ou semi-clos constituent un point de contrôle important des *maladies*. Les biofiltres sont conçus de façon à héberger des colonies de bactéries bénéfiques, utilisées pour améliorer la qualité de l'eau. Les conditions dans lesquelles ces bactéries sont maintenues peuvent également favoriser la survie des *agents pathogènes* éventuellement présents. Il est habituellement impossible de désinfecter les biofiltres sans également détruire les bactéries bénéfiques. Par conséquent, les problèmes concernant la qualité de l'eau doivent être pris en considération lors de la planification des stratégies de *désinfection* des biofiltres.

En cas de *désinfection* des biofiltres et de leurs substrats, il est nécessaire de vidanger le système, d'éliminer les résidus de matière organique et de nettoyer les surfaces. L'opération de *désinfection* des systèmes de biofiltres peut être réalisée en modifiant les niveaux de pH de l'eau (en utilisant soit des solutions acides soit des solutions alcalines). Lors de l'opération, les niveaux de pH atteints doivent permettre d'inactiver l'*agent pathogène* visé sans toutefois corroder les pompes et les pièces d'équipement au sein du système de biofiltres. Comme alternative, il est possible de démonter complètement le biofiltre, d'en retirer le substrat, d'en nettoyer les composants et d'appliquer les *désinfectants* de façon séparée. Cette procédure est recommandée en cas de réponse à une situation d'urgence sanitaire. Le substrat du biofiltre doit être remplacé s'il ne peut pas être désinfecté efficacement. Les systèmes de biofiltres doivent être complètement rincés avant la réintroduction des animaux.

10. 9. Équipement de l'élevage nécessaire à l'élevage et à la récupération

Dans les *établissements d'aquaculture* sont usuellement présentes des pièces d'équipement est usuellement présent l'équipement nécessaire à l'élevage et à la récupération, qui sont est en contact étroit avec les *animaux aquatiques* et qui agissent potentiellement comme des matériels contaminés (par exemple, les trieuses, les systèmes automatisés de vaccination et les pompes à poisson).

Les principes généraux figurant à l'article 4.3.4. doivent être appliqués à l'équipement de l'élevage nécessaire à l'élevage et à la récupération. Chaque pièce d'équipement doit être examinée afin de déterminer les parties qui sont en contact étroit avec les *animaux aquatiques* ainsi que les zones d'accumulations de la matière organique. Si cela s'avère nécessaire, l'équipement doit être démonté afin d'en permettre le nettoyage et la *désinfection* adéquats.

Article 4.3.10.

Équipement individuel

La *désinfection* de l'équipement individuel doit tenir compte du niveau de la probabilité et du degré de contamination associés avec un usage antérieur. Si possible, l'utilisation de l'équipement individuel doit être réservée à un site spécifique afin d'éviter le recours régulier à la *désinfection*.

L'équipement choisi doit être non-absorbant et aisé à nettoyer. L'ensemble du personnel entrant dans la zone de production doit s'équiper de vêtements de protection propres et non contaminés. À l'entrée comme à la sortie des zones de production, les bottes doivent être nettoyées et désinfectées. En cas d'utilisation de pédiluves, il est nécessaire de prévoir une procédure de nettoyage, afin d'éliminer les accumulations de matière organique et de boue, une profondeur suffisante à recouvrir les bottes, l'utilisation d'une solution désinfectante non inactivée par la matière organique ainsi que son renouvellement régulier.

Certains types d'équipement individuel Les équipements hautement contaminés, tels que les équipements de plongée, nécessitent peuvent nécessiter une attention particulière, car ils sont difficiles à désinfecter, ils peuvent être déplacés de site en site et ils sont souvent sujets à la corrosion chimique. Le rinçage fréquent de l'équipement constituera une aide précieuse pour réduire l'accumulation de matière organique et rendre la *désinfection* plus efficace. Il est nécessaire de permettre à l'équipement de sécher complètement afin de limiter l'apparition de microenvironnements humides, susceptibles d'abriter des *agents pathogènes*.

Article 4.3.11.

Désinfection de l'eau

Il peut être nécessaire, pour les *établissements d'aquaculture*, d'avoir recours à la *désinfection* du flux d'eau entrant et des effluents pour éliminer les *agents pathogènes*. Le choix de la méthode de *désinfection* la plus appropriée dépendra de l'objectif de la *désinfection* et des caractéristiques de l'eau à désinfecter.

Le retrait des *animaux aquatiques* et l'élimination des solides en suspension de l'eau à traiter sont des préalables essentiels à l'application des *désinfectants*. Il est établi que les agents pathogènes adhèrent à la matière organique et inorganique. L'élimination des solides en suspension permet donc de réduire de façon significative la charge en *agents pathogènes* dans l'eau. Il est possible d'éliminer les solides en suspension à l'aide de la filtration ou de la sédimentation des matériaux en suspension. Le choix du système de filtration le mieux adapté dépendra de la qualité initiale de l'eau, des volumes à filtrer, des coûts d'investissements de capital et d'exploitation ainsi que de sa fiabilité.

Les *désinfectants* physiques (par exemple, l'irradiation aux rayons UV) et chimiques (par exemple, l'ozone, le chlore et le dioxyde de chlore) sont communément utilisés pour désinfecter l'eau. Les solides en suspension doivent être éliminés préalablement à l'application de ces *désinfectants*, car la matière organique est susceptible d'inhiber le processus d'oxydation mis en œuvre lors de la *désinfection*. En outre, les solides en suspension inhibent la transmission des rayons UV et réduisent leur efficacité ~~contre les agents pathogènes auxquels ils confèrent une protection~~. Combiner les méthodes peut se révéler bénéfique lorsqu'elles agissent de façon synergique ou lorsqu'il est nécessaire de répéter les opérations.

Il est essentiel de contrôler l'efficacité de la *désinfection* de l'eau. Cela peut être réalisé de façon directe par la recherche des *agents pathogènes* d'intérêt, de façon indirecte par la recherche d'organismes indicateurs ou par le contrôle des niveaux de concentrations résiduelles de *désinfectants*.

La gestion des résidus chimiques est importante afin d'en prévenir les effets toxiques chez les *animaux aquatiques*. Par exemple, les résidus formés par l'action de l'ozone sur l'eau de mer, tels que les composés bromés, sont toxiques pour les stades de développement précoce des *animaux aquatiques*; ils peuvent être éliminés par la filtration au charbon. Les teneurs en chlore résiduelles doivent être éliminées de l'eau par désactivation chimique ou formation d'un dégagement gazeux.

– Texte supprimé

CHAPITRE 4.4.

RECOMMANDATIONS POUR LA DÉSINFECTION
DE SURFACE DES ŒUFS DE SALMONIDÉS

Article 4.4.1.

Introduction

La pratique consistant à désinfecter les œufs de salmonidés dans les écloséries est une condition essentielle pour s'assurer de la prévention du transfert de ~~maladies endémiques~~ des agents pathogènes entre les incubateurs et entre les installations ; elle fait partie intégrante des protocoles courants d'hygiène des écloséries. Le procédé de *désinfection* s'avère également important lors des échanges commerciaux internationaux d'œufs de salmonidés entre les pays, zones ou compartiments ~~compartiments, zones ou pays~~, car il prévient le transfert de certains *agents pathogènes*. Bien que généralement efficace pour la *désinfection* de la surface des œufs et des liquides véhiculant les gamètes, l'utilisation de *désinfectants* ne permet pas de prévenir la transmission verticale.

Les œufs de salmonidés peuvent être désinfectés par nombre d'agents chimiques. Cependant, la *désinfection* par un produit iodé dénommé povidone iodée demeure la méthode la plus communément utilisée.

Les iodophores, généralement des solutions de povidone iodée, ont comme avantages d'avoir un pH neutre, d'être non irritants et d'être relativement peu toxiques. La neutralité de leur pH est une caractéristique importante, car elle permet de limiter leur toxicité et d'assurer leur efficacité. Il est recommandé de suivre le mode d'emploi figurant dans la notice du fabricant afin d'être en mesure de déterminer les circonstances dans lesquelles la valeur du pH pourrait être préoccupante. Si d'autres composés iodés sont utilisés pour la *désinfection*, ils doivent être complétés par une solution tampon appropriée.

Article 4.4.2.

Protocole de désinfection des œufs de salmonidés

Ce protocole de *désinfection* peut être appliqué aux œufs récemment fécondés ou aux œufs embryonnés. Toutefois, il est important de permettre aux œufs fécondés de commencer leur phase de durcissement avant de les soumettre au protocole de *désinfection*. Bien que la marge de sécurité entre la concentration efficace contre les agents pathogènes et celle toxique pour les œufs ayant achevé la phase de durcissement soit considérable, il n'est pas recommandé d'utiliser le protocole de *désinfection* sur des ovules non fécondés ou lors de la phase de fécondation. Il est primordial que le pH de la solution d'iodophores soit maintenu entre 6 et 8.

Afin de désinfecter les œufs de salmonidés, le protocole suivant doit être appliqué :

- 1) rinçage (pendant 30 à 60 secondes) à l'aide d'une solution saline dont la concentration est comprise entre à 0,9 % et 1,1 % et qui est exempte d'non contaminée par des agents pathogènes (~~pendant 30 à 60 secondes~~), afin d'éliminer les dépôts de matières organiques ; puis
- 2) balnéation dans une solution d'iodophores contenant 100 ppm d'iode disponibles pendant au moins 10 minutes ; la ~~solution d'iodophores ne doit être utilisée qu'une seule fois~~ concentration en iodophores doit être suivie afin d'en garantir l'efficacité ; prévoir quatre volumes de solution d'iodophores au minimum maximum pour un volume d'œufs ; puis
- 3) second rinçage (pendant 30 à 60 secondes) à l'aide d'une solution saline dont la concentration est comprise entre à 0,9 % et 1,1 % et qui est exempte d' non contaminée par des agents pathogènes (~~pendant 30 à 60 secondes~~) ; puis
- 4) conservation dans une eau exempte d' non contaminée par des agents pathogènes.

Les solutions utilisées pour le rinçage et la *désinfection* doivent être préparées avec de l'eau ~~non contaminée par des exempte d'~~ agents pathogènes. Lorsqu'il est faible, le pH des solutions d'iodophores acides peut être corrigé par l'emploi d'une solution tampon de bicarbonate de sodium (NaHCO₃).

— Texte supprimé

CHAPITRE 5.1.

OBLIGATIONS GÉNÉRALES LIÉES À LA CERTIFICATION

[...]

Article 5.1.4.

Responsabilités en cas de survenue d'un incident lié à une opération d'importation

- 1) Les *échanges internationaux* impliquent une responsabilité éthique de tous les instants. C'est pourquoi, si, après la réalisation d'une exportation, l'*Autorité compétente* apprend l'apparition ou la réapparition d'une *maladie* qui a été expressément mentionnée dans les *certificats sanitaires internationaux applicables aux animaux aquatiques*, ou d'une autre *maladie* ayant une importance épidémiologique potentielle pour le *pays importateur*, pendant une période jugée raisonnable, il y a obligation pour cette *Autorité* de notifier ce fait au *pays importateur*. De la sorte, les *marchandises* importées pourront être inspectées ou soumises à des épreuves pratiquées au laboratoire, et les mesures appropriées pourront être prises pour limiter la propagation de la *maladie* si elle a été introduite par inadvertance.
- 2) Si une *maladie* apparaît chez des *animaux aquatiques* ~~dans le pays importateur~~ et est associée à l'importation de *marchandises*, l'*Autorité compétente* du *pays exportateur* doit en être avertie. Ainsi, le *pays exportateur* sera en mesure d'effectuer une enquête, car il peut s'agir de la première information disponible concernant l'apparition de la *maladie* dans une population d'*animaux aquatiques* précédemment indemne. L'*Autorité compétente* du ~~pays exportateur~~ doit informer le pays importateur doit être informée du résultat de l'enquête pour lui permettre de déterminer si des mesures supplémentaires s'imposent, dans le cas où la source de l'*infection* ne proviendrait pas du *pays exportateur*.
- 34) En cas de suspicion, pour des motifs valables, du caractère frauduleux d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* des *pays importateurs* et des *pays exportateurs* doivent mener une enquête. Il convient également d'envisager une notification à tout pays tiers pouvant être impliqué. L'ensemble des cargaisons concernées doit demeurer sous contrôle officiel dans l'attente des conclusions de l'enquête. Les *Autorités compétentes* de tous les pays impliqués doivent coopérer pleinement dans le cadre de l'enquête. Si le caractère frauduleux du *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* est avéré, tout doit être mis en œuvre afin d'en identifier les responsables, de sorte que les actions adéquates puissent être menées conformément à la législation en vigueur.

— Texte supprimé

CHAPITRE 9.1.

INFECTION À APHANOMYCES ASTACI (PESTE DE L'ÉCREVISSE) (APHANOMYCES ASTACI)

Article 9.1.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « ~~peste de l'écrevisse~~ infection à *Aphanomyces astaci* » désigne une *infection* causée par l'agent pathogène un champignon, ~~*A. phanomyces*~~ *Aphanomyces astaci* Schikora Cet organisme appartient à un sous-groupe courant de la classe des Oomycètes de la famille des Leptolegniaceae et de l'embranchement des Oomycota (champignons essentiellement aquatiques), les oomycètes. La maladie est communément dénommée « peste de l'écrevisse ». Le chapitre correspondant du *Manuel aquatique* contient les synonymes couramment utilisés pour désigner cette *infection* fongique.

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.1.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent à toutes les espèces d'écrevisses appartenant aux familles des Cambaridae, Astacidae et Parastacidae. Ces recommandations s'appliquent également à toute autre *espèce sensible* mentionnée dans le *Manuel aquatique*, lorsqu'elle fait l'objet d'échanges commerciaux internationaux. aux espèces sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre 1.5. : l'écrevisse à pieds rouges (*Astacus astacus*), l'écrevisse à pattes grêles (*Astacus leptodactylus*), l'écrevisse signal (*Pacifastacus leniusculus*), l'écrevisse rouge de marais (*Procambarus clarkii*), l'écrevisse *Austropotamobius torrentium*, l'écrevisse *Astacus pallipes*, l'écrevisse américaine (*Orconectes limosus*), l'écrevisse *Orconectes immunis*, l'écrevisse *Procambarus alloni* et le crabe *Potamon potamios*; à la totalité des écrevisses classées en trois familles (*Cambaridae*, *Astacidae* et *Parastacidae*). Ces recommandations concernent également toutes les autres *espèces sensibles* à la peste de l'écrevisse visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.1.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de peste de l'écrevisse et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *A. astaci*

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *A. astaci* la peste de l'écrevisse, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à *A. astaci* ~~cette maladie~~ quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur *territoire* des *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.1.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base d'écrevisses stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du champignon *A. astaci*) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base d'écrevisses ayant subi un traitement thermique à 100 °C pendant au moins une minute ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du champignon *A. astaci* ;
 - c) produits pasteurisés à base d'écrevisses ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant dix minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du champignon *A. astaci* ;
 - d) produits congelés à base d'écrevisses ayant été soumis à des températures inférieures ou égales à - 20 °C pendant 72 heures au moins ;
 - e) huile d'écrevisse ;
 - f) farines d'écrevisse ;
 - g) chitine extraite par un procédé chimique.

Annexe 9 (suite)

- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire ~~d'animaux aquatiques et ou~~ de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.1.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.1.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.1.7. à 9.1.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *A. astaci* la peste de l'écrevisse.
- 3) L'*Autorité compétente* doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire ~~d'animaux aquatiques et ou~~ de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 9.1.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un ~~risque en termes de propagation de d'infection à de transmission d'*A. astaci* la peste de l'écrevisse~~. L'*Autorité compétente* du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Article 9.1.4.

Pays indemne d'infection à *A. astaci* de la peste de l'écrevisse

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection à *A. astaci* de la peste de l'écrevisse* que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.1.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse* si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.1.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.1.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence ~~de la maladie d'infection à *A. astaci*~~ n'a été observée depuis au moins 25 ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins dix ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de ~~la l'infection à *A. astaci* maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins cinq ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins cinq ans sans que la présence de ~~l'infection à d'*A. astaci* peste de l'écrevisse~~ ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse*, a perdu son statut indemne par suite de la détection ~~d'une telle maladie d'*A. astaci*~~ mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection ~~d'*A. astaci* de la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de ont été détruites ou éliminées~~ la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission d'*A. astaci*, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et

- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication ~~de la maladie de l'infection à *A. astaci*~~, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins cinq ans sans que la présence ~~d'infection à d'*A. astaci* de peste de l'écrevisse~~ ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone indemne*, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.1.5. soient remplies.

Article 9.1.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente* ~~du pays concerné de ce pays ou par l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées~~ si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.1.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.1.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence d'*infection à *A. astaci* la maladie* n'a été observée depuis au moins 25 ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins dix ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de *l'infection à *A. astaci* la maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins cinq ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins cinq ans sans que la présence ~~d'infection à d'*A. astaci* de peste de l'écrevisse~~ ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* ~~d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse~~ pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection ~~d'une telle maladie d'*A. astaci*~~ dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection d'~~*A. astaci* de la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission d'*A. astaci*, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et

Annexe 9 (suite)

- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection à *A. astaci* la maladie, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins cinq ans sans que la présence d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse ait été décelée.

Article 9.1.6.

Maintien du statut indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.1.4. ou 9.1.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette *maladie*, sous réserve que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.1.4. ou 9.1.5. peut interrompre la *surveillance ciblée* tout en conservant son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de l'infection à *A. astaci* la peste de l'écrevisse comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique* soient réunies et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les *zones* ou *compartiments* déclarés indemnes d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse qui se trouvent dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la *surveillance ciblée* doit être poursuivie à un niveau défini par le *Service chargé de la santé des animaux aquatiques* en rapport avec la probabilité d'introduction de *l'infection*.

Article 9.1.7.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.1.2. et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente* du *pays exportateur*, ou par un *agent certificateur* agréé par le *pays importateur*. Le *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* et attestant doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* et ou des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse sur la base des procédures prévues par les articles 9.1.4. ou 9.1.5., selon le cas, et par l'article 9.1.6.

Le *certificat* sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.1.3.

Article 9.1.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.1.2. à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce *risque*: conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du *risque* figurant aux alinéas 21 et 32 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la *sécurité biologique* en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et

- b) le traitement de l'eau de transport, ~~de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver *A. astaci* (conformément aux chapitres 4.3, 4.7, et 5.5).~~;

OU

- 2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : http://www.ices.dk/publications/our_publications/Pages/Miscellaneous.aspx) peuvent se résumer comme suit :

a) dans le pays exportateur :

- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
- ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection à *A. astaci* ;

b) dans le pays importateur :

- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche d'*A. astaci* conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection à *A. astaci* (tels que décrits au chapitre 2.2.1. du Manuel aquatique) et tester la présence d'*A. astaci* chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
 - v) si la présence d'*A. astaci* n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection à *A. astaci* et libérée de sa quarantaine ;
 - vi) si la présence d'*A. astaci* est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
 - b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
 - c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence d'*A. astaci* ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;
 - e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;
 - f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence d'*A. astaci* et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - g) si ni la présence d'*A. astaci* ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
 - h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.

Annexe 9 (suite)

- 4) ~~Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e) du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.~~

~~Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.1.3.~~

Article 9.1.9.

Importation d'animaux aquatiques ~~et~~ ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.1.2. et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.1.3. soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.1.11. ou soit en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *A. astaci* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles ;
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *A. astaci* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.1.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

Lors de l'importation d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.1.2. ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.1.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *A. astaci* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles ;
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *A. astaci* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.1.3.

Article 9.1.11.

Importation (ou transit) ~~d'animaux aquatiques et ou~~ de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *A. astaci* ~~la peste de l'écrevisse~~, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à ~~cette maladie *A. astaci*~~ quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur *territoire* des *marchandises produits issus d'animaux aquatiques* suivantes qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'~~ils~~ ~~elles~~ satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2. :
 - aucune *marchandise produit issu d'animaux aquatiques* n'est listée.
- 2) Lors d'une importation ~~d'animaux aquatiques et ou~~ de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.1.2., à l'exclusion de ceux énumérés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne ~~d'infection à *A. astaci* de peste de l'écrevisse~~, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé ~~au type de marchandise produit issu d'animaux aquatiques~~ susvisé et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.2.

INFECTION PAR LE GÉNOTYPE 1 DU VIRUS DE LA TÊTE JAUNE

Article 9.2.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune » désigne une infection causée par le génotype 1 du virus de la tête jaune ; il s'agit d'un *agent pathogène* appartenant au genre *Okavirus*, à la famille des *Roniviridae* et à l'ordre des *Nidovirales*, à la famille des *Roniviridae* et au genre *Okavirus*, et appartenant au genre *Okavirus*, à la famille des *Roniviridae* et à l'ordre des *Nidovirales*.

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.2.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : la crevette Jinga (*Metapenaeus affinis*), la crevette géante tigrée (*Penaeus monodon*), la crevette *Palaemonetes pugio*, la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*) et la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*) la crevette géante tigrée (*Penaeus monodon*), la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*), la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), la crevette *Palaemonetes pugio* et la crevette Jinga (*Metapenaeus affinis*).

Article 9.2.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette infection au génotype 1 du virus de la tête jaune quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.2.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du génotype 1 du virus de la tête jaune) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant 15 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du génotype 1 du virus de la tête jaune ;
 - c) produits pasteurisés à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant dix minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du génotype 1 du virus de la tête jaune ;
 - d) huile de crustacés ;
 - e) farines de crustacés ;
 - f) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.2.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.2.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.2.7. à 9.2.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune.

Annexe 10 (suite)

- 3) L'*Autorité compétente* doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son ~~territoire d'animaux aquatiques et ou~~ de produits issus d'*animaux aquatiques* appartenant à une espèce non visée à l'article 9.2.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un *risque de transmission du d'infection par le* génotype 1 du virus de la tête jaune. L'*Autorité compétente* du *pays exportateur* doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Article 9.2.4.

Pays indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

En cas de partage d'une *zone* avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence* d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou *zones* indemnes de cette ~~infection~~ maladie (voir article 9.2.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence* d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.2.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.2.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de la ~~maladie~~ d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de la ~~maladie~~ l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune n'était pas connu avant la mise en œuvre d'une *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans ~~qu'aucune infection par que~~ la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, a perdu son statut indemne ~~de maladie~~ par suite de la détection d'une telle ~~infection~~ du génotype 1 du virus de la tête jaune mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection de la ~~maladie~~ du génotype 1 du virus de la tête jaune, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées touchées par l'infection de ~~ont été détruites ou éliminées~~ la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du génotype 1 du virus de la tête jaune ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de la ~~maladie~~ l'infection par le génotype du virus de la tête jaune, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans ~~qu'aucune infection par que~~ le génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré zone indemne, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.2.5. soient remplies.

Article 9.2.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune peut être déclaré indemne de cette *infection* par l'*Autorité compétente* du pays concerné si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.2.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.2.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de la ~~maladie~~ d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de la ~~maladie~~ l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans ~~qu'aucune infection par~~ que la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune pour une *zone*, a perdu son statut indemne ~~de maladie~~ par suite de la détection du génotype 1 du virus de la tête jaune d'une telle infection dans cette *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection du génotype 1 du virus de la tête jaune de la ~~maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission de l'infection par le du génotype 1 du virus de la tête jaune, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de la ~~maladie~~ l'infection par le génotype du virus de la tête jaune, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans ~~qu'aucune infection par~~ que la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été décelée.

Annexe 10 (suite)

Article 9.2.6.

Maintien du statut indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.2.4. ou 9.2.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette *infection maladie*, sous réserve que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.2.4. ou 9.2.5. peut interrompre la *surveillance ciblée* tout en conservant son statut indemne au regard de cette *infection*, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique des infections de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, soient réunies et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les *zones* ou *compartiments* déclarés indemnes d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la *surveillance ciblée* doit être poursuivie à un niveau défini par le *Service chargé de la santé des animaux aquatiques* en rapport avec la probabilité d'introduction de l'*infection*.

Article 9.2.7.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.2.2. et ou de *produits issus d'animaux aquatiques* qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'*Autorité compétente du pays importateur* doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente du pays exportateur*, ou par un *agent certificateur* agréé par le *pays importateur*. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques et attestant doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* et ou des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune sur la base des procédures prévues par les articles 9.2.4. ou 9.2.5., selon le cas, et par l'article 9.2.6.

CeLe *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises produits issus d'animaux aquatiques* énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.2.3.

Article 9.2.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.2.2. à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'*Autorité compétente du pays importateur* doit apprécier le *risque* associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce *risque* : conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du *risque* figurant aux alinéas 21 et 32 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques importés*, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) ~~la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine,~~ et
- b) ~~le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver~~ le génotype 1 du virus de la tête jaune (conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5.).

OU

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants. Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :

a) dans le pays exportateur :

- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
- ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune ;

b) dans le pays importateur :

- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche du génotype 1 du virus de la tête jaune conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune (tels que décrits au chapitre 2.2.2. du Manuel aquatique) et tester la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
 - v) si la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune et libérée de sa quarantaine ;
 - vi) si la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
- b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
- c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;
- e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;
- f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- g) si ni la présence du génotype 1 du virus de la tête jaune ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
- h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.

3) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.2.3.

Annexe 10 (suite)

Article 9.2.9.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.2.2., et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'*Autorité compétente du pays importateur* doit apprécier le *risque* associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.2.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.2.11. ou, soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le génotype 1 du virus de la tête jaune ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le génotype 1 du virus de la tête jaune ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de marchandise aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.2.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.2.2., ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'*Autorité compétente du pays importateur* doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.2.3. ou en l'un des autres des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'de manière à inactiver le génotype 1 du virus de la tête jaune ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le génotype 1 du virus de la tête jaune ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.2.3.

Article 9.2.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette infection au génotype 1 du virus de la tête jaune quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur territoire de crevettes ou de crustacés décapodes congelés et décortiqués (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparés et emballés pour la vente au détail lorsqu'ils satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Annexe 10 (suite)

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des *produits issus d'animaux aquatiques* susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de *merchandise* aux *produits issus d'animaux aquatiques* susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation ~~d'animaux aquatiques ou~~ de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à ~~des~~ une espèce visée à l'article 9.2.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé au type de *merchandise* susvisé et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.3.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HYPODERMIQUE ET HÉMATOPOÏÉTIQUE INFECTIEUSE

Article 9.3.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » désigne une *infection* causée par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse : il s'agit d'un ~~Ce virus est classé en tant qu'espèce dénommée *Penaeus stylirostris densovirus*, agent pathogène appartenant au genre *Brevidensovirus* et à la famille des Parvoviridae, et au genre *Brevidensovirus* au dans le genre *Brevidensovirus* et dans, dans la famille des *Parvoviridae*.~~

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.3.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5 : le bouquet géant (*Macrobrachium rosenbergii*), la crevette à pattes jaunes (*Penaeus californiensis*), la crevette géante tigrée (*Penaeus monodon*), la crevette ligubam du Nord (*Penaeus setiferus*), la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*) et la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*) à la crevette tigrée géante tigrée (*Penaeus monodon*), à la crevette à pattes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*), et à la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), la crevette à pattes jaunes (*Penaeus californiensis*), la crevette ligubam du Nord (*Penaeus setiferus*) et le bouquet géant (*Macrobrachium rosenbergii*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.3.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie au virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.3.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant 20 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ;
 - c) huile de crustacés ;
 - d) farines de crustacés.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.3.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.3.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.3.7. à 9.3.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse.
- 3) L'*Autorité compétente* doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 9.3.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque de transmission du en termes de propagation d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse. L'*Autorité compétente* du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Annexe 11 (suite)

Article 9.3.4.

Pays indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.3.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.3.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.3.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de la ~~maladie~~ *d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de la ~~maladie~~ *d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence ~~de l'infection par le virus de la~~ *d'infection par le virus de la* nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse*, a perdu son statut indemne par suite de la détection ~~d'une telle maladie~~ *du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection ~~du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse de la maladie~~ *du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de ont été détruites ou éliminées~~ *infectées ont été abattues et éliminées* par des moyens réduisant autant que possible ~~la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de~~ *la probabilité de nouvelle propagation du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse* ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de ~~la maladie~~ *l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse*, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence ~~de l'infection par le virus de la~~ *d'infection par le virus de la* nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone indemne*, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.3.5. soient remplies.

Article 9.3.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente de ce du pays concerné* ou par l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.3.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans :

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.3.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de ~~la maladie~~ d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de ~~la maladie~~ l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence ~~de l'infection par le~~ du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la* nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection ~~de cette maladie~~ du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ~~de la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse propagation de la maladie, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de ~~la maladie~~ l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence ~~de l'infection par le~~ du virus de la de nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ait été décelée.

Annexe 11 (suite)

Article 9.3.6.

Maintien du statut indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.3.4. ou 9.3.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.3.4. ou 9.3.5. peut interrompre la surveillance ciblée tout en conservant son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse comme indiqué au chapitre correspondant du Manuel aquatique soient réunies et que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les zones ou compartiments déclarés indemnes d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la surveillance ciblée doit être poursuivie à un niveau défini par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques en rapport avec la probabilité d'introduction de l'infection.

Article 9.3.7.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

Lors d'une importation d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.3.2. et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur, ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit attester et attestant que le lieu de production des animaux aquatiques et ou des produits issus d'animaux aquatiques est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse sur la base des procédures prévues par les articles 9.3.4. ou 9.3.5., selon le cas, et par l'article 9.3.6.

CeLe certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.3.3.

Article 9.3.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.3.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce risque : conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du risque figurant aux alinéas 21 et 32 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5.) ;

OU

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

- 32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du *Code aquatique*, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :
- a) dans le pays exportateur :
- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ;
- b) dans le pays importateur :
- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche du génotype 1 du virus de la tête jaune conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (tels que décrits au chapitre 2.2.3. du Manuel aquatique) et tester la présence du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
 - v) si la présence du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse et libérée de sa quarantaine ;
 - vi) si la présence du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
- b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
- c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;
- e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;
- f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- g) si ni la présence du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ou de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
- h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.
- 4) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.3.3.

Annexe 11 (suite)

Article 9.3.9.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.3.2., et ou de produits qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.3.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.3.11. ou, soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques marchandise susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.3.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.3.2., ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.1.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.3.3.

Article 9.3.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie au virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur *territoire* de crevettes congelées et décortiquées (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des *produits issus d'animaux aquatiques* susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de *marchandise aux produits issus d'animaux aquatiques* susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation *d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à *des une* espèces visées à l'article 9.3.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne *d'infection par le virus de la* nécrose hypodermique et hématoïétique infectieuse, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé *au type de marchandise susvisée* et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.4.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA MYONÉCROSE INFECTIEUSE

Article 9.4.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus de la myonécrose infectieuse » désigne une *infection* causée par le virus de la myonécrose infectieuse ; il s'agit d'un Ce virus agent pathogène qui présente des similitudes avec les membres de appartenant à la famille des Totiviridae (une tentative de classification).

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.4.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : la crevette tigrée brune (*Penaeus esculentus*), la crevette banana (*Penaeus merguensis*) et à la crevette à pattes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.4.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de myonécrose infectieuse et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette *maladie* quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur *territoire* des *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.4.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus de la myonécrose infectieuse) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant trois minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus de la myonécrose infectieuse ;
 - c) huile de crustacés ;
 - d) farines de crustacés ;
 - e) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* d'animaux aquatiques et ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à une espèce visée à l'article 9.4.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.4.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.4.7. à 9.4.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse.
- 3) L'*Autorité compétente* doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son *territoire* d'animaux aquatiques et ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à une espèce non visée à l'article 9.4.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un *risque en termes de propagation de d'infection par de transmission du le virus de* la myonécrose infectieuse. L'*Autorité compétente* du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Annexe 12 (suite)

Article 9.4.4.

Pays indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse* que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.4.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse* si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.4.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.4.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de ~~la maladie d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de ~~la maladie~~ l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus de la myonécrose infectieuse ~~d'une telle maladie~~ mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection du virus de la myonécrose infectieuse ~~de la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du virus de la myonécrose infectieuse ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ~~la maladie~~, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence du d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone indemne*, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.4.5. soient remplies.

Article 9.4.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente du pays concerné de ce pays ou par l'ensemble des Autorités compétentes concernées* si :

1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.4.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans :

OU

2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.4.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

a) aucune présence de ~~la maladie~~ d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et

b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

3) le statut sanitaire au regard de ~~la maladie~~ l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et

b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ait été décelée ;

OU

4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse* pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus de la myonécrose infectieuse d'une telle maladie dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

a) dès la détection du virus de la myonécrose infectieuse ~~la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et

b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du virus de la myonécrose infectieuse ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et

c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de ~~la maladie~~ l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, et

d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ait été décelée.

Annexe 12 (suite)

Article 9.4.6.

Maintien du statut indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.4.4. ou 9.4.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.4.4. ou 9.4.5. peut interrompre la surveillance ciblée tout en conservant son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse comme indiqué au chapitre correspondant du Manuel aquatique et que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les zones ou compartiments déclarés indemnes d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la surveillance ciblée doit être poursuivie à un niveau défini par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques en rapport avec la probabilité d'introduction de l'infection.

Article 9.4.7.

Importation d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

Lors d'une importation d'animaux aquatiques et appartenant à des une espèce visées à l'article 9.4.2. ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur, ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques et attestant doit attester que le lieu de production des animaux aquatiques et/ou des produits issus d'animaux aquatiques est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse sur la base des procédures prévues par les articles 9.4.4. ou 9.4.5., selon le cas, et par l'article 9.4.6.

Ce Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.4.3.

Article 9.4.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

4) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèce visées à l'article 9.4.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce risque : conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du risque figurant aux alinéas 21 et 32 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver le virus de la myonécrose infectieuse (conformément aux chapitres 4.3, 4.7. et 5.5.).

OU

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

- 32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :
- a) dans le pays exportateur :
 - i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ;
 - b) dans le pays importateur :
 - i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche du virus de la myonécrose infectieuse conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse (tels que décrits au chapitre 2.2.4. du Manuel aquatique) et tester la présence du virus de la myonécrose infectieuse chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
 - v) si la présence du virus de la myonécrose infectieuse n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse et libérée de sa quarantaine ;
 - vi) si la présence du virus de la myonécrose infectieuse est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
 - a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
 - b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
 - c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence virus de la myonécrose infectieuse ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;
 - e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;
 - f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence du virus de la myonécrose infectieuse et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - g) si ni la présence virus de la myonécrose infectieuse ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de peste de l'écrevisse ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
 - h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.
- 4) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.4.3.

Article 9.4.9.

Importation d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'animaux aquatiques appartenant à des espèces visées à l'article 9.4.2., et/ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.4.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.4.11. ou, soit en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et

Annexe 12 (suite)

- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la myonécrose infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la myonécrose infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise susvisé aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.4.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

Lors de l'importation d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.4.2. et ou de produits qui en sont issus, qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.4.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la myonécrose infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus de la myonécrose infectieuse ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.4.3.

Article 9.4.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie au virus de la myonécrose infectieuse quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur territoire de crevettes congelées et décortiquées (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des produits issus d'animaux aquatiques susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Annexe 12 (suite)

- 2) Lors d'une importation ~~d'animaux aquatiques et ou~~ de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des espèces visées à l'article 9.4.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1, ci-dessus à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé ~~au type de marchandise susvisée~~ et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.5.

**INFECTION À HEPATOBACTER PENAEI
(HÉPATOPANCRÉATITE NÉCROSANTE)**

Article 9.5.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « ~~hépatopancréatite nécrosante~~ infection à *Hepatobacter penaei* » désigne une infection causée par l'agent pathogène *Candidatus Hepatobacter penaei* ; il s'agit d'une ~~Cette~~ bactérie intracellulaire obligatoire fait faisant partie de l'ordre des alpha-protéobactéries. La maladie est communément dénommée « hépatopancréatite nécrosante ».

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.5.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : à la crevette à pattes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*), à la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), à la crevette ligabam du Nord (*Penaeus setiferus*) et à la crevette royale grise (*Penaeus aztecus*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles à l'hépatopancréatite nécrosante visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.5.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'hépatopancréatite nécrosante et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *H. penaei*

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *H. penaei* ~~l'hépatopancréatite nécrosante~~, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à ~~cette maladie *H. penaei*~~ quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.5.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *Candidatus Hepatobacter penaei*) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 100 °C pendant trois minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *Candidatus Hepatobacter penaei* ;
 - c) produits pasteurisés à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 63 °C pendant 30 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *Candidatus Hepatobacter penaei* ;
 - d) huile de crustacés ;
 - e) farines de crustacés ;
 - f) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.5.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.5.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.5.7. à 9.5.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *H. penaei* ~~l'hépatopancréatite nécrosante~~.

Annexe 13 (suite)

- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire ~~d'animaux aquatiques et ou~~ de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 9.5.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un ~~risque en termes de propagation de de transmission de d'infection à *H. penaei*~~ risque de propagation de de transmission de d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Article 9.5.4.

Pays indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante* que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.5.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante* si :

- 1) aucune des espèces sensibles visées à l'article 9.5.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des espèces sensibles visées à l'article 9.5.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de la ~~maladie d'infection à *H. penaei*~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de la ~~maladie~~ l'infection à *H. penaei* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence ~~d'infection à de *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante~~ ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante*, a perdu son statut indemne par suite de la détection de *H. penaei* d'une telle maladie, mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection de *H. penaei* la maladie, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission de *H. penaei* ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de ~~la maladie~~ l'infection à *H. penaei*, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence ~~d'infection à de *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante~~ ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré zone indemne, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.5.5. soient remplies.

Article 9.5.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'hépatopancréatite nécrosante que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente du pays concerné* de ce pays ou par l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.5.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.5.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de d'infection à *H. penaei* la maladie n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection à *H. penaei* la maladie n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection à de *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante* pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection de *H. penaei* d'une telle maladie dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection de *H. penaei* la maladie, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées touchées par l'infection de ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission de *H. penaei* propagation de la *maladie*, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection à *H. penaei* la maladie, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection à de *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante ait été décelée.

Annexe 13 (suite)

Article 9.5.6.

Maintien du statut indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.5.4. ou 9.5.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.5.4. ou 9.5.5. peut interrompre la surveillance ciblée tout en conservant son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de l'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante comme indiqué au chapitre correspondant du Manuel aquatique soient réunies et que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les zones ou compartiments déclarés indemnes d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la surveillance ciblée doit être poursuivie à un niveau défini par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques en rapport avec la probabilité d'introduction de l'infection.

Article 9.5.7.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

Lors d'une importation d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.5.2. et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur, ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques et attestant doit attester que le lieu de production des animaux aquatiques et ou des produits issus d'animaux aquatiques est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante sur la base des procédures prévues par les articles 9.5.4. ou 9.5.5., selon le cas, et par l'article 9.5.6.

Ce Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.5.3.

Article 9.5.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.5.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce risque : conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du risque figurant aux alinéas 21 et 32 ci-dessous.

1) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver *H. penaei* (conformément aux chapitres 4.3, 4.7. et 5.5.) ;

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

OU

- 32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du *Code aquatique*, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :
- a) dans le pays exportateur :
- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection à *H. penaei* ;
- b) dans le pays importateur :
- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche de *H. penaei* conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection à *H. penaei* (tels que décrits au chapitre 2.2.5. du *Manuel aquatique*) et tester la présence de *H. penaei* chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
 - v) si la présence de *H. penaei* n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection à *H. penaei* et libérée de sa quarantaine ;
 - vi) si la présence de *H. penaei* est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la *sécurité biologique* en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, et
- b) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver *Candidatus Hepatobacter penaei*.
- 2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).
- 3) Aux fins de l'application du *Code aquatique*, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
 - b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
 - c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence de *Candidatus Hepatobacter penaei* et celle de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - d) importer une population de géniteurs (F 0) et la mettre en *quarantaine* dans une installation sécurisée ;
 - e) produire une génération F 1 à partir de la population F 0 mise en *quarantaine* ;
 - f) élever la population F 1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence de *Candidatus Hepatobacter penaei* et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - g) si ni la présence de *Candidatus Hepatobacter penaei* ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F 1 pourra être reconnue indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
 - h) sortir de *quarantaine* la population F 1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.
- 4) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de *quarantaine* doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de *quarantaine* ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.5.3.

Annexe 13 (suite)

Article 9.5.9.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.5.2. vivants et, ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à ce type de *marchandise* et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.5.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.5.11. ou, soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *Candidatus *H. epatobacter penaei** ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *H. penaei* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de marchandise des animaux aquatiques et des produits issus d'animaux aquatiques et de susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.5.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.5.2., et ou de produits qui en sont issus, qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.5.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *Candidatus *H. epatobacter penaei** ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *Candidatus *H. epatobacter penaei** ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.5.3.

Article 9.5.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie *H. penaei* quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur *territoire* de crevettes congelées et décortiquées (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des *produits issus d'animaux aquatiques* susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de marchandise des produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'animaux aquatiques et ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.5.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection à *H. penaei* d'hépatopancréatite nécrosante, l'*Autorité compétente du pays importateur* doit apprécier le *risque* associé au type de marchandise susvisée et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.6.

INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME DE TAURA

Article 9.6.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus du syndrome de Taura » désigne une infection causée par le virus du syndrome de Taura. ~~Ce virus est classé parmi les espèces; il s'agit d'un agent pathogène appartenant au genre *Aparavirus*, à la famille des Dicistroviridae et à l'ordre des Picornavirales au genre *Aparavirus*, dans à la famille des Dicistroviridae.~~ Le chapitre correspondant du *Manuel aquatique* contient les synonymes couramment utilisés pour désigner cette maladie.

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.6.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : la crevette glissante (*Metapenaeus ensis*), la crevette royale grise (*Penaeus aztecus*), la crevette géante tigrée (*Penaeus monodon*), la crevette ligubam du Nord (*Penaeus setiferus*), la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*) et la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*), ~~à la crevette blanche du Pacifique ou crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*), à la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), à la crevette ligubam du Nord (*Penaeus setiferus*), à la crevette ligubam du Sud (*Penaeus schmitti*), à la crevette glissante (*Metapenaeus ensis*), et à la crevette géante tigrée géante (*Penaeus monodon*) et la crevette royale grise (*Penaeus aztecus*).~~ Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.6.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de syndrome de Taura et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie au virus du syndrome de Taura quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.6.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus du syndrome de Taura) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 70 °C pendant 30 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus du syndrome de Taura ;
 - c) produits à base de crustacés pasteurisés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant dix minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus du syndrome de Taura ;
 - d) huile de crustacés ;
 - e) farines de crustacés ;
 - f) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.6.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.6.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.6.7. à 9.6.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura.

Annexe 14 (suite)

- 3) L'*Autorité compétente* doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 9.6.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation d'infection par le virus du syndrome de Taura. L'*Autorité compétente* du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Article 9.6.4.

Pays indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence de d'infection par le virus du syndrome de Taura* que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.6.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence de d'infection par le virus du syndrome de Taura* si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.6.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.6.2. est présente mais les conditions suivantes existent :

- a) aucune présence d'infection par le virus du syndrome de Taura ~~la maladie~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura ~~la maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence de d'infection par le virus du syndrome de Taura ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence de l'infection par le virus du syndrome de Taura*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du syndrome de Taura ~~d'une telle maladie~~ mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection ~~de du virus du syndrome de Taura~~ ~~la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ~~ont été détruites ou éliminées~~ la *zone infectée* ~~ont été abattues et éliminées~~ par des moyens réduisant autant que possible la ~~probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de~~ nouvelle transmission du virus du syndrome de Taura ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du syndrome de Taura ~~la maladie~~, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence de d'infection par le virus du syndrome de Taura ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone indemne*, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.6.5. soient remplies.

Article 9.6.5.

Compartiment ou zone indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes de d'infection par le virus du syndrome de Taura peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente de ce pays ou par du pays concerné* l'ensemble des *Autorités compétentes concernées* si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.6.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.6.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de d'infection par le virus du syndrome de Taura la *maladie* n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence de du virus du syndrome de Taura ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence de d'infection par le virus du syndrome de Taura* pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection de du virus du syndrome de Taura d'une telle *maladie* dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection de du virus du syndrome de Taura la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées touchées par l'infection de ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la *probabilité* le *risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du virus du syndrome de Taura* propagation de la *maladie*, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du syndrome de Taura la *maladie*, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence de d'infection par le virus du syndrome de Taura ait été décelée.

Article 9.6.6.

Maintien du statut indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.6.4. ou 9.6.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette *maladie*, sous réserve que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Annexe 14 (suite)

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.6.4. ou 9.6.5. peut interrompre la *surveillance ciblée* tout en conservant son statut indemne ~~au regard de cette maladie~~, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique ~~de~~ d'infection par le virus du syndrome de Taura comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique* ~~soient réunies~~ et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les zones ou compartiments déclarés indemnes de d'infection par le virus du syndrome de Taura se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la *surveillance ciblée* doit être poursuivie à un niveau défini par le *Service chargé de la santé des animaux aquatiques* en rapport avec la probabilité d'introduction de l'*infection*.

Article 9.6.7.

Importation d'animaux aquatiques ~~et~~ ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne ~~de~~ d'infection par le virus du syndrome de Taura

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à ~~des~~ des espèces visées à l'article 9.6.2. ~~et~~ ou de *produits issus d'animaux aquatiques* ~~qui en sont issus~~, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne ~~de~~ d'infection par le virus du syndrome de Taura, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente* du pays exportateur, ou par un *agent certificateur* agréé par le pays importateur. Le *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* et attestant doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* et des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne ~~de~~ d'infection par le virus du syndrome de Taura sur la base des procédures prévues par les articles 9.6.4. ou 9.6.5., selon le cas, et par l'article 9.6.6.

Ce ~~Le~~ *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux merchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.6.3.

Article 9.6.8.

Importation d'animaux aquatiques ~~vivants~~ à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne ~~de~~ d'infection par le virus du syndrome de Taura

4) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'*animaux aquatiques* ~~vivants~~ appartenant à ~~des~~ des espèces visées à l'article 9.6.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome de Taura, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé au type de merchandise susvisé et, si la situation le justifie, ~~appliquer les mesures ci après afin de réduire ce risque:~~ conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du *risque* figurant aux alinéas 21 et 32 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) ~~la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la *sécurité biologique* en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et~~
- b) ~~le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver le virus du syndrome de Taura (conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5.) ;~~

OU

~~2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).~~

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du *Code aquatique*, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : http://www.ices.dk/publications/our_publications/Pages/Miscellaneous.aspx) peuvent se résumer comme suit :

a) dans le pays exportateur :

- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des *animaux aquatiques* qui les composent ;
- ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de *générateurs* (F-0) d'*animaux aquatiques* présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'*infection par le virus du syndrome de Taura* ;

b) dans le pays importateur :

- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
- ii) tester la population F-0 en vue de la recherche du virus du syndrome de Taura conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
- iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
- iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par le virus du syndrome de Taura (tels que décrits au chapitre 2.2.6. du Manuel aquatique) et tester la présence du virus du syndrome de Taura chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
- v) si la présence du virus du syndrome de Taura n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le virus du syndrome de Taura et libérée de sa quarantaine ;
- vi) si la présence du virus du syndrome de Taura est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.

- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
- b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
- c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence du virus du syndrome de Taura ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;
- e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;
- f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence du virus du syndrome de Taura et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- g) si ni la présence du virus du syndrome de Taura ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de l'infection par le virus du syndrome de Taura ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
- h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.

- 3) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.6.3.

Article 9.6.9.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.6.2. et, ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.6.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.6.11. ou, soit en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome de Taura ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome de Taura ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Annexe 14 (suite)

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.6.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.6.2., ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.6.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome de Taura ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome de Taura ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.6.3.

Article 9.6.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard du de l'infection par le virus du syndrome de Taura, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie au virus du syndrome de Taura quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur territoire de crevettes ou de crustacés décapodes congelés et décortiqués (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparés et emballés pour la vente au détail lorsqu'ils satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des *produits issus d'animaux aquatiques* susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'animaux aquatiques et ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.6.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de d'infection par le virus du syndrome de Taura, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.7.

INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME MALADIE DES POINTS BLANCS

Article 9.7.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus du syndrome maladie des points blancs » désigne une *infection* causée par le virus 1 du syndrome des points blancs ; il s'agit d'un agent pathogène appartenant au genre *Whispovirus* et à la famille des Nimaviridae. Ce virus est classé parmi les espèces appartenant au genre *Whispovirus* et à la famille des Nimaviridae. Le chapitre correspondant du *Manuel aquatique* contient les synonymes couramment utilisés pour désigner cette maladie.

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.7.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent à tous les crustacés décapodes (ordre *Decapoda*) vivant en eau de mer, en eau saumâtre ou en eau douce. Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.7.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie des points blancs

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie des points blancs, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée au virus du syndrome des points blancs à cette maladie quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.7.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus du syndrome des points blancs) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant une minute au moins ou à une combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus du syndrome des points blancs ;
 - c) produits pasteurisés à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant dix minutes au moins ou à une combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du virus du syndrome des points blancs ;
 - d) huile de crustacés ;
 - e) farines de crustacés ;
 - f) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.7.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.7.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.7.7. à 9.7.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie des points blancs.

Annexe 15 (suite)

- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire d'animaux aquatiques ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 9.7.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de transmission du virus du syndrome des points blancs propagation de la maladie des points blancs. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Article 9.7.4.

Pays indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie des points blancs

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie des points blancs* que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette maladie (voir article 9.7.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie des points blancs* si :

- 1) aucune des espèces sensibles visées à l'article 9.7.2. n'est présente et les conditions élémentaires de sécurité biologique existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des espèces sensibles visées à l'article 9.7.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence d'infection par le virus du syndrome des points blancs de la maladie n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du Manuel aquatique, et
- b) les conditions élémentaires de sécurité biologique existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie n'était pas connu avant la mise en œuvre de la surveillance ciblée mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les conditions élémentaires de sécurité biologique existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une surveillance ciblée comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence du virus du syndrome des points blancs de maladie des points blancs ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du syndrome des points blancs maladie des points blancs*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du syndrome des points blancs d'une telle maladie mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection du virus du syndrome des points blancs de la maladie, le secteur touché a été déclaré zone infectée et une zone de protection a été établie, et
- b) les populations infectées touchées par l'infection de ont été détruites ou éliminées la zone infectée ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du virus du syndrome des points blancs propagation de la maladie, et les opérations de désinfection appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les conditions élémentaires de sécurité biologique existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du syndrome des points blancs la maladie, et
- d) une surveillance ciblée comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence du virus du syndrome des points blancs de maladie des points blancs ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré zone indemne, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.7.5. soient remplies.

Article 9.7.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs ~~la maladie des points blancs~~

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs ~~maladie des points blancs~~ que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou d'un ensemble de pays non déclarés indemnes d'infection par le virus du syndrome des points blancs ~~maladie des points blancs~~ peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente du pays concerné* ~~de ce pays ou par l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées~~ si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.7.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.7.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence d'infection par le virus du syndrome des points blancs ~~la maladie~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection par le virus du syndrome des points blancs ~~la maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence du virus du syndrome des points blancs ~~de maladie des points blancs~~ ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* d'infection par le virus du syndrome des points blancs ~~maladie des points blancs~~ pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du syndrome des points blancs ~~d'une telle maladie~~ dans cette *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection du virus du syndrome des points blancs ~~de la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité ~~le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du virus du syndrome des points blancs~~ propagation de la maladie, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de la l'infection par le virus du syndrome des points blancs, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence du virus du syndrome des points blancs ~~de maladie des points blancs~~ ait été décelée.

Annexe 15 (suite)

Article 9.7.6.

Maintien du statut indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs maladie des points blancs

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs maladie des points blancs conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.7.4. ou 9.7.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs maladie des points blancs conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.7.4. ou 9.7.5. peut interrompre la surveillance ciblée tout en conservant son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de l'infection par le virus du syndrome des points blancs maladie des points blancs, comme indiqué au chapitre correspondant du Manuel aquatique, soient réunies et que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les zones ou compartiments déclarés indemnes de l'infection par le virus du syndrome des points blancs maladie des points blancs se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la surveillance ciblée doit être poursuivie à un niveau défini par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques en rapport avec la probabilité d'introduction de l'infection.

Article 9.7.7.

Importation d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome maladie des points blancs

Lors d'une importation d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.7.2. et/ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome maladie des points blancs, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur, ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit attester et attester que le lieu de production des animaux aquatiques et/ou des produits issus d'animaux aquatiques est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome maladie des points blancs sur la base des procédures prévues par les articles 9.7.4. ou 9.7.5., selon le cas, et par l'article 9.7.6.

Ce Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.7.3.

Article 9.7.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome maladie des points blancs

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à une des espèces visées à l'article 9.7.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome maladie des points blancs, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce risque: conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du risque figurant aux alinéas 2 1 et 3 2 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver le virus du syndrome des points blancs (conformément aux chapitres 4.3, 4.7. et 5.5.).

OU

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants. Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :

a) dans le pays exportateur :

- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
- ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le virus du syndrome des points blancs;

b) dans le pays importateur :

- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
- ii) tester la population F-0 en vue de la recherche du virus du syndrome des points blancs conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
- iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
- iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par le virus du syndrome des points blancs (tels que décrits au chapitre 2.2.7. du Manuel aquatique) et tester la présence du virus du syndrome des points blancs chez cette population, conformément au chapitre 1.4. ;
- v) si la présence du virus du syndrome des points blancs n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le virus du syndrome des points blancs et libérée de sa quarantaine ;
- vi) si la présence du virus du syndrome des points blancs est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.

a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;

b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;

c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence du virus du syndrome des points blancs ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;

d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;

e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;

f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence du virus du syndrome des points blancs et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;

g) si ni la présence du virus du syndrome des points blancs ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de l'infection par le virus du syndrome des points blancs ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;

h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.

3) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.7.3.

Annexe 15 (suite)

Article 9.7.9.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome-maladie des points blancs

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.7.2. et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome-maladie des points blancs, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé à ce type de *marchandise* et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement et son entreposage dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.7.3. soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.7.11. soit ou en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome des points blancs ou de les éliminer de manière à empêcher leur contact avec des espèces sensibles biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome des points blancs ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de marchandise des animaux aquatiques et des produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.7.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome-maladie des points blancs

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.7.2. ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome-maladie des points blancs, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement et son maintien dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.7.3. ou en l'un des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome des points blancs ou de les éliminer de manière de manière à inactiver biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et le virus du syndrome des points blancs
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du syndrome des points blancs ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.7.3.

Article 9.7.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment au regard à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de l'infection par le virus du syndrome-maladie des points blancs

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome-maladie des points blancs, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée au virus du syndrome des points blancs à cette maladie quand elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de crevettes ou de crustacés décapodes congelés et décortiqués (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparés et emballés pour la vente au détail lorsqu'ils satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité au plan sanitaire des *produits issus d'animaux aquatiques* susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de *marchandise aux produits issus d'animaux aquatiques* susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation *d'animaux aquatiques et ou* de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à *des une* espèces visées à l'article 9.7.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du syndrome maladie des points blancs, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé *au type de marchandise susvisée* et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.8.

**INFECTION PAR LE NODAVIRUS DE
MACROBRACHIUM ROSENBERGII
(MALADIE DES QUEUES BLANCHES)**

Article 9.8.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* maladie des queues blanches » désigne une infection due au nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) ; il s'agit d'un dans la agent pathogène appartenant à la famille des Nodaviridae. Cette maladie est communément dénommée « maladie des queues blanches ». de macrobrachium (MrNV) responsable de la maladie des queues blanches. Ce virus n'a pas encore été classé officiellement.

Le *Manuel aquatique* contient des informations sur les méthodes de *diagnostic*.

Article 9.8.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : à la crevette géante d'eau douce le bouquet géant (*Macrobrachium rosenbergii*). Le *Manuel aquatique* contient les noms courants d'autres espèces. Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

Article 9.8.3.

Importation ou transit d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie des queues blanches et du statut du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* la maladie des queues blanches, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée au nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* à cette maladie quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.8.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant 60 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* la maladie des queues blanches ;
 - c) produits pasteurisés à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant dix minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* la maladie des queues blanches ;
 - d) huile de crustacés ;
 - e) farines de crustacés ;
 - f) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.8.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.8.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.8.7. à 9.8.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* la maladie des queues blanches.

Annexe 16 (suite)

- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire ~~d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques~~ appartenant à une espèce non visée à l'article 9.8.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un *risque en termes de propagation de d'infection par le de transmission du nodavirus de Macrobrachium rosenbergii* ~~la maladie des queues blanches~~. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Article 9.8.4.

Pays indemne d'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii ~~de maladie des queues blanches~~

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~ que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.8.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence d'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~ si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.8.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.8.2. est présente mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence d'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii ~~de la maladie~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii ~~de la maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le du nodavirus de Macrobrachium rosenbergii ~~de maladie des queues blanches~~ ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~, a perdu son statut indemne par suite de la détection du nodavirus de Macrobrachium rosenbergii mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection ~~de du nodavirus de Macrobrachium rosenbergii~~ ~~la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées par l'infection de~~ ~~ont été détruites ou éliminées~~ la *zone infectée* ~~ont été abattues et éliminées~~ par des moyens réduisant autant que possible la *probabilité* ~~le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission du nodavirus de Macrobrachium rosenbergii~~ ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué dans le chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le nodavirus de Macrobrachium rosenbergii ~~la maladie~~, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le du nodavirus de Macrobrachium rosenbergii ~~de maladie des queues blanches~~ ait été décelée.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone indemne*, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.8.5. soient remplies.

Article 9.8.5.

Compartiment ou zone indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~ que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~la maladie des queues blanches~~ ; peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente du pays* ~~de ce pays~~ ou par l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.8.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.8.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~la maladie~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~la maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~ ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii** ~~de maladie des queues blanches~~ pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~d'une telle maladie~~ dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~de la maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées touchées par l'infection de ~~ont été détruites ou éliminées~~ la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la *probabilité* ~~le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission~~ du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~propagation de la maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~la maladie~~, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence d'infection par le du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~ ait été décelée.

Annexe 16 (suite)

Article 9.8.6.

Maintien du statut indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.8.4. ou 9.8.5. peut conserver son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.8.4. ou 9.8.5. peut interrompre la surveillance ciblée tout en conservant son statut indemne au regard de cette maladie, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches comme indiqué au chapitre correspondant du Manuel aquatique soient réunies et que les conditions élémentaires de sécurité biologique soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les zones ou compartiments déclarés indemnes d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la surveillance ciblée doit être poursuivie à un niveau défini par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques en rapport avec la probabilité d'introduction de l'infection.

Article 9.8.7.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches

Lors d'une importation d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.8.2. et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur, ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit attester et attestant que le lieu de production des animaux aquatiques et ou des produits issus d'animaux aquatiques est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches sur la base des procédures prévues par les articles 9.8.4. ou 9.8.5., selon le cas, et par l'article 9.8.6.

CeLe certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.8.3.

Article 9.8.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches

4) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.8.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce risque: conformément au chapitre 2.1. et considérer les mesures de réduction du risque figurant aux alinéas 2 1 et 3 2 ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (conformément aux chapitres 4.3, 4.7. et 5.5.).

OU

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants. Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : http://www.ices.dk/publications/our_publications/Pages/Miscellaneous.aspx) peuvent se résumer comme suit :

- a) dans le pays exportateur :
- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ;
- b) dans le pays importateur :
- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (tels que décrits au chapitre 2.2.8. du Manuel aquatique) et tester la présence du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* chez cette population conformément au chapitre 1.4. ;
 - v) si la présence du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* et libérée de sa quarantaine ;
 - vi) si la présence du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
 - b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
 - c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en quarantaine dans une installation sécurisée ;
 - e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en quarantaine ;
 - f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
 - g) si ni la présence du nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux conditions élémentaires de sécurité biologique existant dans le pays, la zone ou le compartiment d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette maladie ;
 - h) sortir de quarantaine la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'aquaculture ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le compartiment.
- 3) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa o du point 3, les conditions de quarantaine doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de quarantaine ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des infections de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.8.3.

Article 9.8.9.

Importation d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'animaux aquatiques appartenant à des une espèce visées à l'article 9.8.2. et/ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.8.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.8.11. ou, soit en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et

Annexe 16 (suite)

- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le MRNV responsable de le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* la maladie des queues blanches ; ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Article 9.8.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches

Lors de l'importation d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.8.2., ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.8.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver MRNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles,
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.8.3.

Article 9.8.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches, les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie au nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur territoire de crevettes congelées et décortiquées (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés) qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des produits issus d'animaux aquatiques susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.8.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce risque.

— Texte supprimé.

CHAPITRE 9.X.7

MALADIE DE NÉCROSE HÉPATOPANCRÉATIQUE AIGÜË

Article 9.X.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë » désigne une infection causée par les souches de la bactérie *Vibrio parahaemolyticus* (V_{PAHPND}) et appartenant à la famille des Vibrionales et *V. harveyi*, porteuses d'un ou plusieurs plasmides extrachromosomiques de ~70-kbp, dont les gènes qui codent pour des toxines homologues aux toxines entomopathogènes de *Photorhabdus* (Pir), PirA et PirB, pour une toxine (Pir^{VP}) induisant des modifications histopathologiques du pancréas (ci-après désignées par souches V_{PAHPND}). *V. parahaemolyticus* est classé en tant qu'espèce de *Vibrio* appartenant au clade *V. Harveyi*.

{Le *Manuel aquatique* contient les informations sur les méthodes de *diagnostic*.}

Article 9.X.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent aux espèces ci-après sensibles suivantes, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : la crevette à pattes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*) et la crevette géante tigrée géante (*Penaeus monodon*) et la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*).

Article 9.X.3.

Importation et/ou transit d'animaux aquatiques et de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë et du statut du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie quand elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous lorsqu'il s'agit d'une espèce visée à l'article 9.X.2. et que ces produits satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.1. :
 - f~~a~~) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant 3,6 minutes au moins ou à toute combinaison de température et de temps équivalente dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de V_{PAHPND}) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 100 °C pendant trois une minutes au moins (ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de V_{PAHPND}) ;
 - c~~e~~) produits pasteurisés à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 63 °C pendant au moins 30 minutes (ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de V_{PAHPND}) ;
 - d~~c~~) huile de crustacés ;
 - e~~d~~) farines de crustacés ;
 - f~~e~~) chitine extraite par un procédé chimique.
- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur territoire d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.X.2. autres que ceux énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.X.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions requises aux articles 9.X.7. à 9.X.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë.
- 3) L'*Autorité compétente* doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation ou le transit par son territoire d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 9.X.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de la transmission de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë. L'*Autorité compétente* du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Annexe 17 (suite)

Article 9.X.4.

Pays indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

En cas de partage d'une zone avec un ou plusieurs autres pays, un pays ne peut déposer une *auto-déclaration d'absence* de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë que si tous les secteurs couverts par des étendues d'eaux partagées sont déclarés pays ou zones indemnes de cette *maladie* (voir article 9.X.5.).

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un pays peut déposer une *auto-déclaration d'absence* de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.X.2. n'est présente et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.X.2. est présente et les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~la maladie~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~la maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place depuis au moins deux ans sans que la présence de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, a perdu son statut indemne par suite de la détection d'une telle *maladie* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations ~~infectées touchées de~~ ont été détruites ou éliminées la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible ~~la probabilité~~ le risque de nouvelle propagation de la ~~maladie de nouvelle transmission de la~~ maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~propagation de la~~ ~~maladie~~, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~maladie~~, et
- d) une *surveillance ciblée*, comme indiqué au chapitre 1.4., est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ait été décelée.

Entretemps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone* indemne, pour autant que les conditions requises à l'alinéa 3 de l'article 9.X.5. soient remplies.

Article 9.X.5.

Compartiment ou zone indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

En cas d'extension au-delà des frontières d'un pays, un *compartiment* ou une *zone* ne peut être déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Annexe 16 (suite)

Comme indiqué à l'article 1.4.6., un *compartiment* ou une *zone* situé sur le *territoire* d'un pays ou de plusieurs pays non déclarés indemnes de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë peut être déclaré indemne de cette *maladie* par l'*Autorité compétente de ce du pays concerné* ou par l'ensemble des *Autorités compétentes concernées* si :

- 1) aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 9.X.2. n'est présente dans le *compartiment* ou la *zone* et les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans :

OU

- 2) l'une quelconque des *espèces sensibles* visées à l'article 9.X.2. est présente dans le *compartiment* ou la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) aucune présence de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~la maladie~~ n'a été observée depuis au moins dix ans malgré l'existence de conditions propices à sa manifestation clinique comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans ;

OU

- 3) le statut sanitaire au regard de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~la maladie~~ n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existent sans discontinuer depuis au moins deux ans, et
- b) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est en place dans le *compartiment* ou la *zone* depuis au moins deux ans sans que la présence de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection de cette *maladie* dans la *zone* mais les conditions suivantes sont réunies :

- a) dès la détection de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~maladie~~, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées touchées de ~~ont été détruites ou éliminées~~ la *zone infectée* ~~ont été abattues et éliminées~~ par des moyens réduisant autant que possible la probabilité ~~le risque de nouvelle propagation de la maladie de nouvelle transmission de la maladie de~~ propagation de la maladie, et les opérations de *désinfection* appropriées comme indiqué au chapitre 4.3. ont été effectuées, et
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ~~la maladie~~, et
- d) une *surveillance ciblée* comme indiqué au chapitre 1.4. est mise en œuvre depuis au moins deux ans sans que la présence de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ait été décelée.

Article 9.X.6.

Maintien du statut indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë conformément aux dispositions énoncées aux alinéas 1 ou 2, suivant le cas, des articles 9.X.4. ou 9.X.5., peut conserver son statut indemne au regard de cette *maladie*, sous réserve que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë conformément aux dispositions énoncées à l'alinéa 3, suivant le cas, des articles 9.X.4. ou 9.X.5., peut interrompre la *surveillance ciblée* tout en conservant son statut indemne ~~au regard de cette maladie~~, sous réserve que les conditions soient propices à l'expression clinique de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, ~~soient réunies~~ et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* soient constamment maintenues.

Toutefois, dans les *zones* ou *compartiments* déclarés indemnes de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë se trouvant dans des pays qui en sont infectés, ainsi que dans tous les cas où les conditions ne sont pas propices à sa manifestation clinique, la *surveillance ciblée* doit être poursuivie à un niveau défini par le *Service chargé de la santé des animaux aquatiques* en rapport avec la probabilité d'introduction de l'*infection*.

Annexe 16 (suite)

Article 9.X.7.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à des une espèces visées à l'article 9.X.2., et ou de *produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus*, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente* du pays exportateur, ou par un *agent certificateur* agréé par le pays importateur. Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit attester et attestant que le lieu de production des *animaux aquatiques et ou* des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë sur la base des procédures prévues par les articles 9.X.4. ou 9.X.5., selon le cas, et par l'article 9.X.6.

Ce Le *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises produits issus d'animaux aquatiques énumérées à l'alinéa 1 de l'article 9.X.3.

Article 9.X.8.

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'*animaux aquatiques vivants* appartenant à des espèces visées à l'article 9.X.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci après afin de réduire ce risque: conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du risque figurant aux alinéas 21) et 32) ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en l'isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver V_{PAHPND} (conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5.).

OU

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : http://www.ices.dk/publications/our_publications/Pages/Miscellaneous.aspx) peuvent se résumer comme suit :

a) dans le pays exportateur :

- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
- ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ;

b) dans le pays importateur :

- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
- ii) tester la population F-0 en vue de la recherche de V_{PAHPND} conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
- iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
- iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (tels que décrits au chapitre 2.2.X. du Manuel aquatique) et tester la présence de V_{PAHPND} chez cette population, conformément au chapitre 1.4. ;

- v) si la présence de *Vp_{AHPND}* n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë et libérée de sa *quarantaine* ;
- vi) si la présence de *Vp_{AHPND}* est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine* et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
- b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
- c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence de *Vp_{AHPND}* ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en *quarantaine* dans une installation sécurisée ;
- e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en *quarantaine* ;
- f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence de *Vp_{AHPND}* et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- g) si ni la présence de *Vp_{AHPND}* ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant dans le pays, la zone ou le *compartiment* d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette *maladie* ;
- h) sortir de *quarantaine* la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'*aquaculture* ou de repeuplement dans le pays, la zone ou le *compartiment*.
- 4) Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e) du point 3, les conditions de *quarantaine* doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de *quarantaine* ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des *infections* de bas niveau.

Le présent article ne s'applique pas aux *animaux aquatiques* énumérés au point 1 de l'article 9.X.3.

Article 9.X.9.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques* appartenant à des *une* espèces visées à l'article 9.X.2., et ou de produits issus d'animaux aquatiques qui en sont issus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à ce type de marchandise et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son entreposage, dans des installations de *quarantaine* ou biosécurisées jusqu'au moment de sa transformation, jusqu'à ce qu'il soit transformé soit en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.X.3., soit en l'un des produits mentionnés ou à l'alinéa 1 de l'article 9.X.11. ou ,soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *Vp_{AHPND}* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver *Vp_{AHPND}* ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les *risques* associés à l'utilisation du type de marchandise aux animaux aquatiques et aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

Annexe 17 (suite)

Article 9.X.10.

Importation d'animaux aquatiques vivants ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine telles que l'alimentation animale appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux, ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

Lors de l'importation d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article 9.X.2., ou de produits qui en sont issus, et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques ou à la recherche à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, et son maintien, dans des installations de quarantaine ou biosécurisées en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits énumérés à l'alinéa 1 de l'article 9.X.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement des conteneurs et de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver V_{PAHPND} ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5., et à prévenir leur contact avec des espèces sensibles,
- 3) le traitement de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver V_{PAHPND} ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.3. et 4.7.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 1 de l'article 9.X.3.

Article 9.X.11.

Importation (ou transit) d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de la à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition liée à cette maladie quand elles autorisent l'importation (ou le transit) par leur territoire de {crevettes ou crustacés décapodes congelés et décortiqués (dont la carapace et le céphalothorax ont été retirés)} qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2.

Certaines hypothèses ont été posées concernant l'appréciation de la sécurité sanitaire des produits issus d'animaux aquatiques susmentionnés. Les États membres doivent donc se référer à ces hypothèses, figurant à l'article 5.4.2., et estimer si ces dernières s'appliquent à leur situation.

Lorsqu'ils l'estiment nécessaire, les États membres peuvent prendre des mesures au niveau national, visant à limiter les risques associés à l'utilisation du type de marchandise aux produits issus d'animaux aquatiques susvisés à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'animaux aquatiques ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des une espèces visées à l'article 9.X.2., à l'exclusion de ceux mentionnés à l'alinéa 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisée et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce risque.

— Texte supprimé.

« Version exempte du suivi des modifications »
**Article X.X.8. figurant dans l'ensemble des chapitres traitant
des maladies spécifiques (ou article 10.4.12. dans le cas du chapitre
sur l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon)**

Importation d'animaux aquatiques à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par l'agent pathogène X / la maladie X

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à une espèce visée à l'article X.X.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par l'*agent pathogène X* / la maladie X, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé au type de *merchandise* susvisé conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du *risque* figurant aux points 1) et 2) ci-dessous.

- 1) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et
 - b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets afin d'inactiver l'*agent pathogène X* (conformément aux chapitres 4.3., 4.7. et 5.5.).

OU

- 2) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) dans le *pays exportateur* :
 - i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des *animaux aquatiques* qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'*animaux aquatiques* présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par l'*agent pathogène X* / la maladie X.
 - b) dans le *pays importateur* :
 - i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de *quarantaine* ;
 - ii) tester la population F-0 en vue de la recherche de l'*agent pathogène X* conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en *quarantaine* ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de *quarantaine* où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par l'*agent pathogène X* / la maladie X (tels que décrits au chapitre X.X.X. du *Manuel aquatique*) et tester la présence de l'*agent pathogène X* chez cette population, conformément au chapitre 1.4 ;
 - v) si la présence de l'*agent pathogène X* n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par l'*agent pathogène X* / la maladie X et libérée de sa *quarantaine* ;
 - vi) si la présence de l'*agent pathogène X* est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine* et sera tuée puis éliminée dans des conditions de sécurité biologique adéquates.

« Version avec suivi des modifications »
**Article X.X.8. figurant dans l'ensemble des chapitres traitant
des maladies spécifiques (ou l'article 10.4.12. dans le cas du chapitre
sur l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon)**

Importation d'animaux aquatiques vivants à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par l'agent pathogène X / la maladie X

4) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à des une espèces visées à l'article X.X.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par l'agent pathogène X/ la maladie X, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé au type de marchandise susvisé et, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci après afin de réduire ce risque : conformément au chapitre 2.1. et considérer les mesures de réduction du risque figurant aux points **2)1)** et **3)2)** ci-dessous.

21) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques importés, il convient d'appliquer les principes suivants :

- a) la livraison directe du chargement et son maintien à vie dans des installations assurant la sécurité biologique en isolant du milieu environnant d'une manière permanente, la livraison directe et le maintien à vie des animaux aquatiques importés dans une installation de quarantaine, et
- b) le traitement de l'eau de transport, de l'équipement, des effluents et des déchets, et celui de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver afin d'inactiver l'agent pathogène X (conformément aux chapitres 4.3., 4.3.7. et 5.5.) ainsi que l'élimination de ces effluents et déchets dans des conditions de sécurité biologique adéquates.

2) Si l'opération d'importation a pour objet d'établir une nouvelle population, il convient d'appliquer les aspects pertinents du Code de conduite pour les introductions et les transferts d'organismes marins du Conseil international pour l'exploration de la mer (CIEM).

OU

32) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants Aux fins de l'application du Code aquatique, les aspects pertinents du Code de conduite précité (dont le texte complet peut être consulté sur le site Internet du CIEM à l'adresse suivante : <http://www.ices.dk/publications/our-publications/Pages/Miscellaneous.aspx>) peuvent se résumer comme suit :

a) dans le pays exportateur :

- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des animaux aquatiques qui les composent ;
- ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'animaux aquatiques présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par l'agent pathogène X/ la maladie X ;

b) dans le pays importateur :

- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de quarantaine ;
- ii) tester la population F-0 en vue de la recherche de l'agent pathogène X la maladie X conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
- iii) produire une première génération (F-1) en quarantaine ;
- iv) élever la population F-1 dans une installation de quarantaine où les conditions sont propices à l'expression des signes cliniques de l'infection par l'agent pathogène X/ la maladie X (tels que décrits au chapitre X.X.X. du Manuel aquatique) et tester la présence de l'agent pathogène X la maladie X chez cette population, conformément au chapitre 1.4. ;
- v) si la présence de l'agent pathogène X la maladie X n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par l'agent pathogène X/ la maladie X et libérée de sa quarantaine ;

Annexe 17B (suite)

- vi) si la présence de la maladie X est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa quarantaine et sera tuée puis éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.
- a) identifier les populations d'intérêt (d'élevage ou sauvages) au niveau du site d'origine ;
- b) évaluer l'état sanitaire des populations et leurs antécédents pathologiques ;
- c) prélever et analyser des échantillons afin de rechercher la présence d'*A. astaci* ou de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- d) importer une population de géniteurs (F-0) et la mettre en *quarantaine* dans une installation sécurisée ;
- e) produire une génération F-1 à partir de la population F-0 mise en *quarantaine* ;
- f) élever la population F-1 et, aux stades critiques du développement (cycle biologique), effectuer des prélèvements et les analyser pour mettre en évidence la présence d'*A. astaci* et étendre les investigations à la recherche de parasites afin de déterminer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
- g) si ni la présence d'*A. astaci* ni celle de parasites ne sont décelées et s'il est considéré que l'état de santé et le statut sanitaire de la population répondent aux *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant dans le pays, la *zone* ou le *compartiment* d'importation, la population F-1 pourra être reconnue indemne de peste de l'écrevisse ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette *maladie* ;
- h) sortir de *quarantaine* la population F-1 indemne de l'agent pathogène spécifique et l'introduire à des fins d'*aquaculture* ou de repeuplement dans le pays, la *zone* ou le *compartiment*.
- 3) ~~Concernant les dispositions énoncées à l'alinéa e du point 3, les conditions de *quarantaine* doivent créer un milieu propice à la multiplication des agents pathogènes et éventuellement à l'expression de signes cliniques. Si les conditions de *quarantaine* ne servaient pas de milieu favorable à la multiplication et au développement des agents pathogènes, l'approche diagnostique, faisant l'objet de la présente recommandation, pourrait ne pas être suffisamment sensible pour détecter des *infections* de bas niveau.~~

~~Le présent article ne s'applique pas aux animaux aquatiques énumérés au point 1 de l'article 9.1.3.~~

– Texte supprimé.

CHAPTER 2.2.X.

ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE

1. Scope

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) means infection with strains of *Vibrio parahaemolyticus* (V_{AHPND}) and *V. harveyi* that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only V_{AHPND} has been demonstrated to cause AHPND.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

AHPND has a bacterial aetiology (Kondo *et al.*, 2015; Kwai *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2013a; 2013b). It is caused by specific virulent strains of *Vibrio* species, including *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) and *V. harveyi*, that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within AHPND-causing *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) has been designated pVA1, and its size may vary slightly. Removal (or "curing") of pVA1 abolishes the AHPND-causing ability of the virulent strain of *V. parahaemolyticus* V_{AHPND} strains. A pVA1 cured strain fails to induce the massive sloughing of cells in the hepatopancreatic tubules that is a primary histopathological characteristic of AHPND (Lee *et al.*, 2015).

Within a population of AHPND-causing V_{AHPND} bacteria, natural deletion of the Pir^{VP} operon region may occur in a few individuals (Lee *et al.*, 2015; Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences or transposase that flank the Pir toxin operon. Although different strains exhibit different levels of stability, when the deletion occurs, it means that a virulent strain of *V. parahaemolyticus* V_{AHPND} strain will lose its ability to induce AHPND. However, if the Pir toxin sequence is used as a target for detection, then a colony that has this deletion will produce a negative result even though the colony was derived from an isolate of AHPND-causing V_{AHPND} bacteria.

The plasmid pVA1 also carries a cluster of genes related to conjugative transfer, which means that this plasmid is potentially able to transfer to other bacteria. The pVA1 plasmid also carries the *pndA* gene, which is associated with a post-segregational killing (psk) system. For a bacterium that harbours a plasmid with the psk system (PSK⁺), only progeny that inherit the PSK⁺ plasmid will be viable. Progeny that do not inherit the PSK⁺ plasmid will die because the stable *pndA* mRNA will be translated to PndA toxin that will kill the bacterium. The presence of a psk system on a plasmid thus ensures that the plasmid is inherited during bacterial replication. The pVA1 plasmid will therefore be passed on to subsequent generations of producing PirA^{VP} and PirB^{VP}.

2.1.2. Survival outside the host

AHPND-causing strains of *V. parahaemolyticus* (V_{AHPND}) would be is expected to possess similar properties to other strains of *V. parahaemolyticus* found in seafood that have been shown to survive up to 9 and 18 days in filtered estuarine water and filtered seawater at an ambient temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (Karunasagar *et al.*, 1987).

Annexe 19 (suite)**2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)**

Experimental studies have shown that *Vp_{AHPND}* AHPND could not be transmitted via frozen infected shrimp (Tran *et al.*, 2013a). ~~In addition~~ Similarly, other strains of *V. parahaemolyticus* are known to be sensitive to freezing, refrigeration, heating and common disinfectants (Andrews *et al.*, 2000; Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Su & Liu, 2007; Thompson & Thacker, 1973).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

Mortalities occur within 30–35 days, and as early as 10 days, of stocking shrimp ponds with postlarvae (PL) or juveniles (Joshi *et al.*, 2014b; Leaño & Mohan, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). ~~There is a report~~ (De la Pena *et al.* (2015) ~~of reported~~ disease outbreaks in the Philippines occurring as late as 46–96 days after pond-stocking.

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

Not applicable.

2.2.5. Target organs and infected tissue

Gut-associated tissues and organs

2.2.6. Persistent infection

No data or not known.

2.2.7. Vectors

None is known, although as *Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment, ~~the possibility presence of vector species would not be unexpected~~ vector species could be expected.

2.3. Disease pattern**2.3.1. Transmission mechanisms**

Vp_{AHPND} AHPND has been transmitted experimentally by immersion, ~~in feed-feeding (per os)~~ and reverse gavage (Dabu *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation.

2.3.2. Prevalence

~~*Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment.~~ In regions where AHPND is enzootic in farmed shrimp, evidence indicates a near 100% prevalence (Tran *et al.*, 2014a).

2.3.3. Geographical distribution

The disease has been ~~was~~ reported initially in 2010 from China (People's Rep. of) (2010), and subsequently from Vietnam (2010), Malaysia (2011), Thailand (2012) (Flegel, 2012; Lightner *et al.*, 2012), Mexico (2013) (Nunan *et al.*, 2014) and the Philippines (2014) (Dabu *et al.*, 2015; de la Pena *et al.*, 2015).

2.3.4. Mortality and morbidity

AHPND is characterised by sudden, mass mortalities (up to 100%) usually within 30–35 days of stocking grow-out ponds with PLs or juveniles (FAO, 2013; Hong *et al.*, 2016; NACA, 2012) and can be reproduced experimentally (Joshi *et al.*, 2014a; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). Older juveniles may also be affected (de la Pena *et al.*, 2015).

2.3.5. Environmental factors

Water sources with low salinity (<20 ppt) seem to reduce the incidence of the disease. Peak occurrence seems to occur during the hot and dry season from April to July ~~seems to be the peak~~. Overfeeding, poor seed quality, poor water quality, poor feed quality, algal blooms or crashes are also factors that may lead to occurrences of AHPND in endemic areas (FAO, 2013; NACA, 2012).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

Not applicable.

2.4.2. Chemotherapy

None available ~~Not applicable~~.

2.4.3. Immunostimulation

None known to be effective ~~Not applicable~~.

2.4.4. ~~Resistance~~ Breeding for resistance

Not applicable.

2.4.5. Restocking with resistant species

None available.

2.4.6. Blocking agents

None available.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

None known.

2.4.8. General husbandry practices

As with other infectious diseases of shrimp, established good sanitary and biosecurity practices, such as improvement of hatchery sanitary conditions and PL screening are likely to be beneficial; good broodstock management, use of high quality post-larvae and good shrimp farm management including strict feeding rate control, ~~reduced over-crowding~~ appropriate stocking density etc. are all well-established practices that reduce the impact of disease, including AHPND (NACA, 2012).

Annexe 19 (suite)**3. Sampling****3.1. Selection of individual specimens**

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 4.1.1) should be selected for AHPND diagnosis. It is assumed that adults (broodstock) can carry ~~Pir toxin bearing strains of *V. parahaemolyticus* *Vp*_{AHPND} or other *Vibrio* spp.~~ (Han *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). Therefore, broodstock without clinical signs may also be selected for diagnostic testing.

3.2. Preservation of samples for submission

Samples to be submitted are (i) fresh and chilled on ice for bacterial isolation, (ii) fixed in 90% ethanol for polymerase chain reaction (PCR) detection and (iii) preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Leaño & Mohan, 2013; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

3.3. Pooling of samples

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can may need to be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs or tissues

Samples of gut-associated tissues and organs, such as hepatopancreas, stomach, the midgut and the hindgut are suitable. In addition, faecal (non-lethal) samples may be collected from valuable broodstock.

3.5. Samples or tissues that are not suitable (i.e. when it is never possible to detect)

Samples other than gut-associated tissues and organs are not appropriate (FAO, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b).

4. Diagnostic methods**4.1. Field diagnostic methods****4.1.1. Clinical signs**

~~The onset of clinical signs and mortality can start as early as 10 days post-stocking and can be used for presumptive diagnosis.~~ Clinical signs include a pale-to-white hepatopancreas (HP), significant atrophy of the HP, soft shells, guts with discontinuous, or no contents, black spots or streaks visible within the HP (due to melanised tubules). In addition, the HP does not squash easily between the thumb and forefinger (probably due to increased fibrous connective tissue and haemocytes) (NACA, 2012; 2014).

4.1.2. Behavioural changes

Not applicable.

4.2. Clinical methods**4.2.1. Clinical chemistry**

None is known.

4.2.3. Microscopic pathology

The disease has two distinct phases:

- i) The acute phase is characterised by a massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of HP tubule epithelial cells into the HP tubules, HP collecting ducts and posterior stomach in the absence of bacterial cells (FAO, 2013; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).
- ii) The terminal phase is characterised by marked intra-tubular haemocytic inflammation and development of massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells (FAO, 2013; Leaño & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

4.2.4. Wet mounts

Not applicable.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections (for ISH)

ISH is not currently available (October 2015).

4.2.7. Electron microscopy or cytopathology

Not applicable.

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

Not applicable.

4.3.1.1.2. Smears

Not applicable.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.2.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

~~Pir toxin-producing strains of *V. parahaemolyticus* (and other bacterial species) can be isolated on standard media used for isolation of bacteria from diseased shrimp (Lee *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015). Bacterial species identification may be carried out using 16S rRNA PCR (Weisburg *et al.*, 1991) or toxR-targeted PCR (Kim *et al.*, 1999) and sequencing (Weisburg *et al.*, 1991), and their probable ability to cause AHPND using AHPND-specific PCR methods that target the *Vp*_{AHPND}-toxin genes are described in section 4.3.1.2.3, 4.3.1.2.3.1.~~

4.3.1.2.1. Cell culture or artificial media

See sections 4.3.1.2.3.1.1 and 4.3.1.2.3.1.2.

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

None is available to date (October 2015).

Annexe 19 (suite)

4.3.1.2.3. Molecular techniques

4.3.1.2.3.1. PCR protocols for detection of AHPND-causing bacteria from cultures or infected shrimp

PCR methods have been developed that target the VpAHPND AHPND-toxin genes. The AP3 method is a single-step PCR that targets the 12.7 kDa PirA^{vp} gene (Sirikharin *et al.*, 2015). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing 104 isolates of VpAHPND AHPND-causing and non-pathogenic bacteria (including other *Vibrio* and non-*Vibrio* species) that had previously been tested by bioassay (Kwai *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015). Subsequently, Soto-Rodriguez *et al.* (2015), using 9 VpAHPND AHPND-causing and 11 non-pathogenic isolates of *V. parahaemolyticus* reported that the AP3 method produced the highest positive (90%) and negative (100%) predictive values of five PCR methods tested.

Single-step PCRs such as the AP3 method and others, e.g. VpPirA-284, VpPirB-392 (Han *et al.*, 2015a) and TUMSAT-Vp3 (Tinwongger *et al.*, 2014), have relatively low sensitivity when used for detection of VpAHPND AHPND-causing bacteria at low levels (e.g. sub-clinical infections) or in environmental samples such as sediments and biofilms. For such samples, a preliminary enrichment step (see 4.3.1.2.3.1.1) is recommended.

Alternatively, a nested PCR method, AP4, has been developed with a 100% positive predictive value for VpAHPND AHPND-causing bacteria using the same 104 bacterial isolates used to validate AP3 above (Dangtip *et al.*, 2015), and has greater sensitivity (1 fg of DNA extracted from VpAHPND AHPND-causing bacteria), allowing it to be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

In addition, real-time PCR methods, for example the VpAHPND AHPND-specific TaqMan real-time PCR developed by Han *et al.* (2015b), and an isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP) method developed by Koiwai *et al.* (2015) also have high sensitivity and can be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

4.3.1.2.3.1.1 Enrichment of samples prior to DNA extraction

Preliminary enrichment culture for detection of VpAHPND AHPND-causing bacteria from sub-clinical infections or environmental samples may be carried out using any suitable bacteriological medium (e.g. tryptic-~~soy~~ broth or alkaline peptone water containing 2.5% NaCl supplement) incubated for 4 hours at 30°C with shaking. Then, after letting any debris settle, the bacteria in the culture broth are pelleted by centrifugation. Discarding the supernatant, DNA can be extracted from the bacterial pellet in preparation for PCR analysis.

4.3.1.2.3.1.2 Agent purification

VpAHPND The causative agent of AHPND may be isolated in pure culture from diseased shrimp, sub-clinically infected shrimp, or environmental samples using standard microbiological media for isolation of *Vibrio* species from such sources (Lightner, 1996; Tran *et al.*, 2013a; 2013b). Confirmation of identification of VpAHPND as an AHPND-causing bacteria may be undertaken by PCR analysis and bioassay.

4.3.1.2.3.1.3 DNA extraction

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the stomach or hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp, from cultures of purified bacterial isolates or from bacterial pellets from enrichment cultures (see above). The amount of template DNA in a 25 µl PCR reaction volume should be in the range of 0.01–1 ng of DNA when extracted from bacterial isolates (i.e. directly from a purified culture) and in the range of 10–100 ng of total DNA when extracted from shrimp tissues or from a bacterial pellet derived from an enrichment culture.

4.3.1.2.3.1.4 One-step PCR detection of pVA1 plasmid

Two one-step PCR methods (AP1 and AP2) are described here for detection of the pVA1 plasmid in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.1.

Table 4.1. PCR primers for one-step PCR detection of AHPND-causing bacteria

Method name	Primers	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP1	AP1F: 5'-CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G-3' AP1R: 5'-GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C-3'	<i>pVA1</i>	700bp	Flegel & Lo (2014)
AP2	AP2F: 5'-TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G-3' AP2R: 5'-CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G-3'	<i>pVA1</i>	700bp	Flegel & Lo (2014)

4.3.1.2.3.1.5 Protocol for the AP1 and AP2 PCR methods

This protocol follows the method described by Flegel & Lo. (2014). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 0.01-1 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 25–30 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 60 seconds with a final extension step at 72°C for 10 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C (http://www.enaca.org/modules/library/publication.php?publication_id=1128).

4.3.1.2.3.1.45 PCR primers for One-step PCR detection of *PirA/PirB* toxin genes AHPND-causing bacteria

Four one-step PCR methods (AP3, TUMSAT-Vp3, VpPirA-284 and VpPirB-392) are described here for detection of Pir toxin genes in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.42.

Table 4.42. PCR primers for one-step PCR detection of AHPND-causing bacteria

Method name	Primers	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP3	AP3-F: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP3-R: 5'-GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA-3'	<i>pirA^{vp}</i>	333bp	Sirikharin <i>et al.</i> , 2014, 2015
TUMSAT-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: 5'-GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA-3' TUMSAT-Vp3 R: 5'-TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA-3'	<i>pirA^{vp}</i>	360bp	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
VpPirA-284	VpPirA-284F: 5'-TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG-3' VpPirA-284R: 5'-CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA-3'	<i>pirA^{vp}</i>	284bp	Han <i>et al.</i> , 2015a
VpPirB-392	VpPirB-392F: 5'-TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC-3' VpPirB-392R: 5'-TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA-3'	<i>pirB^{vp}</i>	392bp	Han <i>et al.</i> , 2015a

4.3.1.2.3.1.56 Protocol for the AP3 PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

4.3.1.2.3.1.62 Protocol for the VpPirA-284 and VpPirB-392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015) and uses PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready-to-go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3-minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Annexe 19 (suite)

4.3.1.2.3.1.78 Protocol for the TUMSAT-Vp3 PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.01 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

4.3.1.2.3.1.89 AP4 nested PCR primers protocol for detection of *Vp_{AHPND}* AHPND bacteria

4.3.1.2.3.1.10 Protocol for the AP4 nested PCR method

This protocol follows the method described by Srithyalucksana *et al.* (2015) and Dangtip *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4-F1, 0.5 µl 10 µM AP4-R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10x PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4-F2, 0.375 µl 10 µM AP4-R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.23. The expected amplicon sizes are 1269 bp for the outer primers (AP4-F1 and AP4-R1) and 230 bp for the inner primers (AP4-F2 and AP4-R2). At high concentrations of target DNA, additional amplicons may occur as the product of residual primer AP4-F1 pairing with AP4-R2 (357 bp) or AP4-F2 with AP4-R1 (1142 bp) in the nested step.

Table 4.23. Primers for the AP4, nested PCR method for detection of *Vp_{AHPND}* AHPND-causing bacteria

Method name	Primers	Expected amplicon size	Reference
AP4 Step 1	AP4-F1: 5'-ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC-3' AP4-R1: 5'-ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA-3'	1269	Dangtip <i>et al.</i> , 2015
AP4 Step 2	AP4-F2: 5'-TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG-3' AP4-R2: 5'-GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC-3'	230	

4.3.1.2.3.1.910 Analysis of conventional PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, amplicons are visualised by agarose gel electrophoresis. Twenty µl of the PCR reaction mixture, with 6x loading dye added, is loaded onto a 1.5% agarose gel and electrophoresis is carried out at 90 volts for 40 minutes. Amplicons are visualised with SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Cat. No. 33102) according to the manufacturer's instructions. Amplicons of the expected size appropriate for the PCR methods used (Tables 4.42, and 4.23 and 4.3) indicate a positive result. Positive results must be confirmed by sequence analysis.

4.3.1.2.3.1.1011 Protocol for the AHPND-specific real-time PCR method

This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real-time PCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µl. Real-time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real-time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software-generated characteristic amplification curves. No-template controls must have no evidence of specific amplicons.

4.3.1.2.3.1.6 Primers and Probe for AHPND specific real time PCR

The primers and probe and target gene for the *Vp_{AHPND}*-AHPND-specific real-time PCR are listed in Table 4.34.

Table 4.34. Primers and probe for the real-time PCR method for detection of *Vp_{AHPND}* AHPND-causing bacteria

Primer/ probe name	Sequence	Target gene	Reference
VpPirA-F	5'-TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG-3'	pirA	Han <i>et al.</i> , 2015b
VpPirA-R	5'-GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG-3'		
VpPirA Probe	5'-6FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA-3'		

4.3.1.2.3.1.7 Protocol for the AP3 PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3 F1, 0.5 µl 10 µM AP3 R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

4.3.1.2.3.1.8 Protocol for the VpPirA 284 and VpPirB 392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015) and uses PuReTaq ready to go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready to go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3 minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

4.3.1.2.3.1.9 Protocol for the TUMSAT Vp3-PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.04 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

4.3.1.2.3.1.10 Protocol for the AP4 nested PCR method

This protocol follows the method described by Sritnyalucksana *et al.* (2015) and Dangtip *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4 F1, 0.5 µl 10 µM AP4 R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4 F2, 0.375 µl 10 µM AP4 R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

4.3.1.2.3.1.11 Analysis of conventional PCR products by agarose gel electrophoresis

After PCR, amplicons are visualised by agarose gel electrophoresis. Twenty µl of the PCR reaction mixture, with 6x loading dye added, is loaded onto a 1.5% agarose gel and electrophoresis is carried out at 90 volts for 40 minutes. Amplicons are visualised with SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Cat. No. 33102) according to the manufacturer's instructions. Amplicons of the expected size appropriate for the PCR methods used (Tables 4.1, 4.2 and 4.3) indicate a positive result. Positive results must be confirmed by sequence analysis.

4.3.1.2.3.1.12 Protocol for the AHPND-specific real-time PCR method

Annexe 19 (suite)

This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real time PCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µl. Real time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software generated characteristic amplification curves. No template controls must have no evidence of specific amplicons.

4.3.1.2.3.1. **4.1.2** Controls for all PCR methods

The following controls should be included in all *Vp_{AHPND}* AHPND PCR assays: a) negative extraction control i.e. DNA template extracted at the same time from a known negative sample; b) DNA template from a known positive sample, such as *Vp_{AHPND}*-AHPND-affected shrimp tissue or DNA from an *Vp_{AHPND}* AHPND-positive bacterial culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a non-template control. In addition, a further control is required to demonstrate that extracted nucleic acid is free from PCR inhibitors, for example for shrimp tissues use of the decapod 18S rRNA PCR (Lo *et al.*, 1996) or the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

While details of each PCR protocol are provided here, as with any diagnostic test individual laboratories should validate the tests for the specific reagents and platform used within their own laboratories.

4.3.2. Serological methods

Not applicable.

4.3.3. Bioassay

Vp_{AHPND}-AHPND has been transmitted experimentally by immersion and reverse gavage (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation. Thus following isolation and purification of a bacterium that is suspected to cause AHPND, a bioassay can be performed to confirm the presence of the causative agent. The immersion procedure is carried out by immersing 15 shrimp for 15 minutes with aeration in a suspension (150 ml clean artificial seawater) of 2×10^8 cells of the cultured bacterium per ml. Following this initial 15 minute period, the shrimp and the inoculum are transferred to a larger tank with a volume of clean artificial seawater to make the final concentration of the bacterium 2×10^6 cells ml⁻¹. Shrimp are monitored at 6- to 8-hour intervals. Dead shrimp ~~are can be~~ processed for *Vp_{AHPND}*-AHPND PCR and sequence analysis. Moribund or surviving shrimp are processed for histology, and bacterial re-isolation, and AHPND-PCR and sequence analysis. A positive bioassay is indicated by the detection of characteristic histological lesions and *Vp_{AHPND}* by PCR and sequencing.

5. Rating of tests against purpose of use

As an example, the methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of AHPND are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PL	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	ed	ed	c	d
Bioassay	d	d	d	d	d	a
Histopathology	d	c	a	c	a	b
Real-time PCR	d	a	a	a	a	b
Nested PCR and sequence	d	b	b	b	a	a
1-step PCR and Sequence	d	ed	ed	ed	a	a

PL = postlarvae; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from AHPND

As indicated in Table 5.1, real-time PCR is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

AHPND ~~shall be~~ is suspected if at least one of the following criteria is met:

- Mortality ~~associated with and~~ clinical signs ~~consistent with of~~ AHPND
- Histopathology ~~indicative of consistent with~~ AHPND
- Detection of Pir toxin genes ~~in the pVA1 plasmid in *Vibrio parahaemolyticus*~~ by PCR or real-time PCR.

7.2. Definition of confirmed case

AHPND is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

- Histopathology ~~indicative of consistent with~~ AHPND
- Detection of Pir toxin gene ~~and in the~~ pVA1 plasmid in *Vibrio parahaemolyticus* by PCR and sequence analysis
- Positive results by bioassay ~~(characteristic histological lesions and detection of clinical signs, mortality, histopathology, *VpAHPND* by~~ PCR and sequencing)

8. References

ANDREWS L.S., PARK D.L. & CHEN Y.P. (2000). Low temperature pasteurization to reduce the risk of *Vibrio* infections from raw shell-stock oysters. *Food Addit. Contam.*, **17**, 787–791.

DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANANGAS MANINGAS M.B.B. (2015 2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48** 2015, 1–8 792-799.

Annexe 19 (suite)

DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–162.

DE LA PEÑA PEÑA L. L.D., CABILLON N.A.R., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D.G. D.DG & SALOMA C.P. (2015). Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.

DE SCHRYVER P., DEFOIRDT T. & SORGELOOS P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.*, **10**, e1003919.

FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304), 2013. Hanoi, Viet Nam, 25–27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report No. 1053. Rome, Italy, 54 p.

FLEGEL T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 166–173.

FLEGEL T.W. & LO C.F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific Asia-Pacific. Bangkok, Thailand.

GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRIGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.

GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.

HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. & TRAN L. (2015a). *Photothabdus* insect related (*Pir*) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.

HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.

HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus* (~~*Litopenaeus*~~ *Litopenaeus*) *vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.

JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>.

JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.

KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I. VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.

KIM Y.B., OKUDA J., MATSUMOTO C., TAKAHASHI N., HASHIMOTO S. & NISHIBUCHI M. (1999). Identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains at the species species level by PCR targeted to the *toxR* gene. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1173–1177.

KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.

- KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.
- KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.
- KWAI L., ENG H.U., SIEW W., SH M.Y., WEI Y.W. & KOEN P.Y. (2014). An AP1, 2 & 3 PCR positive non-*Vibrio parahaemolyticus* bacteria with AHPND histopathology. The 9th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture.
- LEAÑO E.M. & MOHAN C.V. (2012). Early mortality syndrome threatens Asia's shrimp farms. *Global Aquaculture Advocate*, July/August 2012 [July/August 2012](#), 38–39.
- LEE C.-T., CHEN I.-T., YANG Y.-T., KO T.-P., HUANG Y.-T., HUANG J.-Y., HUANG M.-F., LIN S.-J., CHEN C.-Y., LIN S.-S., LIGHTNER D.V., WANG H.-C., WANG A.H.-J., WANG H.-C., HOR L.-I. & LO C.-F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **112**, 10798–10803.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., NOBLE B.L. & TRAN L. (2012). Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, **January/February 2012**, 40.
- LIU Q, HUANG J, YANG H L, YANG B, LIU S, WANG H L, WANG Q T, LIU F, ZHANG Q L. (2014). Detection of a new genotype of yellow head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703-709 (in Chinese with English abstract and figure illustrations).
- LO C.-F., LEU J.-H., HO C.-H., CHEN C.-H., PENG S.-E., CHEN Y.-T., CHOU C.-M., YEH P.-Y., HUANG C.-J., CHOU H.-Y., WANG C.-H. & KOU G.-H. (1996). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MUNTADA-GARRIGA J.M., RODRIGUEZ-JEREZ J.J., LOPEZ-SABATER E.I. & MORA-VENTURA M.T. (1995). Effect of chill and freezing temperatures on survival of *Vibrio parahaemolyticus* inoculated in homogenates of oyster meat. *Let. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.
- NACA (2012). Report of the Asia Pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease: Early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS), 9–10 August 2012. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- NACA (2014). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Card [hepatopancreatic necrosis disease card](#) (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and the Pacific, Thailand.
- NUNAN L., LIGHTNER D., PANTOJA C. & GOMEZ-JIMENEZ S. (2014). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 81–86.
- SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., FLEGEL T.W., MAVICHAK R. & PROESPRAWONG P. (2014). A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific and the Pacific, Thailand. Source: http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030.
- SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., THANH D.C., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, **10**: e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.
- SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of [culture cultured](#) shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.
- SU Y.C. & LIU C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiol.*, **24**, 549–558.

Annexe 19 (suite)

TANIGUCHI H., OHTA H., OGAWA M. & MIZUGUCHI Y. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin and thermolabile hemolysin genes. *J. Bacteriol.*, **162**, 510–515.

THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.

TINWONGGER S., PROESPRAWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPACK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014a). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10** (2), [14-18](#). ~~March/April 2014.~~

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014b). *Tilapia* could enhance water conditions, help control EMS in shrimp ponds. *Global Aquaculture Advocate*, ~~January/February~~ [January/February 2014](#), 11–12.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., LIGHTNER D.V. & FITZSIMMONS K. (2013a). EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *Global Aquaculture Advocate*, ~~July/August 2013~~ [July/August 2013](#), [18-20](#). ~~46–48.~~

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013b). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 45–55.

WEISBURG W.G., BARNES S.M., PELLETIER D.A. & LANE D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697–703.

YANG Y.-T., CHEN I.-T., LEE C.-T., CHEN C.-Y., LIN S.-S., HOR L.-I., TSENG T.-C., HUANG Y.-T., SRITUNYALUCKSANA K., THITAMADEE S., WANG H.-C. & LO C.-F. (2014). Draft genome sequences of four strains of *Vibrio parahaemolyticus*, three of which cause early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp in China and Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00816-14.

CHAPTER 2.2.1.

INFECTION WITH CRAYFISH PLAGUE (APHANOMYCES ASTACI (CRAYFISH PLAGUE))

1. Scope

Infection with *Aphanomyces astaci* means infection with the pathogenic agent *A. astaci* Schikora, a member of the of the Family Leptolegniaceae, Phylum Class Oomycota (water moulds). The disease is commonly known as crayfish plague. For the purpose of this chapter, crayfish plague is considered to be infection of crayfish with *Aphanomyces astaci* Schikora.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

~~The aetiological agent of crayfish plague is *Aphanomyces astaci*.~~ *Aphanomyces astaci* is a member of a group of organisms commonly known as the water moulds. Although long regarded to be fungi, this group, the Oomycetida or oomycota, are now considered protists and are classified with diatoms and brown algae in a group called the Stramenopiles or Chromista. Chromista are a eukaryotic supergroup, probably polyphyletic, which may be treated as a separate kingdom or included among the Protista.

Four groups (A–D) of *A. astaci* have been described based on random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1994): Group A (the so called *Astacus* strains) comprises a number of strains that were isolated from *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*; these strains are thought to have been in Europe for a long period of time. Group B (*Pacifastacus* strains I) includes isolates from both *A. astacus* in Sweden and *Pacifastacus leniusculus* from Lake Tahoe, USA. Imported to Europe, *P. leniusculus* have probably introduced *A. astaci* and infected the native *A. astacus* in Europe. Group C (*Pacifastacus* strains II) consists of a strain isolated from *P. leniusculus* from Pitt Lake, Canada. Another strain (Pc), isolated from *Procambarus clarkii* in Spain, sits in group D (*Procambarus* strain). This strain shows temperature/growth curves with higher optimum temperatures compared with isolates from northern Europe (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995). *Aphanomyces astaci* strains that have been present in Europe for many years (group A strains) appear to be less pathogenic than strains introduced more recently with crayfish imports from North America since the 1960s.

2.1.2. Survival outside the host

~~Although *A. astaci* is not an obligate parasite and will grow well under laboratory conditions on artificial media (Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1988), in the natural environment it does not survive well for long periods in the absence of a suitable host.~~

Aphanomyces astaci zoospores remain motile for up to 3 days and cysts survive for 2 weeks in distilled water (Svensson & Unestam, 1975; Unestam, 1966). As *A. astaci* can go through three cycles of zoospore emergence, the maximum life span outside of a host could be several weeks. Spores remained viable in a spore suspension kept at 2°C for 2 months (Unestam, 1966).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

Aphanomyces astaci, both in culture and in infected crayfish, is killed by a short exposure to temperatures of 60°C or to temperatures of –20°C (or below) for 48 hours (or more) (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002). Sodium hypochlorite and iodophors are effective for disinfection of contaminated equipment. Equipment must be cleaned prior to disinfection, since organic matter was found to decrease the effectiveness of iodophors (Alderman & Polglase, 1985). Thorough drying of equipment (>24 hours) is also effective as *A. astaci* is not resistant to desiccation.

Annexe 20 (suite)**2.1.4. Life cycle**

The life cycle of *A. astaci* is simple with vegetative hyphae invading and ramifying through host tissues, eventually producing extramatrical sporangia that release amoeboid primary spores. These initially encyst, but then release a biflagellate zoospore (secondary zoospore). Biflagellate zoospores swim in the water column and, on encountering a susceptible host, attach and germinate to produce invasive vegetative hyphae. Free-swimming zoospores appear to be chemotactically attracted to crayfish cuticle (Cerenius & Söderhäll, 1984a) and often settle on the cuticle near a wound (Nyhlen & Unestam, 1980). Zoospores are capable of repeated encystment and re-emergence, extending the period of their infective viability (Cerenius & Söderhäll, 1984b). Growth and sporulation capacity is strain- and temperature-dependent (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

~~Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *A. astaci* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: noble crayfish (*Astacus astacus*), Danube crayfish (*A. leptodactylus*), signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*), *Austropotamobius torrentium*, *Austropotamobius pallipes*, *Orconectes limosus*, *O. immunis*, *Procambarus alleni* and *Potamon potamios*.~~

To date, all species of freshwater crayfish have to be considered as susceptible to infection with *A. astaci*. The outcome of an infection varies depending on species. All stages of European crayfish species, including the Noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender clawed or Turkish crayfish (*Astacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor are highly susceptible (Alderman, 1996; Alderman *et al.*, 1984; Rahe & Soyulu, 1989; Unestam, 1969b; 1976; Unestam & Weiss, 1970). Laboratory challenges have demonstrated that Australian species of crayfish are also highly susceptible (Unestam, 1976). North American crayfish such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Orconectes* spp. are infected by *A. astaci*, but under normal conditions the infection does not cause clinical disease or death. All North American crayfish species investigated to date have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969b; Unestam & Weiss, 1970) and it is therefore currently assumed that this is the case for any other North American species.

The only other crustacean known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) ~~but this was reported only under laboratory conditions~~ (Benisch, 1940; Schrimpf *et al.*, 2014).

2.2.2. Susceptible stages of the host

All live stages should be considered as susceptible to infection.

2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

The host species susceptible to infection with *A. astaci* fall largely into two categories: those highly susceptible to infection with development of clinical disease and mortalities, and those which are infected without associated clinical disease or mortalities.

Highly susceptible species: in natural clinical disease outbreaks of crayfish plague, caused by infection with *A. astaci* are generally known as 'crayfish plague' outbreaks. In such outbreaks, moribund and dead crayfish of a range of sizes (and therefore ages) can be found.

In North American crayfish species, the prevalence of infection tends to be lower in animals that have gone through a recent moult (B. Oidtmann, unpublished data). However, large scale systematic thorough studies have not been undertaken to corroborate these observations. Juvenile crayfish go through several moults per year, whereas adult crayfish usually moult at least once per year in temperate climates. Therefore, animals in which the last moult was some time ago may show higher prevalence compared with animals that have recently moulted.

2.2.4. Target organs and infected tissue

The tissue that becomes initially infected is the exoskeleton cuticle. Soft cuticle, as is found on the ventral abdomen and around joints, is preferentially affected. In the highly susceptible European crayfish species, the pathogen often manages to penetrate the basal lamina located underneath the epidermis cell layer. From there, *A. astaci* spreads throughout the body primarily by invading connective tissue and haemal sinuses; however, all tissues may be affected.

In North American crayfish species, infection is usually restricted to the cuticle. Based on PCR results, the tailfan (consisting of uropods and telson) and soft abdominal cuticle appear to be frequently infected (Oidtmann *et al.*, 2006; Vrålstad *et al.*, 2011).

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

A number of North American crayfish species have been investigated for their susceptibility to infection shown to be infected with *A. astaci* and disease (Oidtmann *et al.*, 2006; Unestam, 1969a; Unestam & Söderhäll, 1977). So far, infection has been consistently shown in all North American crayfish species tested to date. Animals investigated were usually clinically healthy. Infected naturalised or aquaculture-reared North American crayfish populations usually do not develop clinical disease or increased mortalities (Oidtmann *et al.*, 2006; Strand *et al.* 2011; 2012).

This is supported by a recent study where the chances of detecting an *A. astaci* positive signal crayfish were shown to increase significantly with increasing crayfish length. Furthermore, large female crayfish expressed significantly higher levels of *A. astaci* than large males (Vrålstad *et al.*, 2011). The results probably reflect the decreased moult frequency of larger mature individuals compared with smaller immature crayfish (Reynolds, 2002), where mature females tend to moult even less frequently than mature males (Skurdal & Qvenild, 1986).

Based on the observations made in North American crayfish species, it seems reasonable to assume that all crayfish species native to the North American continent can be infected with *A. astaci* without development of clinical disease and they may therefore act as lifelong carriers of the pathogen.

A recent report from Finland also suggests that noble crayfish populations in cold water environments may be chronically infected at low prevalence (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

2.2.6. Vectors

Finfish movement may facilitate the spread of *A. astaci* in a number of ways, such as through the presence of spores in the digestive tract of fish, transport water, co-transport of infected crayfish specimens, or a combination of both (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (nets, boots clothing, etc.) (Alderman *et al.*, 1987). There is good field and experimental evidence that movements of fish from areas in which crayfish plague is active can transmit infection from one watershed to another (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2006).

Fomites: The spread of *A. astaci* can also be linked to contaminated equipment (nets, boots, clothing etc.).

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

A number of studies have shown that crayfish species native to North America can act as carriers of *A. astaci* (e.g. signal crayfish, spiny cheek crayfish, red swamp crayfish (Alderman *et al.*, 1990; Oidtmann *et al.*, 2006). Since all North American species tested to date have been shown to be potential carriers of the disease, it is also assumed that North American species not tested to date are likely to act potentially as carriers of *A. astaci*. North American species are wide spread in several regions of Europe.

Annexe 20 (suite)

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, as may occur during fish-movements of finfish, or 3) through colonisation of habitats by North American crayfish species.

Transmission from crayfish to crayfish occurs, ~~in short~~, through the release of zoospores from an infected animal and attachment of ~~such the~~ zoospores to a naïve crayfish. The zoospores of *A. astaci* swim actively in the water column and have been demonstrated to show positive chemotaxis towards crayfish (Cerenius & Söderhäll, 1984a).

The main route of spread of ~~crayfish plague~~ *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms (Alderman, 1996; Dehus *et al.*, 1999). ~~Nowadays~~, Spread now mainly occurs through expanding populations of North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Edsman, 2004; ~~Oidtmann *et al.*, 2005~~).

Colonisation of habitats, initially occupied by highly susceptible species, by North American crayfish species carrying *A. astaci* is likely to result in an epizootic epidemic among the highly susceptible animals. The velocity rate of spread will depend, among other factors, on the prevalence of infection in the population of North American crayfish.

Finfish transports may facilitate the spread of *A. astaci* in a number of ways, such as through the presence of spores in the transport water, ~~*A. astaci* surviving on fish skin~~, co-transport of infected crayfish specimens, or a combination of both all three (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (nets, boots clothing, etc.) (Alderman *et al.*, 1987).

2.3.2. Prevalence

In the highly susceptible European crayfish species, exposure to *A. astaci* spores usually is considered to leads to infection and eventually to death. The minimal-minimum infectious dose has still not been established, but it may be as low as a single spore per animal (B. Oidtmann, unpublished data). Prevalence of infection within a population in the early stage of an outbreak may be low (~~only one or a few animals in a river population may be affected~~). However, the pathogen is amplified in affected animals and subsequently released into the water; usually leading to 100% mortality in a contiguous population. The velocity-rate of spread from initially affected animals depends on several factors, one being water temperature (~~Oidtmann *et al.*, 2005~~). Therefore, the time from first introduction of the pathogen into a population to noticeable crayfish mortalities can vary greatly and may range from a few weeks to months. Prevalence of infection will gradually increase over this time and usually reach 100%. Data from a noble crayfish population in Finland that experienced an acute mortality event due to infection with *A. astaci* outbreak of crayfish plague in 2001 and that was followed in subsequent years suggest that in sparse noble crayfish populations, spread of disease throughout the host population may be take prolonged over a time span of several years (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

Prevalence in North American crayfish appears to vary greatly. Limited studies suggest prevalences ranging from between 0 and 100% are possible (Oidtmann *et al.*, 2006).

2.3.3. Geographical distribution

First in Europe the reports of large ~~crayfish~~ mortalities of crayfish go back to 1860 in Italy (Ninni, 1865; Seligo, 1895). These were followed by further reports of crayfish mortalities, where no other aquatic species were affected, in the Franco-German border region in the third quarter of the 19th century. From there a steady spread of infection occurred, principally in two directions: down the Danube into the Balkans and towards the Black Sea, and across the North German plain into Russia and from there south to the Black Sea and north-west to Finland and, in 1907, to Sweden. In the 1960s, the first outbreaks in Spain were reported, and in the 1980s further extensions of infection to the British Isles, Turkey, Greece and Norway followed (Alderman, 1996). The reservoir of the original infections in the 19th century was never established. *Orconectes* spp. were not known to have been introduced into

~~Europe~~ until the 1890s, but the post-1960s extensions are largely linked to ~~movements more recent introductions~~ of North American crayfish introduced more recently for purposes of crayfish farming Alderman, 1996). Escapes of ~~such the~~ introduced species ~~were almost impossible to prevent occurred~~ and *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii* are now widely naturalised in many parts of Europe.

~~As North American crayfish serve as a reservoir of *A. astaci*, any areas where North American crayfish species are found should be considered as areas where *A. astaci* is present (unless shown otherwise).~~

Australia and New Zealand have never experienced any outbreaks of infection with *A. astaci* crayfish plague to date and are currently considered free from ~~the~~ infection with *A. astaci* (OIE WAHID website, accessed June 2016).

2.3.4. Mortality and morbidity

When the infection first reaches a naïve population of highly susceptible crayfish species, high levels of mortality are usually observed within a short space of time, so that in areas with high crayfish densities the bottoms of lakes, rivers and streams are covered with dead and dying crayfish. A band of mortality will spread quickly from the initial outbreak site downstream, whereas upstream spread is slower. Where population densities of susceptible crayfish are low fewer zoospores will be produced, the spread of infection will be slower and evidence of mortality less dramatic. Water temperature may affect the speed of spread and this is most evident in low-density crayfish populations where animal-to-animal spread takes longer and challenge intensity will be lower. Lower water temperatures and reduced numbers of zoospores are associated with slower mortalities and a greater range of clinical signs in affected animals (Alderman *et al.*, 1987). Observations from Finland suggest that at low water temperatures, noble crayfish can be infected for several months without the development of noticeable mortalities (S. Viljamaa-Dirks, unpublished data).

On rare occasions, single specimens of the highly susceptible species have been found after a wave of infection with *A. astaci* crayfish plague has gone through a river or lake. This is most likely to be due to lack of exposure of these animals during an outbreak (animals may have been present in a tributary of a river or lake or in a part of the affected river/lake that was not reached by spores, or crayfish may have stayed in burrows during the ~~epizootic crayfish plague wave~~). However, low-virulent strains of ~~crayfish plague *A. astaci*~~ have been described to persist in a water way, kept alive by a weak infection in the remnant population (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Although remnant populations of susceptible crayfish species remain in many European watersheds, the dense populations that existed 150 years ago are now heavily diminished (Alderman, 1996; Souty-Grosset *et al.*, 2006). Populations of susceptible crayfish may re-establish, but once population density and geographical distribution is sufficient for susceptible animals to come into contact with infection, new outbreaks of infection with *A. astaci* crayfish plague in the form of and large-scale mortalities will occur.

2.3.5. Environmental factors

Under laboratory conditions, the preferred temperature range at which the *A. astaci* mycelium grows slightly varies depending on the strain. In a study, which compared a number of *A. astaci* strains that had been isolated from a variety of crayfish species, mycelial growth was observed between 4 and 29.5°C, with the strain isolated from *Procambarus clarkii* growing better at higher temperatures compared to the other strains. Sporulation efficiency was similarly high for all strains tested between 4 and 20°C, but it was clearly reduced for the non-*P. clarkii* strains at 25°C and absent at 27°C. In contrast, sporulation still occurred in the *P. clarkii* strain at 27°C. The proportion of motile zoospores (out of all zoospores observed in a zoospore suspension) was almost 100% at temperatures ranging from 4–18°C, reduced to about 60% at 20°C and about 20% at 25°C in all but the *P. clarkii* strain. In the *P. clarkii* strain, 80% of the zoospores were still motile at 25°C, but no motile spores were found at 27°C (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

Field observations show that ~~crayfish plague outbreaks of infection with *A. astaci*~~ occur over a wide temperature range, and at least in the temperature range from 4–20°C. The ~~velocity rate~~ of spread within a population depends on several factors, including water temperature. In a temperature range between 4 and 16°C, the speed of an epizootic epidemic is enhanced by higher water temperatures. At low water temperatures, the epizootic epidemic curve can increase very slowly and the period during which mortalities are observed can be several months (B. Oidtmann, unpublished data).

Annexe 20 (suite)

In buffered, redistilled water, sporulation occurs between pH 5 and 8, with the optimal range being pH 5–7. The optimal pH range for swimming of zoospores appears to be in a pH range from 6.0–7.5, with a maximum range between pH 4.5 and 9.0 (Unestam, 1966).

Zoospore emergence is influenced by the presence of certain salts in the water. CaCl_2 stimulates zoospore emergence from primary cysts, whereas MgCl_2 has an inhibitory effect. In general, zoospore emergence is triggered by transferring the vegetative mycelium into a medium where nutrients are absent or low in concentration (Cerenius & Söderhäll, 1984b).

2.4. Control and prevention

Once *A. astaci* has been introduced into a population of highly susceptible crayfish species in the wild, the spread within the affected population cannot be controlled. Therefore, prevention of introduction is essential. The following measures are necessary to prevent introduction via identified pathways:

1. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
2. When fish-transfers of finfish are being planned, ~~whether~~ the water source should be assessed for the likelihood that it may harbour infected crayfish (including North American carrier crayfish) ~~should be assessed~~.
3. Any fish-movements of finfish from the site of a current ~~epizootic epidemic of~~ infection with *A. astaci* crayfish plague carry a high risk of spread and should be avoided.
4. If fish-movements of finfish from a source containing North American crayfish are being planned, harvest methods at the source site should ensure that: a) crayfish are not accidentally co-transported; b) the transport water does not carry *A. astaci* spores, and, c) equipment is disinfected between use; d) the consignment does not become contaminated during transport.
5. The release of North American crayfish into the wild in areas where any of the highly susceptible species are present should be prevented. Once released, North American crayfish tend to spread, sometimes over long distances. If release into the wild is planned, then ~~Therefore~~ prior to any planned release, a risk assessment should be conducted to estimate ~~careful consideration needs to be given to~~ the long-term potential consequences of such a release. Highly susceptible crayfish populations at a distance from the release site may eventually be affected.
6. Aquaculture facilities for the cultivation of crayfish are very rarely suitable for preventing the spread of crayfish from such sites. Therefore, should careful consideration need to be given as to whether such facilities should be established. Biosecurity measures to ensure crayfish do not escape from aquaculture facilities are extremely difficult to implement. Therefore, a risk assessment needs to be conducted to determine whether these facilities should be established.

Certain pathways of introduction, such as the release of North American crayfish by private individuals are difficult to control.

2.4.1. Vaccination

Currently, there is no evidence that vaccines offer long-term protection in crustaceans and even if this were not to be the case, vaccination of natural populations of crayfish is ~~impossible~~ not practical.

2.4.2. Chemotherapy

No treatments are currently known that can successfully treat the highly susceptible crayfish species, once infected.

2.4.3. Immunostimulation

No immunostimulants are currently known that can successfully protect the highly susceptible crayfish species against infection and consequent disease due to *A. astaci* infection.

2.4.4. ~~Resistance~~ **Breeding for resistance**

In the 125 years since ~~infection with *A. astaci* crayfish plague~~ first occurred in Europe, there is little evidence of resistant populations of European crayfish. However, the fact that North American crayfish generally do not ~~are not very susceptible to developing clinical disease~~ suggests that selection for resistance may be possible and laboratory studies using attenuated strains of *A. astaci* might be successful. However, there are currently no published data from referring to such studies.

2.4.5. Restocking with resistant species

North American crayfish have been used in various European countries to replace the lost stocks of native crayfish. However, since North American crayfish is considered a susceptible species are potential hosts for *A. astaci*, restocking with North American crayfish may provide a reservoir would further the spread of *A. astaci*. This would minimise the chances for success of re-introduction of indigenous species. A risk assessment should be conducted to assist in decisions on restocking. ~~Given the high reproduction rates and the tendency of several North American crayfish species to colonise new habitats, restocking with North American crayfish species would largely prevent the re-establishment of the native crayfish species.~~

2.4.6. Blocking agents

No data available.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Limited information is available on the susceptibility of crayfish eggs to infection with *A. astaci*. Unestam & Söderhäll (1977) mention that they experimentally exposed *Astacus astacus* and *P. leniusculus* eggs to zoospore suspensions and were unable to induce infection. However, the details of these studies have not been published.

Although published data are lacking, disinfection of larvae, once infected, is unlikely to be successful, since *A. astaci* would be protected from disinfection by the crayfish cuticle, in which it would be present.

2.4.8. General husbandry practices

If a crayfish farm for highly susceptible species is being planned, it should be carefully investigated whether North American crayfish species are in the vicinity of the planned site or whether North American crayfish populations may be present upstream (for sites that are “online” on a stream or abstracting water from a stream), even if at a great distance upstream. If North American crayfish are present, there is a high likelihood that susceptible farmed crayfish will eventually become infected.

In an endemic area established site, where the highly susceptible species are being farmed, the following biosecurity recommendations should be followed to avoid an introduction of *A. astaci* onto the site:

- 1-6. General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when entering the site is entered; investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, finfish) only from sources known to be free from infection with *A. astaci*).
- 2-4. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
- 3-2. If fish transfers of finfish or crayfish are being planned, these should not come from streams or other waters that harbour potentially infected crayfish (either susceptible crayfish populations that are going through a current outbreak of infection with *A. astaci* crayfish plague or North American carrier crayfish).
- 4-3. North American crayfish should not be brought onto the site.
- 5-4. Finfish obtained from unknown freshwater sources or from sources, where North American crayfish may be present or a current outbreak of infection with *A. astaci* crayfish plague may be taking place, must not be used as bait or feed for crayfish, unless they have been subject to a temperature treatment to kill *A. astaci* (see Section 2.1.3).

Annexe 20 (suite)

- ~~5-5.~~ Any equipment that is brought onto site should be disinfected.
6. ~~General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when site investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, fish) only from sources known to be free of crayfish plague infection with *A. astaci*).~~

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

In the case of a suspected outbreak of ~~infection with *A. astaci* crayfish plague~~ in a population of highly susceptible crayfish species, the batch of crayfish selected ~~to identify for investigation for the presence of *A. astaci*~~ should ideally consist of: a) live crayfish showing signs of disease, ~~and~~ b) live crayfish appearing to be still healthy, ~~and, c) Dead crayfish that~~ may also be suitable, although this will depend on their condition.

Live crayfish should be transported using polystyrene containers equipped with small holes to allow aeration, or an equivalent container. The temperature in the container should not exceed 16°C.

The container should provide insulation against major temperature differences outside the container. In periods of hot weather, freezer packs should be used to ~~avoid ensure that~~ temperatures ~~are not~~ deleterious to the animals. These can be attached at the inside bottom of the transport container. ~~However, t~~The crayfish must ~~however~~ be protected from direct contact with freezer packs. This can be achieved using, for instance, cardboard or a several layers of newspaper.

Crayfish should be transported in a moist atmosphere, for example using moistened wood shavings/wood wool, newspaper or grass/hay. Unless transport water is sufficiently oxygenated, live crayfish should not be transported in water, as they may suffocate ~~from lack of oxygen~~.

The time between sampling of live animals and delivery to the investigating laboratory should not exceed 24 hours.

Should only dead animals be found at the site of a suspected outbreak, these might still be suitable for diagnosis. Depending on the condition they are in, they can either be: a) transported chilled (if they appear to have died only very recently), or, b) placed in non-methylated ethanol (minimum concentration 70%; see Section 3.2).

Animals showing advanced decay are unlikely to give a reliable result, however, if no other animals are available, these might still be tested.

3.2. Preservation of samples for submission

The use of non-preserved crayfish is preferred, as described above. ~~If, for practical reasons,~~ transport of recently dead or moribund crayfish cannot be arranged ~~quickly~~, crayfish may be fixed in ethanol (minimum 70%). However, fixation may reduce test sensitivity. The crayfish:ethanol ratio should ideally be 1:10 (1 part crayfish, 10 parts ethanol).

3.3. Pooling of samples

Not recommended.

3.4. Best organs or tissues

In highly susceptible species, the tissue recommended for sampling is the soft abdominal cuticle, which can be found on the ventral side of the abdomen.

In the North American crayfish species, sampling of soft abdominal cuticle, uropods and telson are recommended.

3.5. Samples or tissues that are not suitable

Autolytic material is not suitable for analysis.

4. Diagnostic methods

Large numbers of dead crayfish of the highly susceptible species with the remaining aquatic fauna being unharmed gives rise to a suspicion that the population may be affected by infection with *A. astaci* crayfish plague. Clinical signs of infection with *A. astaci* crayfish plague include behavioural changes and a range of visible external lesions. However, clinical signs are of limited diagnostic value. The main available diagnostic methods are PCR and isolation of the pathogen in culture media followed by confirmation of its identity. Isolation can be difficult and requires that samples are in good condition when they arrive at the investigating diagnostic laboratory (Oidtmann *et al.*, 1999). Molecular methods are now available that are less dependent on speed of sample delivery and can deal with a greater range of samples compared with methods relying on agent isolation (Oidtmann *et al.*, 2006; Vrålstad *et al.*, 2009).

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Highly susceptible species

Gross clinical signs are extremely variable and depend on challenge severity and water temperatures. The first sign of an epizootic crayfish plague mortality may be the presence appearance of numbers of crayfish at large during daylight (crayfish are normally nocturnal), some of which may show evident loss of co-ordination, in their movements, and easily falling over onto their backs and remaining unable to right themselves. Often, however, unless waters are carefully observed, the first sign that there is a problem will of an outbreak may be the presence of large numbers of dead crayfish in a river or lake (Alderman *et al.*, 1987)

In susceptible species, where sufficient numbers of crayfish numbers are sufficient present to allow infection to spread rapidly disease spread, particularly at summer water temperatures, infection will spread quickly and all the highly susceptible native crayfish within stretches of over 50 km may die lose all their highly susceptible native crayfish within less than 21 days or less from the first observed mortality (D. Alderman, pers. comm.). Infection with *A. astaci* Crayfish plague has unparalleled severity of effect, since infected susceptible crayfish generally do not survive. It must be emphasised, however, that the presence of large numbers of dead crayfish, even in crayfish plague affected watersheds, is not on its own sufficient for diagnosis. The general condition of other aquatic fauna must be assessed. Mortality or disappearance of other aquatic invertebrates, as well as crayfish, even though fish survive, may indicate pollution (e.g. insecticides such as cypermethrin have been associated with initial misdiagnoses).

North American crayfish species

Melanised cuticle has sometimes been suggested as a sign of infection with *A. astaci*. However, melanisation can have a wide variety of causes and is not a specific sign of infection with *A. astaci* infection. Conversely, animals without signs of melanisation are often infected.

4.1.2. Behavioural changes

Highly susceptible species

Infected crayfish of the highly susceptible crayfish species may leave their hides during daytime (which is not normally seen in crayfish), have a reduced escape reflex, and progressive paralysis. Dying crayfish are sometimes found lying on their backs. The animals are often no longer able to upright themselves. Occasionally, the infected animals can be seen trying to scratch or pinch themselves.

North American crayfish species

Infected North American crayfish do not show any behavioural changes (B. Oidtmann, unpublished data).

Annexe 20 (suite)**4.2. Clinical methods****4.2.1. Gross pathology***Highly susceptible species*

Depending on a range of factors, the foci of infection in crayfish may be seen by the naked eye or may not be discernable despite careful examination. Such foci can best be seen under a low power stereo microscope and are most commonly recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases a brown colouration of cuticle and muscle may occur, and in others, hyphae are visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle itself. Sites for particular examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and abdomen, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint and finally the gills.

North American crayfish species

Infected North American crayfish can sometimes show melanised spots in their soft cuticle, for example the soft abdominal cuticle. However, it must be stressed that these melanisations can be caused by mechanical injuries or infections with other water moulds and are very unspecific. Conversely, visible melanisation is not always associated with carrier status. Infected animals can appear completely devoid of visible melanisations.

4.2.2. Clinical chemistry

No suitable methods available.

4.2.3. Microscopic pathology

Unless the selection of tissue for fixation has been well chosen, *A. astaci* hyphae can be difficult to find in stained preparations. A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used. Additionally ~~However~~, such material does not prove that any hyphae observed are those of *A. astaci*. A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used.

See also Section 4.2.4.

4.2.4. Wet mounts

Small pieces of soft cuticle excised from the regions mentioned above (Section 4.2.1) and examined under a compound microscope using low to medium power will confirm the presence of aseptate fungal hyphae 7–9 µm wide. The hyphae can usually be found pervading the whole thickness of the cuticle, forming a three-dimensional network of hyphae in heavily affected areas of the cuticle. The presence of host haemocytes and possibly some melanisation closely associated with and encapsulating the hyphae give good presumptive evidence that the hyphae represent a pathogen rather than a secondary opportunist invader. In some cases, examination of the surface of such mounted cuticles will demonstrate the presence of characteristic *A. astaci* sporangia with clusters of encysted primary spores (see Section 4.3).

4.2.5. Smears

Not suitable.

4.2.6. Fixed sections

See section 4.2.3.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not suitable.

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

As indicated above (Section 4.2.4.), presumptive identification of *A. astaci* may be made from i) the presence of hyphae pervading the cuticle and ii) sporangia of the correct morphological types (see below) on the surface of crayfish exoskeletons.

4.3.1.1.2. Smears

Not suitable.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

Highly susceptible species

Care should be taken that animals to be used for isolation of *A. astaci* via culture cultivation are not exposed to desiccation.

Isolation methods have been described by Benisch (1940); Nyhlen & Unestam (1980); Alderman & Polglase (1986); Cerenius *et al.* (1988); Oidtmann *et al.* (1999) and Viljamaa-Dirks (2006).

Isolation medium (IM) according to Alderman & Polglase (1986): 12.0 g agar; 1.0 g yeast extract; 5.0 g glucose; 10 mg oxolinic acid; 1000 ml river water; and 1.0 g penicillin G (sterile) added after autoclaving and cooling to 40°C. River water is defined as any natural river or lake water, as opposed to demineralised water.

Any superficial contamination should first be removed from the soft intersternal abdominal cuticle or any other areas from which cuticle will be excised by thoroughly wiping the cuticle with a wet (using autoclaved H₂O) clean disposable paper towel. Simple aseptic excision of infected tissues, which are then placed as small pieces (3–5 mm²) on the surface of isolation medium plates, will normally result in successful isolation of *A. astaci* from moribund or recently dead (<24 hours) animals. Depending on a range of factors, foci of infection in crayfish may be easily seen by the naked eye or may not be discernable despite careful examination. Such foci can best be seen under a low-power stereo microscope and are most commonly recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases, a brown colouration of cuticle and muscle may occur, and in others, hyphae are visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle itself. Sites for particular examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and tail, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint and finally the gills.

Provided that care is taken in excising infected tissues for isolation, contaminants need not present significant problems. Small pieces of cuticle and muscle may be transferred to a Petri dish of sterile water and there further cut into small pieces with sterile instruments for transfer to isolation medium (IM). Suitable instruments for such work are scalpels, fine forceps and scissors.

To reduce potential contamination problems, disinfection of the cuticle with ethanol and melting a sterile glass ring 1–2 mm deep into the isolation medium can improve isolation success (Nyhlen & Unestam, 1980; Oidtmann *et al.*, 1999). The addition of potassium tellurite into the area inside the glass ring has been described (Nyhlen & Unestam, 1980).

Annexe 20 (suite)

Inoculated agar can be incubated at temperatures between 16°C and 24°C. The Petri dishes should be sealed with a sealing film (e.g. Parafilm¹) to avoid desiccation.

On IM agar, growth of new isolates of *A. astaci* is almost entirely within the agar except at temperatures below 7°C, when some superficial growth occurs. Colonies are colourless. Dimensions and appearance of hyphae are much the same in crayfish tissue and in agar culture. Vegetative hyphae are aseptate and (5)7–9(10) µm in width (i.e. normal range 7–9 µm, but observations have ranged between 5 and 10 µm). Young, actively growing hyphae are densely packed with coarsely granular cytoplasm with numerous highly refractile globules (Alderman & Polglase, 1986). Older hyphae are largely vacuolate with the cytoplasm largely restricted to the periphery, leaving only thin strands of protoplasm bridging the large central vacuole. The oldest hyphae are apparently devoid of contents. Hyphae branch profusely, with vegetative branches often tending to be somewhat narrower than the main hyphae for the first 20–30 µm of growth.

When actively growing thalli or portions of thalli from broth or agar culture are transferred to river water (natural water with available cations encourages sporulation better than distilled water), sporangia form readily in 20–30 hours at 16°C and 12–15 hours at 20°C. Thalli transferred from broth culture may be washed with sterile river water in a sterile stainless steel sieve, before transfer into fresh sterile river water for induction of sporulation. Thalli in agar should be transferred by cutting out a thin surface sliver of agar containing the ~~fungus-water mould~~ so that a minimum amount of nutrient-containing agar is transferred. Always use a large volume of sterile river water relative to the amount of ~~fungus-water mould~~ being transferred (100:1). Sporangia are myceloid, terminal or intercalary, developing from undifferentiated vegetative hyphae. The sporangial form is variable: terminal sporangia are simple, developing from new extramatrical hyphae, while intercalary sporangia can be quite complex in form. Intercalary sporangia develop by the growth of a new lateral extramatrical branch, which forms the discharge tube of the sporangium. The cytoplasm of such developing discharge tubes is noticeably dense, and these branches are slightly wider (10–12 µm) than ordinary vegetative hyphae. Sporangia are delimited by a single basal septum in the case of terminal sporangia and by septa at either end of the sporangial segment in intercalary sporangia. Such septa are markedly thicker than the hyphal wall and have a high refractive index. Successive sections of vegetative hypha may develop into sporangia, and most of the vegetative thallus is capable of developing into sporangia.

Within developing sporangia, the cytoplasm cleaves into a series of elongate units (10–25 × 8 µm) that are initially linked by strands of protoplasm. Although the ends of these cytoplasmic units become rounded, they remain elongate until and during discharge. Spore discharge is achlyoid, that is, the first spore stage is an aplanospore that encysts at the sporangial orifice and probably represents the suppressed saprolegniaceous primary zoospore. No evidence has been found for the existence of a flagellated primary spore, thus, in this description, the terms 'sporangium' not 'zoosporangium' and 'primary spore' not 'primary zoospore' have been used. Discharge is fairly rapid (<5 minutes) and the individual primary spores (=cytoplasmic units) pass through the tip of the sporangium and accumulate around the sporangial orifice. The speed of cytoplasmic cleavage and discharge is temperature dependent. At release, each primary spore retains its elongate irregularly amoeboid shape briefly before encystment occurs.

Encystment is marked by a gradual rounding up followed by the development of a cyst wall, which is evidenced by a change in the refractive index of the cell. The duration from release to encystment is 2–5 minutes. Some spores may drift away from the spore mass at the sporangial tip and encyst separately. Formation of the primary cyst wall is rapid, and once encystment has taken place the spores remain together as a coherent group and adhere well to the sporangial tip so that marked physical disturbance is required to break up the spore mass.

Encysted primary spores are spherical, (8)9–11(15) µm in diameter, and are relatively few in number, (8)15–30(40) per sporangium in comparison with other *Aphanomyces* spp. Spores remain encysted for 8–12 hours. Optimum temperatures for sporangial formation and discharge for the majority of European isolates of *A. astaci* are between 16 and 24°C (Alderman & Polglase, 1986).

¹ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

For some isolates, particularly from Spanish waters, slightly higher optimal temperatures may prevail (Dehus *et al.*, 1999). The discharge of secondary zoospores from the primary cysts peaks at 20°C and does not occur at 24°C. In new isolates of *A. astaci*, it is normal for the majority of primary spore cysts to discharge as secondary zoospores, although this varies with staling in long-term laboratory culture. Sporangial formation and discharge occurs down to 4°C. *A. astaci* does not survive at -5°C and below for more than 24 hours in culture, although -20°C for >48 hours may be required in infected crayfish tissues, nor does it remain viable in crayfish tissues that have been subject to normal cooking procedures (Alderman, 2000; Oidtmann *et al.*, 2002).

In many cases, some of the primary spores are not discharged from the sporangium and many sporangia do not discharge at all. Instead, the primary spores appear to encyst *in situ* within the sporangium, often develop a spherical rather than elongate form and certainly undergo the same changes in refractive index that mark the encystment of spores outside the sporangium. This within-sporangial encystment has been observed on crayfish. Spores encysted in this situation appear to be capable of germinating to produce further hyphal growth.

Release of secondary zoospores is papillate, the papilla developing shortly before discharge. The spore cytoplasm emerges slowly in an amoeboid fashion through a narrow pore at the tip of a papilla, rounds up and begins a gentle rocking motion as a flagellar extrusion begins and the spore shape changes gradually from spherical to reniform. Flagellar attachment is lateral (Scott, 1961); zoospores are typical saprolegniaceous secondary zoospores measuring 8 × 12 µm. Active motility takes some 5–20 minutes to develop (dependent on temperature) and, at first, zoospores are slow and uncoordinated. At temperatures between 16 and 20°C, zoospores may continue to swim for at least 48 hours (Alderman & Polglase, 1986).

Test sensitivity and specificity of the cultivation method can be very variable depending on the experience of the examiner, but in general will be lower than the PCR.

North American crayfish species

Isolation of *A. astaci* by culture following the methods described for the highly susceptible species usually fails. Currently, the recommended method for detecting infection in such species is by PCR.

4.3.1.2.2. *Antibody-based antigen detection methods*

None available.

4.3.1.2.3. *Molecular techniques*

Animals

In the case of a suspected outbreak of the disease in highly susceptible crayfish species, moribund or recently dead (<24 hours) crayfish are preferably selected for DNA extraction. Live crayfish can be killed using chloroform. If the only animals available are animals that have died a few days prior to DNA extraction, they can be tested, but a negative PCR result must be interpreted with caution as DNA degradation may have occurred. Endogenous controls can be used to assess whether degradation may have occurred. These should preferably use host tissues richer in host cells compared to the cuticle; cuticle itself contains very few host cell nuclei. If circumstances prevent delivery of crayfish to the specialist laboratory within 24 hours, fixation in 70% ethanol (≥3:1 ethanol to crayfish tissue) is possible, but may result in a reduction of the DNA yield.

DNA extraction

Where animals of the highly susceptible species are analysed, the soft abdominal cuticle is the preferred sample tissue for DNA extraction. Any superficial contamination should first be removed by thoroughly wiping the soft abdominal cuticle with a wet (using autoclaved H₂O) clean disposable paper towel. The soft abdominal cuticle is then excised and 30–50 mg ground in liquid nitrogen to a fine powder using a pestle and mortar (alternative grinding techniques may be used, but should be compared with the liquid nitrogen method before routine use). For carrier identification, 30–50 mg tissue from each soft abdominal cuticle, and telson and uropods are sampled and processed separately. DNA is extracted from the ground cuticle using a proteinase K-based DNA extraction method (e.g. DNeasy tissue kit; Qiagen, Hilden, Germany; protocol for insect tissue) following the manufacturer's instructions (Oidtmann *et al.*, 2006) or using a CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)-based assay (Vrålstad *et al.*, 2009). Negative controls should be run alongside the samples. Shrimp tissues may be used as negative controls.

Annexe 20 (suite)

4.3.1.2.3.1. PCR

Several PCR assays have been developed with varying levels of sensitivity and specificity. Two assays are described here that have proven highly sensitive and specific. Both assays target the ITS (internal transcribed spacer) region of the nuclear ribosomal gene cluster within the *A. astaci* genome. As should be standard for any PCR-based diagnostic tests, negative controls should be run alongside the samples to control for potential contamination. Environmental controls (using for example shrimp tissue as described above) and extraction blank controls from the DNA extraction should be included along with 'no template' PCR controls (template DNA replaced with molecular grade water). The no template PCR controls should include an environmental PCR control left open during pipetting of sample DNA.

Method 1:

This conventional PCR assay uses species-specific primer sites located in the ITS1 and ITS2 regions. Forward primer (BO 42) 5'-GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT-3' and reverse primer (BO 640) 5'-CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-3'. The PCR is carried out in a 50 µl reaction volume containing 1 × PCR buffer 75 mM Tris/HCl, pH 8.8, 20 mM [NH₄]₂SO₄, 0.01% (v/v) Tween 20), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dTTP, and dGTP, 0.5 µM of each primer, and 1.25 units of DNA polymerase (e.g. Thermoprime Plus DNA Polymerase; AB Gene, Epsom, UK) or equivalent Taq polymerase and 2 µl DNA template. The mixture is denatured at 96°C for 5 minutes, followed by 40 amplification cycles of: 1 minute at 96°C, 1 minute at 59°C and 1 minute at 72°C followed by a final extension step of 7 minutes at 72°C. Amplified DNA is analysed by agarose gel electrophoresis. The target product is a 569 bp fragment. Confirmation of the identity of the PCR product by sequencing is recommended. The assay consistently detects down to 500 fg of genomic target DNA or the equivalent amount of ten zoospores submitted to the PCR reaction (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Method 2:

This assay is a TaqMan minor groove binder (MGB) real-time PCR assay that targets a 59 bp unique sequence motif of *A. astaci* in the ITS1 region. Forward primer AphAstITS-39F (5'-AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT-3'), reverse primer AphAstITS-97R (5'-CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A-3') and TaqMan MGB probe AphAstITS-60T (5'-6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-CMG-BNF-Q-3') labelled with the fluorescent reporter dye FAM at the 5'-end and a non-fluorescent quencher MGBNFQ at the 3'-end. Real-time PCR amplifications are performed in a total volume of 25 µl containing 12.5 µl PCR Master Mix (e.g. Universal PCR Master Mix or Environmental PCR Master Mix, Applied Biosystems), 0.5 µM of the forward (AphAstITS-39F) and reverse (AphAstITS-97R) primers, 0.2 µM 200 nM of the MGB probe (AphAstITS-60T), 1.5 µl molecular grade water and 5 µl template DNA (undiluted and tenfold diluted). Amplification and detection is performed in Optical Reaction Plates sealed with optical adhesive film or similar on a real-time thermal cycler. The PCR programme consists of an initial decontamination step of 2 minutes at 50°C to allow optimal UNG enzymatic activity, followed by 10 minutes at 95°C to activate the DNA polymerase, deactivate the UNG and denature the template DNA, and successively 50 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 58°C. A dilution series with reference DNA of known DNA content should be run alongside with the samples.

The absolute limit of detection of this assay was reported as approximately 5 PCR forming units (= target template copies), which is equivalent to less than one *A. astaci* genome (Vrålstad *et al.*, 2009). Another study reported consistent detection down to 50 fg using this assay (Tuffs & Oidtmann, 2011).

The diagnostic test sensitivity of either assay largely depends on the quality of the samples taken. Where an ~~an crayfish plague~~ outbreak is investigated, the test sensitivity in animals that had died of infection with *A. astaci* crayfish plague 12 hours or less prior to sampling or in live crayfish showing clear clinical signs of disease is expected to be high. Studies to investigate the effect of sensitivity loss caused by deteriorating sample quality (for instance because of delayed sampling, processing or unsuitable storage of samples) have not been carried out. It is recommended that multiple (5–10) crayfish be tested, to compensate for variations in sample quality and invasion site of the pathogen.

Analytical test specificity has been investigated (Oidtmann *et al.*, 2006; Tuffs & Oidtmann, 2011; Vrålstad *et al.*, 2009) and no cross reaction was observed. However, owing to the repeated discovery of new *Aphanomyces* strains, sequencing is recommended to confirm diagnosis. In the case of the real-time PCR assay, this requires separate amplification of a PCR product, either using the primers as described in method 1, or using primers ITS 1 and ITS4 (see section 'sequencing' below).

4.3.1.2.3.2. Sequencing

A PCR product of 569 bp can be amplified using primers BO42 and BO640. The size of the PCR amplicon is verified by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel (e.g. using the Freeze n' Squeeze DNA purification system, Anachem, Luton, UK). Both DNA strands must be sequenced using the primers used in the initial amplification. The consensus sequence is generated using sequence analysis software and compared with published sequences using an alignment search tool such as BLAST. If 100% identity between the submitted sequence and the published sequences is found, then the amplified product is *A. astaci*. If the sequence is not 100% identical, further sequencing should be performed using primers ITS-1 (5'-TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G-3') and ITS-4 (5'-TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC-3') (White *et al.*, 1990), which generate an amplicon of 757 bp that provides sequence data in the same region, but expanded at both ends relative to the sequence generated by primers BO42 and BO640. This expanded sequence should confirm the identity of the pathogen to the species level.

Highly susceptible species

PCR (conventional or real-time) is a suitable method to investigate suspected outbreaks of infection with *A. astaci* crayfish plague outbreaks (see Section 7.1). Where the conditions of a suspect case are fulfilled, amplification of a PCR product of the expected size using conventional PCR or real-time PCR can be considered sufficient as a confirmatory diagnosis, if a high level of template DNA is detected. Where low levels of template DNA are detected (weak amplification) or the samples are investigated from a site not meeting the conditions of a suspect case, it is recommended to sequence PCR products generated as described under the section sequencing to confirm the diagnosis.

4.3.1.2.4. Agent purification

None available.

4.3.2. Serological methods

None available.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for diagnosis of clinical diseases resulting from infection with *A. astaci* in highly susceptible species are listed in Table 5.1. Methods for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection with *A. astaci* in highly susceptible species are displayed in Table 5.2.

Clinical disease is extremely rare in North American crayfish. Therefore a rating of methods for diagnosing clinical disease in these species is not provided. However, methods for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection in North American crayfish are listed in Table 5.3.

The designations used in the tables indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Annexe 20 (suite)

Table 5.1. ~~Crayfish plague~~ Diagnostic methods for infection with *A. astaci* in highly susceptible crayfish species

Method	Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
Gross and microscopic signs	b	d
Isolation and culture	b	d
Histopathology	d	d
PCR	a	b or a ¹
Real-time PCR	a	b or a ¹
Sequencing of PCR products	n/a	a
Transmission EM	∅-n/a	∅-n/a
Antibody-based assays	n/a	n/a
<i>In-situ</i> DNA probes	n/a	n/a

PCR = polymerase chain reaction; EM = electron microscopy;
n/a = not applicable or not available;
1 = see definitions of confirmed case in Section 7.1.

Table 5.2. Methods for targeted surveillance in highly susceptible crayfish species to declare freedom from ~~crayfish plague~~ infection with *A. astaci*

Method	Screening method	Confirmatory method
Inspection for gross signs and mortality	a	c
Microscopic signs (wet mounts)	c	c
Isolation and culture	c	b
Histopathology	d	d
PCR	a	b, possibly a ¹
Real-time PCR	a	b, possibly a ¹
Sequencing of PCR products	n/a	a
Transmission EM	∅-n/a	∅-n/a
Antibody-based assays	n/a	n/a
<i>In-situ</i> DNA probes	n/a	n/a

PCR = polymerase chain reaction; EM = electron microscopy;
n/a = not applicable or not available;
1 = see definitions of confirmed case in Section 7.1.

Table 5.3. *Methods for targeted surveillance in North American crayfish species to declare freedom from ~~crayfish plague~~ infection with *A. astaci**

Method	Screening method	Confirmatory method
Gross and microscopic signs	d	d
Isolation and culture	c	c
Histopathology	d	d
PCR	a	b
Real-time PCR	a	b
Sequencing of PCR products	n/a	a
Transmission EM	∅-n/a	∅-n/a
Antibody-based assays	n/a	n/a
<i>In-situ</i> DNA probes	n/a	n/a

/PCR = polymerase chain reaction; EM = electron microscopy;
n/a = not applicable or not available

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from ~~crayfish plague~~ infection with (*Aphanomyces astaci*)

6.1. Highly susceptible species

Crayfish farms keeping susceptible crayfish should be inspected at a frequency outlined in Chapter 2.2.0 *General information* (on diseases of crustaceans). A history of no mortalities (this does not include losses due to predation) occurring within the population over a period of at least 12 months combined with absence of clinical signs, as well as gross and microscopic pathology at the time of inspection are suitable methods for this purpose. Surveillance of wild crayfish stocks presents greater problems, especially where the species concerned is endangered. As movements of **both finfish and crayfish** stocks from infected waters present a risk of disease transmission, monitoring the status of crayfish populations to confirm that they remain healthy, is necessary.

In a **crayfish** farm setting, ~~an~~ infection with ~~crayfish plague~~ *A. astaci* ~~should~~ **would** be noticed relatively quickly, due to ~~the rapid~~ **a relatively quick** onset of mortalities in the farmed ~~crayfish~~ population.

To undertake targeted surveillance, regular inspections are recommended, where samples are collected if there is any suspicion of mortality or disease. If moribund or dead animals are found, it is recommended that samples are analysed by PCR and if PCR returns a positive result, that PCR products generated using primers 42 and 640, or ITS-1 and -4 are sequenced and the sequences analysed.

6.2. North American crayfish species

In North American crayfish species, animals should be sampled and analysed using one of the PCR assays described above. For reasons of higher sensitivity, the real-time PCR assay is the preferred method. This applies to both farmed and naturalised stocks, and surveillance programmes need to take into account the risks of indirect transmission by movements of fish.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

In highly susceptible crayfish species, infection with *A. astaci* shall be ~~is~~ suspected if at least one of the following criteria is met:

Annexe 20 (suite)

- i) Any extensive mortality solely of the highly susceptible species of freshwater crayfish where all other aspects of the flora and fauna, particularly other aquatic crustaceans, are normal and healthy.
- ii) The presence of gross and microscopic signs consistent with infection with *A. astaci*.
- iii) Isolation and culture of a water mould consistent with *A. astaci*.
- iv) A positive result for *A. astaci* by PCR.
- v) A positive result for *A. astaci* ~~or by~~ real-time PCR.

North American crayfish species

In Any population of North American crayfish is generally to be regarded as potentially infected with *A. astaci* species, infection with *A. astaci* shall be is suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result for *A. astaci* by PCR.
- ii) A positive result for *A. astaci* by real-time PCR.

7.2. Definition of confirmed case*Highly susceptible crayfish species*

Confirmation of presence of *A. astaci* by PCR or real-time PCR and sequencing.

In highly susceptible crayfish species, infection with *A. astaci* shall be is confirmed if at least two of the following criteria are met:

- i) Isolation and culture of a water mould consistent with *A. astaci*.
- ii) A positive result for *A. astaci* by PCR.
- iii) A positive result for *A. astaci* ~~or by~~ real-time PCR.
- iv) Sequenced PCR products that match known sequences of *A. astaci*.

~~Where (1) a crayfish mortality meets the definition of a suspect case and (2) PCR results indicate the presence of high levels of template DNA (in case of real-time PCR, this corresponds to Ct values ≤ 30), and (3) If the investigated suspect case is not the first case of detection of *A. astaci* in the a country or region zone previously considered free from infection with *A. astaci*, sequencing of PCR products should be conducted for; the PCR result alone may be considered sufficient as a confirmation.~~

In North American crayfish species, infection with *A. astaci* shall be is confirmed if at least two of the following criteria are met:

- i) A positive result for *A. astaci* by PCR
- ii) A positive result for *A. astaci* ~~or by~~ real-time PCR
- iii) Sequenced PCR products that match known sequences of *A. astaci*

North American crayfish species

Confirmation of presence of *A. astaci* by PCR or real-time PCR and sequencing

8. References

ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, 15, 603–632.

- ALDERMAN D.J. (2000). Summary final report: effects of exposure to high and low temperatures on the survival of the crayfish plague fungus *A. astaci* *in vitro* and *in vivo*. Australian Quarantine and Inspection Service, Canberra, Australia.
- ~~ALDERMAN D.J., HOLDICH D. & REEVE I. (1990). Signal crayfish as vectors in crayfish plague in Britain. *Aquaculture*, **86**, 3–6.~~
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquacult. Fish. Manage.*, *Aquac. Res.*, **16**, 203–205.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L., FRAYLING M. & HOGGER J. (1984). Crayfish plague in Britain. *J. Fish Dis.*, **7**, 401–405.
- BENISCH J. (1940). Kuenstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984a). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropod-parasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984b). Repeated zoospore emergence from isolated spore cysts of *Aphanomyces astaci*. *Exp. Mycol.*, **8**, 370–377.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshw. Crayfish*, **7**, 131–144.
- DEHUS P., BOHL E., OIDTMANN B., KELLER M., LECHLEITER S. & PHILLIPSON S. (1999). German conservation strategies for native crayfish species with regard to alien species. In: Crustacean Issues 11: Crayfish in Europe as Alien Species (How to Make the Best of a Bad Situation?), Gherardi F. & Holdich D.M., eds. A.A Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp. 149–160.
- DIEGUEZ DIEGUEZ-URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL SÖDERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.
- EDSMAN L. (2004). The Swedish story about import of live crayfish. *BFPP Bull. Fr. Poche Prot. Milieux Aquat.*, *Bull. Fr. Pêche Piscic.*, **372–373**, 281–288.
- HUANG, T.S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL SÖDERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–40 9.
- NINNI A.P. (1865). Sulla mortalita dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e piu particalarmenta nella provincia trevigiana. *Alti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.
- NYHLEN NYHLEN L. & UNESTAM T. (1980). Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**, 187–197.
- OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.
- OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.

Annexe 20 (suite)

OIDTMANN B., SCHMID I., ROGERS D. & HOFFMANN R. (1999). An improved isolation method for the cultivation of the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Freshw. Crayfish*, **12**, 303–312.

~~OIDTMANN B., THRUSH M., ROGERS D. & PEELER E. (2005). Pathways for transmission of crayfish plague, *Aphanomyces astaci*, in England and Wales. Meeting of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine. Nairn, Inverness, Scotland, 30.03–01.04.05, Poster.~~

RAHE R. & SOYLU E. (1989). Identification of the pathogenic fungus causing destruction to Turkish crayfish stocks (*Astacus leptodactylus*). *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 10–15.

REYNOLDS J.D. (2002). Growth and reproduction. In: *Biology of Freshwater Crayfish*, Holdich D.M., ed. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 152–191.

SCHRIMPF A., SCHMIDT T. & SCHULZ R. (2014). Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*). *Aquatic Invasions Aquat. Invasions*, **9**, 203–209.

SCOTT W.W. (1961). A monograph of the genus *Aphanomyces*. *Virginia Agricultural Research Station Technical Bulletin*, **151**, 1–95.

SELIGO A. (1895). Bemerkungen ueber die Krebspest, Wasserpest, Lebensverhaeltnisse des Krebses. *Zeitschrift fuer Fischerei und deren Hilfswissenschaften*, **3**, 247–261.

SKURDAL J. & QVENILD T. (1986). Growth, maturity and fecundity of *Astacus astacus* in Lake Steinsfjorden, S.E. Norway. *Freshw. Crayfish*, **6**, 182–186.

SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFNER P. (eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.

STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.

STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, **160**, 99–107.

SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.

TUFFS S. & OI DMANN B. (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153**, 345–353.

UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiol. Plant.*, **19**, 1110–1119.

UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiol. Plant.*, **22**, 221–235.

UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute Freshw. Res. Drottningholm*, **49**, 202–206.

UNESTAM T. (1976). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **53**, 349–359.

UNESTAM T. & SÖDERHÅLL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshw. Crayfish*, **3**, 321–331.

UNESTAM T. & WEISS D.W. (1970). The host-parasite relationship between freshwater crayfish and the crayfish disease fungus *Aphanomyces astaci*: responses to infection by a susceptible and a resistant species. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 77–90.

VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **31**, 182–188.

VRALSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R. E., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRALSTAD T., KNUTSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan[®] MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for Crayfish plague (infection with *Aphanomyces astaci*) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Crayfish plague (*Aphanomyces astaci*)

NB: FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHN) disease means is caused by infection with the pathogenic agent infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), of the Genus Penstyldensovirus, Family Parvoviridae, Genus Penstyldensovirus in the Family Parvoviridae (Bonami & Lightner, 1991; Bonami *et al.*, 1990; Lightner, 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b; Lotz *et al.*, 1995; Tang & Lightner, 2002).

Synonyms:The International Committee on Taxonomy of Viruses has assigned IHHNV (a parvovirus) as a tentative species in the genus *Brevidensovirus*, Family *Parvoviridae* with the species name of *PstDNV* (for *Penaeus stylirostris densovirus*) *Decapod penstyldensovirus 1* (Fauquet *et al.*, 2005; King *et al.*, 2012). For the purpose of this *Aquatic Manual*, most references to the viral agent of IHHN will be as IHHNV.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

IHHNV is the smallest of the known penaeid shrimp viruses. The IHHN-virion is a 20–22 nm, non-enveloped icosahedron, with a density of 1.40 g ml⁻¹ in CsCl, contains linear single-stranded DNA with an estimated a size of 3.9 kb, and has a capsid with four polypeptides of molecular weight 74, 47, 39, and 37.5 kD (Bonami *et al.*, 1990; Nunan *et al.*, 2000; GenBank AF218266).

At least two distinct genotypes of IHHNV have been identified (Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003b): Type 1 is from the Americas and East Asia (principally the Philippines). Type 2 is from South-East Asia. These genotypes are infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon*. Two putative related sequences homologous to part of the IHHNV genome are found embedded in the genome of penaeids. These were initially described as Type 3A from East Africa, India and Australia, and Type 3B from the western Indo-Pacific region including Madagascar, Mauritius and Tanzania (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). There is evidence that these sequences are not infectious to *P. vannamei* and *P. monodon* (Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2003b; 2007). IHHNV type 3A and type 3B related sequences have been found inserted into the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Tissues containing the putative IHHNV-homologous sequences in the *P. monodon* genome are not infectious to the susceptible representative-host species *P. vannamei* and *P. monodon* (Lightner *et al.*, 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer sets 309F/309R can distinguish the infectious forms of IHHNV from non infectious forms. Primer sets MG831F/MG831R will distinguish the non infectious forms of IHHNV.

2.1.2. Survival outside the host

No data.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

IHHNV is believed to be the most a stable virus of the known penaeid shrimp viruses. Infected virus; infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze-thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1987; 2009).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

Annexe 21 (suite)

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), yellowleg shrimp (*P. californiensis*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern white shrimp (*P. setiferus*), blue shrimp (*P. stylirostris*), and white leg shrimp (*P. vannamei*).

Most penaeid species can be infected with IHNV, including the principal cultured species, *P. monodon* (black tiger shrimp/prawn), *P. vannamei* (Pacific white shrimp), and *P. stylirostris* (Pacific blue shrimp).

IHNV infections are most severe in the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*, where the virus can cause acute epizootics and mass mortality (> 90%). In *P. stylirostris*, the juvenile and subadult life stages are the most severely affected (Bell & Lightner, 1984; 1987; Brock & Lightner 1990; Brock *et al.*, 1983; Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1983a).

IHNV causes the chronic disease runt deformity syndrome (RDS) in *P. vannamei* in which reduced, irregular growth and cuticular deformities, rather than mortalities, are the principal effects (Bray *et al.*, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Castille *et al.*, 1993; Kalagayan *et al.*, 1991; Lightner, 1996a; 1996b; Motte *et al.*, 2003). IHNV infection in *P. monodon* is usually subclinical, but RDS, reduced growth rates and reduced culture performance have been reported in IHNV-infected stocks (Chayaburakul *et al.*, 2004; Primavera & Quinitio, 2000).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing a species as susceptible to infection with IHNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Evidence is lacking for this species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is IHNV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: northern pink shrimp (*P. duorarum*), western white shrimp (*P. occidentalis*), kuruma prawn (*P. japonicus*), green tiger prawn (*P. semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, Argentine stiletto shrimp (*Artemesia longinaris*), Cuata swimcrab (*Callinectes arcuatus*), Mazatlan sole (*Achirus mazatlanus*), yellowfin mojarra (*Gerres cinereus*), tilapias (*Oreochromis sp.*), Pacific piquitinga (*Lile stolifera*) and blackfin snook (*Centropomus medius*).

2.2.32. Susceptible stages of the host

IHNV has been ~~detected~~ demonstrated in all life stages (i.e. eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) of *P. vannamei*. Eggs, produced by IHNV-infected females with high virus loads, were found to generally fail to develop and hatch. Those nauplii produced from infected broodstock that do hatch have a high prevalence of ~~infection with~~ IHNV infection (Motte *et al.*, 2003).

2.2.34. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

2.2.45. Target organs and infected tissue

IHNV infects and has been shown to replicate (using *in-situ* hybridisation [ISH] with specific DNA probes) in tissues of ectodermal and mesodermal origin from the embryo. Thus, the principal target organs include: the gills, cuticular epithelium (or hypodermis), all connective tissues, the haematopoietic tissues, the lymphoid organ, antennal gland, and the ventral nerve cord, its branches and its ganglia. The enteric organs (endoderm-derived hepatopancreas, midgut and midgut caeca mucosal epithelia) and smooth, cardiac, and striated muscle show no histological signs of infection with by IHNV and are usually negative for IHNV by ISH (Lightner, 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1992b).

2.2.56. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of *P. stylirostris* and *P. vannamei* populations that survive infection with IHHNV infections or epizootics, may carry the virus for life and pass the virus on to their progeny and other populations by vertical and horizontal transmission (Bell & Lightner 1984; Lightner, 1996a; 1996b; Morales-Covarrubias & Chavez-Sanchez, 1999; Motte *et al.*, 2003).

2.2.67. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.2.8. Known or suspected wild aquatic animal carriers

IHHNV is common in wild penaeid shrimp in South East Asia (*P. monodon*) and in the Americas (*P. vannamei*, *P. stylirostris* and other Pacific side wild penaeid species) (Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 1999).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission of IHHNV can be by horizontal or vertical routes. Horizontal transmission by cannibalism or by contaminated water (Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1983a; 1983b; 1985), and vertical transmission via infected eggs (Motte *et al.*, 2003) have been demonstrated.

2.3.2. Prevalence

In regions where the virus is enzootic in wild stocks, the prevalence of IHHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); and from 51 to 63% in *P. vannamei* collected from the Pacific coasts of Ecuador, Colombia and Panama (Motte *et al.*, 2003). Other penaeids collected during some of these surveys and found to be IHHNV positive included the brown shrimp, *P. californiensis* and the Western white shrimp *P. occidentalis*. In farms where IHHNV is present, its prevalence can range from very low to 100%, but high prevalence, approaching 100%, is typical (Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1988; 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1992a; 1983a; Martinez-Cordova, 1992).

2.3.3. Geographical distribution

IHHNV appears to have a world-wide distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Brock & Lightner, 1990; Lightner, 1996a; 1996b; Owens *et al.*, 1992). In the Western Hemisphere, IHHNV is commonly found in wild penaeid shrimp in the eastern Pacific from Peru to Mexico. Although infection with IHHNV has been reported from cultured *P. vannamei* and *P. stylirostris* in most of the shrimp-culturing regions of the Western Hemisphere and in wild penaeids throughout their range along the Pacific coast of the Americas (Peru to northern Mexico), the virus has not been reported in wild penaeid shrimp on the Atlantic coast of the Americas (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock & Main, 1994; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 1992a; Lightner & Redman, 1998a). Infection with IHHNV has also been reported in cultured penaeid shrimp from Pacific islands including the Hawaiian Islands, French Polynesia, Guam, and New Caledonia. In the Indo-Pacific region, the virus has been reported from cultured and wild penaeid shrimp in East Asia, South-East Asia, and the Middle East (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Lightner, 1996a).

An IHHN-like virus sequence has been reported from Australia (Krabsetsve *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1992), and the presence of infection with IHHNV in farmed prawns in Australia was reported to the OIE in 2008. As discussed in Section 2.1.1, IHHNV-related sequences have been found inserted into the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

Annexe 21 (suite)

2.3.4. Mortality and morbidity

~~Depending on the host. The effects of infection with IHHNV varies among shrimp species and the genotype of the virus, IHHNV may take three distinct forms: populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with IHHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon* under some conditions, infection with IHHNV results in a more subtle, chronic disease, runt-deformity syndrome (RDS), in which high mortalities are unusual, but significant where growth suppression and cuticular deformities are common. In the third situation, a large portion of the IHHNV genome has been found to be inserted in the genome of some genetic lines of *P. monodon*. There is evidence that in *P. monodon*, this inserted IHHNV sequence is not infectious to other penaeids (Tang & Lightner, 2002; 2006 (Kalagayan et al., 1991).~~

~~Infection with IHHNV interferes with normal egg, larval, and postlarval development: poor. When broodstock are used from wild or farmed stocks where the disease IHHNV is enzootic, hatching success of eggs is reduced, and poor survival and culture performance of the larval and postlarval stages is observed when broodstock are used from wild or farmed stocks where IHHNV is enzootic lowered (Motte et al., 2003).~~

~~Farmed Stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults may show persistently high mortality rates. In *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and possibly *P. monodon*, IHHNV infected stocks infected with IHHNV may show poor and highly disparate growth, poor overall culture performance, and cuticular deformities, particularly including especially-bent rostrums and deformed sixth abdominal segments.~~

~~Demonstration of eosinophilic to pale basophilic intranuclear inclusion bodies in the typical target tissues for IHHNV, as IHHNV intranuclear inclusion bodies are nearly identical in appearance to those occurring in the early stages of WSSV. IHHNV infections, their presence in tissue sections should be considered as a presumptive diagnosis of IHHNV until confirmed with a second test method, such as dot blot or ISH with IHHNV-specific DNA probes or positive PCR test results for IHHNV.~~

2.3.5. Environmental factors

The replication rate of IHHNV at high water temperatures was significantly reduced in a study in which viral replication was compared in *P. vannamei* experimentally infected and held at 24°C and 32°C. After a suitable incubation period, shrimp held at 32°C had approximately 10² times lower viral load than shrimp held at 24°C. However, even at the higher temperature, significant (up to 10⁵ virus copies 50 ng⁻¹ of shrimp DNA) IHHNV replication still occurred in shrimp held at 32°C (Montgomery-Brock et al., 2007).

2.4. Control and prevention**2.4.1. Vaccination**

No effective vaccination methods for IHHNV have been developed.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Resistance breeding Breeding for resistance

Selected stocks of *P. stylirostris* that are resistant to infection with IHHNV disease have been developed and these have had some successful application in shrimp farms (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; 1996b; Weppe 1992; Zarian-Herzberg & Ascencio-Valle, 2001). ~~Some selected~~ However lines of *P. stylirostris* bred for IHHNV disease resistance to infection with IHHNV were found to be refractory to infection (Tang et al., 2000). However, such stocks do not have increased resistance to other diseases, such as white spot syndrome virus (WSSV), and, hence, so their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren et al., 1997).

2.4.5. Restocking with resistant species

There has been some limited application and success with ~~IHHNV-disease~~-resistant *P. stylirostris* (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarin-Herzberg & Ascencio 2001). The relative resistance of *P. vannamei* to ~~IHHN-disease-infection with IHHNV, despite infection by IHHNV,~~ is considered to be among the principal factors that led to *P.vannamei* being the principal shrimp species farmed in the Western Hemisphere and, since 2004, globally (Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; ~~Rosenberry, 2004~~).

2.4.6. Blocking agents

~~There are reports of shrimp with high viral loads of IHHNV being resistant to infection by WSSV (Bonnichon *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2003a). However, there~~ There are no reports to date for IHHNV blocking agents.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

IHHNV is transmitted vertically by the transovarian route (Motte *et al.*, 2003). Hence, while disinfection of eggs and larvae is good management practice (Chen *et al.*, 1992) and is recommended for its potential to reduce IHHNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them (and contamination by other disease agents), the method is not effective for preventing transovarian transmission of IHHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been successful ~~applied to in~~ preventing the spread ~~on~~ of IHHNV ~~infections and disease~~. Among these has been the application of PCR pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii, and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001; Motte *et al.*, 2003), as well as the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992). The latter has proven to be the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with IHHNV (Jaenike *et al.*, 1992; Lightner, 2005; Pruder *et al.*, 1995). ~~Unfortunately, there is a misconception in the industry that SPF is a genetic trait rather than a condition of health status (Lightner *et al.*, 2009). The development of SPF *P. vannamei* that were free not only of IHHNV, but also of all the major known pathogens of penaeid shrimp, has resulted in the introduction of the species to Asia and to its surpassing *P. monodon* in 2005 as the dominant farmed shrimp species in Asia as well as the Americas where the SPF stocks were developed (FAO, 2006; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Rosenberry, 2004).~~

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

~~Suitable specimens for testing for infection by with IHHNV are all life stages (eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) (Motte *et al.*, 2003). While infection with IHHNV may ~~infect~~ affect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages ~~may not be~~ are not suitable samples for ~~IHHNV~~ detection or certification of for IHHN-disease freedom from infection with IHHNV.~~

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, subadults and adults. However, for eggs, larvae and postlarvae, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 postlarvae depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

Annexe 21 (suite)

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing.

3.4. Best organs and tissues

IHHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHHNV include connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a). Hence, whole shrimp (e.g. larvae or postlarvae) or tissue samples containing the aforementioned target tissues are suitable for most tests using molecular methods.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used for testing (usually for PCR, or dot-blot hybridisation with specific probes) when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a).

3.5. Samples or tissues that are not suitable

IHHNV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of ~~infection by~~ IHHNV (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Certain cuticular deformities, specifically a deformed rostrum bent to the left or right, which may be presented by *P. vannamei* and *P. stylirostris* with RDS, are pathognomonic for infection ~~with~~ by IHHNV (see Section 4.2.1.2). However, this clinical sign is not always apparent in shrimp populations chronically infected with IHHNV. As *P. vannamei*, *P. stylirostris*, and *P. monodon* can be infected by IHHNV and not present obvious signs of infection (e.g. they may show markedly reduced growth rates or 'runting'), molecular tests are recommended when evidence of freedom from infection with IHHNV ~~disease~~ is required.

4.1.2. Behavioural changes

In acute ~~IHHN~~ disease, *P. stylirostris* may present behavioural changes (see Section 4.2.1.1) but with RDS, no consistent behavioural changes have been reported for affected shrimp.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

4.2.1.1. Infection with IHHNV ~~disease~~ in *Penaeus stylirostris*

Infection with IHHNV ~~is often causes an acute disease~~ with very high mortalities occurring in juveniles life stages of this species. Vertically infected larvae and early postlarvae do not become diseased, but in approximately 35-day-old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size or age dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock *et al.*, 1983; Brock & Main, 1994; Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 2011; Lightner *et al.*, 1983a, 1983b). Gross signs ~~are not of infection with IHHNV~~ are not specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species with infection with IHHNV have been observed to rise slowly in culture tanks to the water surface, where they become motionless and then roll-over and slowly sink (ventral side up) to the tank bottom. Shrimp exhibiting this behaviour may repeat the process for several hours until they become too weak to continue, or until they are attacked and cannibalised by their healthier siblings. *Penaeus stylirostris* at this stage of infection often have white or buff-coloured spots (which differ in appearance and location from the white spots that sometimes occur in shrimp with WSSV infections) in the cuticular epidermis, especially at the junction of the tergal plates of the abdomen, giving such shrimp a mottled appearance. This mottling later fades in moribund *P. stylirostris* as such individuals become more bluish. In *P. stylirostris* and *P. monodon* with terminal-phase infection with IHHNV ~~infections~~, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; ~~Lightner, 1983; 1988; 1993; 1996a; 2011;~~ Lightner *et al.*, 1983a; 1983b).

4.2.1.2. Infection with IHHNV disease in *Penaeus vannamei*

RDS, a chronic form of infection with IHHNV disease, occurs in *P. vannamei* as a result of IHHNV infection. The severity and prevalence of RDS in infected populations of juvenile or older *P. vannamei* may be related to infection that occurred during the larval or early postlarval PL-stages. RDS has also been reported in cultured stocks of *P. stylirostris* and *P. monodon*. Juvenile shrimp with RDS may display a bent (45° to 90° bend to left or right) or otherwise deformed rostrum, a deformed sixth abdominal segment, wrinkled antennal flagella, cuticular roughness, 'bubble-heads', and other cuticular deformities. Populations of juvenile shrimp with RDS display disparate growth with a wide distribution of sizes and many smaller than expected ('runted') shrimp. The coefficient of variation (CV = the standard deviation divided by the mean of different size groups within a population) for populations with RDS is typically greater than 30% and may approach 90%, while ~~IHHNV-free (and thus RDS-free)~~ populations of juvenile *P. vannamei* and *P. stylirostris* free from infection with IHHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Bray *et al.*, 1994; Brock & Lightner, 1990; Brock *et al.*, 1983; Brock & Main, 1994; Browdy *et al.*, 1993; Carr *et al.*, 1996; Lightner, 1996a; Primavera & Quinitio, 2000; Pruder *et al.*, 1995).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology

Acute ~~IHHNV~~ infections in *P. stylirostris* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stained ~~sections histological methods~~ (see Section 4.2.6). Chronic infection with IHHNV ~~IHHNV infections~~ and RDS are much more difficult to diagnose using routine H&E histological methods. For diagnosis of chronic infections, the use of molecular methods are recommended for IHHNV detection (e.g. by PCR or application of IHHNV-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or ISH of histological sections).

Histological demonstration of prominent intranuclear, Cowdry type A inclusion bodies provides a provisional diagnosis of infection with IHHNV ~~IHHNV infection~~. These characteristic IHHNV inclusion bodies are eosinophilic and often haloed (with H&E stains of tissues preserved with fixatives that contain acetic acid, such as Davidson's AFA and Bouin's solution) (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a), intranuclear inclusion bodies within chromatin-marginated, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by infection with IHHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.3.1.2.3 of this chapter) of such sections with a DNA probe specific to IHHNV provides a definitive diagnosis of infection with IHHNV ~~infection~~ (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

4.2.4. Wet mounts

No reliable methods have been developed for direct microscopic pathology.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

~~Histopathology: histology may be used to provide a definitive diagnosis of infection with IHHNV IHHNV infection. Because 10% buffered formalin and other fixatives provide, at best, only fair fixation of the shrimp,~~ the use of Davidson's fixative (containing 33% ethyl alcohol [95%], 22% formalin [approximately 37% formaldehyde], 11.5% glacial acetic acid and 33.5% distilled or tap water) is highly recommended for all routine histological studies of shrimp (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). To obtain the best results, dead shrimp should not be used. Only live, moribund, or compromised shrimp should be selected for fixation and histological examination. Selected shrimp are killed by injection of fixative directly into the hepatopancreas; the cuticle over the cephalothorax and abdomen just lateral to the dorsal midline is opened with fine-pointed surgical scissors to enhance fixative penetration (the abdomen may be removed and discarded), the whole shrimp (or cephalothorax) is immersed in fixative for 24 to 48 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol for storage. After transfer to 70% ethyl alcohol, fixed specimens may be transported (via post or courier to the diagnostic laboratory) by wrapping in cloth or a paper towel saturated with 70% ethyl alcohol and packed in leak-proof plastic bags (see Section 4.2.3).

Annexe 21 (suite)

In-situ hybridisation (see Section 4.3.1.2.3 below).

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Electron microscopy is not recommended for routine diagnosis of IHNV.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods****4.3.1.1. Microscopic methods***4.3.1.1.1. Wet mounts*

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See section 4.2.6.

4.3.1.2. Agent isolation and identification*4.3.1.2.1. Cell culture or artificial media*

IHNV has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Lightner & Redman, 1998a; 1998b).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

None has been successfully developed.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

Direct detection methods using DNA probes specific for IHNV are available in dot-blot and ISH formats. PCR tests for IHNV have been developed and a number of methods and commercial products using these methods PCR detection kits are readily available.

DNA probes for dot-blot and ISH applications: gene probe and PCR methods provide greater diagnostic specificity and sensitivity than ~~do more~~ traditional techniques for IHNV diagnosis that employ classic histological approaches. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp. A haemolymph sample may be taken with a tuberculin syringe, or an appendage (a pleopod for example) may be biopsied (Bell *et al.*, 1990), and used as the sample for a direct dot-blot hybridisation test.

~~*Dot blot hybridisation procedure for IHNV:* the probe is labelled with a non-radioactive label, digoxigenin-11-dUTP (DIG-11-dUTP). The system using DIG to label nucleic acid probes was developed by Boehringer Mannheim Biochemicals (this company is now owned by Roche Diagnostic Corporation), which is described in the Roche *DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide* and *DIG Application Manual for Filter Hybridization™ System User's Guide for Membrane Hybridization* and from Boehringer Mannheim's *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual* (Roche Applied Science, 2006a; 2006b). The protocols given below use a DIG-labelled probe to IHNV produced by one of several methods. Probes may be produced using a fragment of cloned IHNV DNA as the template by the random primed labelling method (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1993). An alternative method for producing DIG-labelled probes uses specific primers from the cloned IHNV DNA and the Roche PCR DIG-Probe Synthesis Kit™.~~

Dot-blot hybridisation procedure for IHNV: the dot-blot hybridisation method given below uses a digoxigenin-11-dUTP (DIG)-labelled DNA probe for IHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996a). Formulas for the required reagents are given after the protocols.

Annexe 21 (suite)

- i) Prepare a positively charged nylon membrane (~~Roche Diagnostics Cat. No. 1 209 299 or equivalent~~), cut ~~pieces to a size~~ to fit samples and controls and mark with a soft-lead pencil making 1 cm squares for each sample. Include a positive and a negative control on each filter. Lay out on to a piece of filter paper (Whatman 3MM).
- ii) If necessary, ~~dilute samples to can~~ be assayed ~~diluted~~ in TE (~~Tris/EDTA [ethylene diamine tetraacetic acid]-buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)~~ plus 50 µg ml⁻¹ salmon sperm DNA, using 4 µl sample in 9 µl buffer in 1.5 ml microcentrifuge tubes. Samples for dot-blots ~~blot hybridisation~~ can be haemolymph, tissues homogenised in TN (~~Tris/NaCl: 0.4 M NaCl and buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.4 M NaCl)~~), or extracted DNA in 10 mM Tris-HCl.
- iii) Boil samples for 40 ~~5~~ minutes and quench on ice for ~~5-1-2~~ minutes. ~~Briefly microfuge samples in the cold to bring down all liquid and to pellet any coagulated protein.~~ Keep on ice until samples are dotted on to the membrane.
- iv) Dot 1–3 µl of each sample on to an appropriate place on the filters. Allow to air-dry and then fix samples on to the membrane by baking at 80°C for 30 minutes or by UV cross-linking using a DNA transilluminator for 3 minutes.
- ~~v) Adjust a water bath to 68°C and prepare the prehybridisation solution. For a 10 × 15 cm membrane, prepare 8 ml per membrane. Set a stirring hot plate to 'low' and stir while warming the solution for 30 minutes until the blocking agent has dissolved and the solution is cloudy. Also, prepare some heat seal bags that are slightly larger in size than the membrane: five to six bags will be needed per membrane.~~
- v) Remove membranes from the oven or transilluminator and put into a heat-seal bag with 4 ml per membrane of prehybridisation solution. Seal the bags and put into a 68°C water bath for 30 minutes 1 hour.
- vi) Boil the DIG-labelled probe for 40–3–5 minutes and then keep on ice ~~and then microfuge in the cold to bring all the liquid down in the microcentrifuge tube. Keep on ice.~~ Remove the prehybridisation solution from the bags. Add 2 ml of fresh prehybridisation solution to each bag and then add the ~~correct~~, predetermined amount of DIG-labelled probe to each, mixing well as it is being added. Seal the bags, place back in the 68°C water bath and incubate for 8–12 hours.
- vii) Wash membranes well with:
- | | | |
|---|----------------|---|
| 2 × standard saline citrate (SSC/0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) | 2 × | 5 minutes at room temperature |
| 0.1 × SSC/0.1% SDS | 3 × | 15 minutes at 68°C |
| (use 4 ml/filter and seal in bags) | | |
| Buffer I | 1 × | 5 minutes at room temperature |
| Buffer II | 1 × | 30 minutes at room temperature |
| Buffer I | 1 × | 5 minutes at room temperature |
| (Buffers are prepared ahead of time). | | |
- viii) React the membrane in bags with anti-DIG AP ~~alkaline phosphatase~~ conjugate (Roche Diagnostics² 4-093-274) diluted 1/5000 in Buffer I. ~~Use 3 ml per membrane;~~ incubate for 30–45 minutes at room temperature on a shaker platform.
- ix) Wash membrane well with:
- | | | |
|------------|-----|--------------------------------|
| Buffer I | 2 × | 15 minutes at room temperature |
| Buffer III | 1 × | 5 minutes at room temperature |
- x) Develop the membranes in bags using ~~3 ml per membrane~~ of a development solution (nitroblue tetrazolium salt [NBT]/X-phosphate in Buffer III) made up just prior to use. React in the dark at room temperature for 1–2 hours. Stop the reactions in Buffer IV and dry the membranes on 3MM filter paper.
- xi) Photograph the results (colour fades over time).
- xii) Store dry membranes in heat-seal bags.

² Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Annexe 21 (suite)

In-situ hybridisation (ISH) procedure: the ISH method given below uses a DIG-labelled DNA probe for IHHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996a). ~~Formulas for the required reagents are given after the protocols.~~

- i) Embed tissue in paraffin and cut sections at 4–6 µm thickness. Place sections on to positively charged microscope slides (do not put gelatine in water to float sections; just use water).
- ii) Put slides in a slide rack, such as a Tissue-Tek rack. Heat the slides in an oven for 45 minutes at 60°C. In the staining centre, rehydrate the tissue as follows:

Xylene (or suitable substitute)	3 ×	5 minutes each
Absolute alcohol	2 ×	1 minute each
95% alcohol	2 ×	10 dips each
80% alcohol	2 ×	10 dips each
50% alcohol	1 ×	10 dips
Distilled water		six rinses (do not let slides dry out)
- iii) Wash the slides for 5 minutes in ~~phosphate buffered saline~~ (PBS (or Tris/NaCl/EDTA [TNE] buffer). Prepare fresh proteinase K at 100 µg ml⁻¹ in PBS (or TNE). Place slides flat in a humid chamber, pipette on 500 µl of the proteinase K solution and incubate for 10–15 minutes at 37°C. Drain fluid onto blotting paper.
- iv) Return slides to slide rack. Fix sections in 0.4% cold formaldehyde for 5 minutes at room temperature.
- v) Incubate slides in 2 × SSC for 5 minutes at room temperature.
- vi) With slides flat, add 0.5–1 ml prehybridisation buffer and incubate in a humid chamber for 15–30 minutes at 37°C.
- vii) Boil the DIG-labelled probe for ~~40~~ 3–5 minutes and quench on ice; spin briefly in the cold and keep on ice. Dilute the probe to 25 ng ml⁻¹ in prehybridisation solution and cover the tissue with 250 µl of the solution. Incubate the slides for 2–4 hours at 42°C or overnight at 37°C in a humid chamber. ~~Drain fluid onto blotting paper. During this incubation, pre-warm the wash buffers at 37°C.~~
- viii) Place slides in slide rack. Wash the slides as follows:

2 × SSC	2 ×	5–30 minutes at 37°C
1 × SSC	2 ×	5 minutes at 37°C
0.5 × SSC	2 ×	5 minutes at 37°C
- ix) Wash the slides for ~~5–1–3~~ minutes in Buffer I at room temperature. Put the slides flat in a humid chamber and block with 0.5 ml per slide of Buffer II. Incubate for 15 minutes at 37°C. ~~Drain the fluid on to blotting paper.~~
- x) Dilute the anti-DIG alkaline phosphatase conjugate (~~Roche Applied Science cat. 10686322~~) at a ratio of 1/1000 in Buffer II (~~1 µl anti-DIG AP per 1 ml buffer~~). Cover tissue with 500 µl of diluted conjugate and incubate in a humid chamber for 30 minutes at 37°C.
- xi) Place the slides in a slide rack. Wash in Buffer I twice for 5–10 minutes each time at room temperature. Wash once with Buffer III for ~~5–10~~ 1–2 minutes.
- xii) Prepare the development solution by first adding 4.5 µl NBT per 1 ml buffer III. Mix well. Then add 3.5 µl X-phosphate per ml of solution and mix well. Pipette on 500 µl per slide and incubate in a humid chamber in the dark for 2–3 hours at room temperature.
- xiii) Stop the reaction by returning the slides to a slide rack and washing in Buffer IV for 15 minutes at room temperature.
- xiv) Counterstain the slides by dipping for 5 minutes in 0.5% aqueous Bismarck brown Y.
- xv) Dehydrate the slides in the staining centre as follows:

95% alcohol	3 ×	10 dips each
Absolute alcohol	3 ×	10 dips each
Xylene (or suitable substitute)	4 ×	10 dips each

 Do not allow the slides to dry out – leave them in the last xylene (or xylene substitute) container until ready for cover-slips.
- xvi) Mount with cover-slips and mounting medium (Permount).

Annexe 21 (suite)

- xvii) Examine the slides under bright-field for a dark-blue or black precipitate that marks sites where IHNV DNA is present. Pathodiagnostic intranuclear Cowdry type A inclusions are well marked with the probe. Also often marked are host cell nuclei without obvious inclusions, cytoplasmic inclusions, and accumulation of free virus in the tissue spaces and haemolymph.

NOTE: Always run a known positive and negative control.

Reagent formulas for ISH method:

i) ~~10 × phosphate buffered saline~~

NaCl	160 g
KH ₂ PO ₄	4 g
Na ₂ HPO ₄	23 g
KCl	4 g
DD-H ₂ O	1950 ml (qs to 2 litres)

~~pH to 8.2 with NaOH; autoclave to sterilise; store at room temperature. To make 1 × PBS, dilute 100 ml 10 × PBS in 900 ml DD-H₂O; Filter 1 × solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

ii) 10 × Tris/NaCl/EDTA (TNE) buffer

Tris base	60.57 g
NaCl	5.84 g
EDTA	3.72 g
H ₂ O	900 ml (qs to 1 litre)

pH to 7.4 with concentrated or 5 M HCl. To make 1 × TNE, dilute 100 ml 10 × TNE in 900 ml DD-H₂O; Filter 1 × solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

iii) Proteinase K, 100 µg ml⁻¹ (prepare just prior to use)

PBS	10 ml 1 × PBS
Proteinase K	1 mg

iv) ~~0.4% formaldehyde~~

37% formaldehyde	5.4 ml
DD-H ₂ O	500 ml

~~Store at 4°C; can be reused up to four times before discarding.~~

vii) Prehybridisation buffer (50 ml final volume)

4 × SSC	10 ml 20 × SSC
50% formamide	25 ml 100% formamide
1 × Denhardt's	2.5 ml 20 × Denhardt's
5% dextran sulphate	10 ml 25% dextran sulphate
Warm to 60°C	

Boil 2.5 ml of 10 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA and add to buffer for final concentration of 0.5 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA; store at 4°C.

vi) ~~20 × SSC buffer~~

3M NaCl	175.32 g NaCl
0.3 M Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	88.23 g Na citrate·2H ₂ O
DD-H ₂ O	1000 ml (qs)

pH to 7.0; autoclave; store at 4°C.

To make 2 × SSC, dilute 100 ml 20 × SSC in 900 ml DD-H₂O; To make 1 × SSC, dilute 50 ml 20 × SSC in 950 ml DD-H₂O; To make 0.5 × SSC, dilute 50 ml 20 × SSC in 1950 ml DD-H₂O. Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C.

Annexe 21 (suite)

vii) ~~20 × Denhardt's solution~~

BSA (Fraction V)	0.4 g bovine serum albumin
Ficoll 400	0.4 g Ficoll
PVP 360	0.4 g polyvinylpyrrolidone
DD-H ₂ O	100 ml

~~Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C. Aliquot 2.5 ml into small tubes and store frozen.~~

viii) ~~25% dextran sulphate~~

Dextran sulphate	25 g
DD-H ₂ O	100 ml

~~Mix to dissolve; store frozen in 10 ml aliquots.~~

ix) ~~Salmon sperm DNA (10 mg ml⁻¹)~~

Salmon sperm DNA	0.25 g
DD-H ₂ O	25 ml

~~To prepare, warm the water and slowly add the DNA with stirring until completely dissolved; boil for 10 minutes; shear the DNA by pushing through an 18 gauge needle several times; aliquot 2.5 ml into small tubes and store frozen; boil for 10 minutes just before using to facilitate mixing in the buffer.~~

xiv) ~~10 × Buffer I~~

1 M Tris/HCl	121.1 g Tris base
1.5 M NaCl	87.7 g NaCl
DD-H ₂ O	1000 ml (qs)

~~pH to 7.5 with HCl. Autoclave; store at 4°C.~~

~~To make 1 × Buffer I, dilute 100 ml of 10 × stock in 900 ml DD-H₂O. Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

xv) ~~Buffer II (blocking buffer)~~

Blocking reagent	0.25 g Blocking reagent (Roche Diagnostics 1-096-176)
Buffer I	50 ml 1 × Buffer I

~~Store at 4°C for up to 2 weeks.~~

xvi) ~~Buffer III~~

100 mM Tris/HCl	1.21 g Tris base
100 mM NaCl	0.58 g NaCl
DD H ₂ O	100 ml (qs)
pH to 9.5 with HCl	
Then add:	
50 mM MgCl ₂	1.02 g MgCl ₂ ·6H ₂ O

~~Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

xvii) ~~10% polyvinyl alcohol (PVA)~~

Polyvinyl alcohol	10 g
DD-H ₂ O	100 ml

~~To prepare, slowly add PVA to water while stirring on low heat. (It takes 2-3 hours for PVA to go into solution.) Dispense 10 ml per tube and store frozen at -20°C.~~

xviii) ~~Development solution~~

~~Mix 90 ml Buffer III with 10 ml of 10% PVA. Store at 4°C. Just prior to use, for each 1 ml of Buffer III with PVA add:~~

4.5 µl NBT	75 mg NBT ml ⁻¹ in 70% dimethylformamide (Roche Diagnostics 1-383-213)
3.5 µl X-phosphate	5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidine salt (50 mg ml ⁻¹ in dimethylformamide) (Roche Diagnostics 1-383-221)

xviii) Buffer IV

10 mM Tris/HCl	1.21 g Tris base
1 mM EDTA	0.37 g EDTA.2H ₂ O (disodium salt)
DD-H ₂ O	1000 ml
pH to 8.0 with HCl. Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.	

xix) 0.5% Bismarck Brown Y

Bismarck Brown Y	2.5 g
DD-H ₂ O	500 ml

Dissolve the stain in water. Filter through a Whatman No. 1 filter; store at room temperature.

Polymerase chain reaction for IHHNV: several one-step PCR methods (Krabsetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2007; Tang & Lightner 2004), and a number of commercial PCR kits are available for IHHNV detection. Nested methods are also available from commercial sources.

There are multiple geographical variants of IHHNV, some of which are not detected by all of the available methods for IHHNV. Two primer sets, 392F/R and 389F/R, are the most suitable for detecting all the known genetic variants of IHHNV (Krabsetsve *et al.*, 2004; Tang & Lightner, 2002; Tang *et al.*, 2000; 2007). However these tests also detect IHHNV-related sequences called types 3A and 3B, which are inserted into the genome of certain geographic stocks of *P. monodon* from the western Indo-Pacific, East Africa, Australia and India (Duda & Palumbi, 1999; Saksmerprom *et al.*, 2011; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). PCR primers have been developed that can detect the IHHNV viral IHHNV sequence but do not react with IHHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprom *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHHNV), but not types 3A and 3B, which are non-infectious and part of the *P. monodon* genome (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer set MG831F/R reacts only with types 3A and 3B, which are non-infectious and part of the *P. monodon* genome (Tang *et al.*, 2007). Hence, confirmation of unexpected positive or negative PCR results for IHHNV with a second primer set, or use of another diagnostic method (i.e. PCR using primers from another region of the genome, real-time PCR, histology, bioassay, ISH) is highly recommended.

Table 4.1. Recommended primer sets for one-step PCR detection of IHHNV

Primer	Product	Sequence	G+C%/Temp.	GenBank & References
389F	389 bp	5'-CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA-3'	50%/72°C	AF218266
389R		5'-GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA-3'	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)
77012F	356 bp	5'-ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA-3'	50%/68°C	AF218266
77353R		5'-TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC-3'	55%/63°C	(Nunan <i>et al.</i> , 2000)
392F	392 bp	5'-GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA-3'	50%/68°C	AF218266
392R		5'-ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG-3'	50%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000)
309F	309 bp	5'-TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A-3'	36%/68°C	AF218266
309R		5'-TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A-3'	40%/69°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)
MG831F	831 bp	5'-TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT-3'	45%/58°C	DQ228358
MG831R		5'-GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT-3'	55%/62°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)

NOTE: Primers 389F/R and 392F/R described above are from the nonstructural protein-coding region (ORF 1) of the IHHNV genome. Primers 77012F/77353R are from a region in between the nonstructural and the structural (coat protein) capsid protein-coding region of the genome. In the event that results are ambiguous using the 389F/R 'universal' primer set, it is recommended to use primers from a different region of the genome for confirmatory testing. In this case, that would mean using primers 77012F/77353R or the 392F/R primer sets and follow up with sequencing of PCR amplicons for confirmation.

Annexe 21 (suite)

General PCR method for IHNV: the PCR method described below for IHNV generally follows the methods outlined in [Tang *et al.* \(2007\)](#) and [Nunan *et al.* \(2000\)](#). However, recent minor modifications including the sources of the reagents and the use of an automated DNA extraction instrument are acceptable. The modifications include DNA extraction method, choice of primers (Table 4.1), and the volume of reaction. These slightly modified methods have been validated in accordance with Chapter 1.1.2 Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases and do not affect the diagnostic performance of the assay. Cumulative experience with the technique has led to modifications with respect to template (DNA extraction of clinical specimens), choice of primers (Table 4.1), and volume of reaction.

- i) Use as a template, the DNA extracted from ground tissue homogenate (TN buffer, 0.4 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4) or haemolymph (collected with a small amount of 10% sodium citrate) or from tissues or haemolymph that was fixed-preserved in 95% ethanol and then dried. A control consisting of tissues or haemolymph from known negative animals should be included during the DNA extraction step. The DNA can be extracted by a variety of methods, but excellent results have been obtained using kits from Roche Diagnostics (Cat. No. 1 796 828) or Qiagen (Cat. No. 51304). Other DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega), or DNazol (Life Technologies). Spectrophotometric readings of the final DNA will indicate the purity of the DNA and the amount of total DNA extracted from the sample. Use 1–5 µl of extracted DNA as a template per 50-25 µl reaction volume.
- ii) The following controls should be included in every PCR assay for IHNV: (a) DNA from a known negative tissue sample; (b) DNA from a known positive sample (either from tissue or haemolymph or from a plasmid clone that contains the fragment that the specific set of primers amplifies; and (c) a 'no template' control.
- iii) Use as primers, primers 389F and 389R, which elicit a band 389 bp in size from IHNV-infected material, or primers 77012F and 77353R, which elicit a band 356 bp in size from IHNV-infected material. Prepare primers at $400 \mu\text{l}^{-1}$ 10 µM in distilled water. Keep frozen at -70°C.
- iv) Use a 'hot start' method for the polymerase: if Applied Biosystem's AmpliTaq Gold is used, this If PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) are used, the PCR profile involves a 3-5 minutes at 95°C to denature DNA prior to the primers binding and activation of the enzyme. This programme is then linked to the cycling programme (followed by 35 cycles) and an of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and final extension programme. The programme is set as follows: at 72°C for 5 minutes.

Hot start	Programme-1	5 minutes-95°C	
Linked to	Programme-2	30 seconds-95°C	
		30 seconds-55°C	35 cycles
		4 minute-72°C	
Linked to	Programme-3	7 minutes-72°C	
Linked to	Programme-4	4°C until off	

v) Prepare a 'Master Mix' consisting of water and primers.

- vi) For a 50 25 µl reaction mix, add 49 24 µl Master Mix to each tube and then add 1 µl of the sample DNA template to be tested.
- vii) Vortex each tube, spin quickly to bring down all liquid. If the thermal cycler does not have a heated lid to prevent condensation, then carefully overlay the top of each sample with 25-50 µl mineral oil and re-cap the tubes. Insert tubes into the thermal cycler and start programme 1 ('hot start'), which is linked to cycling, extension and soak cycles the PCR program.
- viii) If mineral oil was used, recover samples from under the mineral oil using a pipette set at 50 µl and transfer to a fresh tube. Using the long-tipped pipette tips (designed for loading gels) results in less oil being carried over with the sample.
- ix) Run After PCR, run 6-10 µl of the sample in a 1.5% agarose gel (containing 0.5 µg ml⁻¹ ethidium bromide to stain the DNA). Look for the 389 bp band (if using primers 389F and 389R) or for the 356 bp band (if using primers 77012F and 77353R). Bands are not always seen, as it is necessary to have at least 10 ng DNA µl⁻¹ to see DNA in a gel. A

~~Southern transfer of the gel or a dot blot can be run for more sensitive detection. The DNA can also be precipitated (0.3 M sodium acetate and 2.5 volumes 100% ethanol, 70°C, for 1–3 hours, centrifuge for 20 minutes) and resuspended in 1/10th volume (i.e. 4 µl) TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) or water and either re-run in the gel or tested in a dot blot. A direct sequencing of amplified products can be performed through gel extraction of a PCR band with correct size and the sequencing primer(s) used for amplification to confirm the presence of IHNV.~~

Real-time PCR method for IHNV: real-time PCR methods have been developed for the detection of IHNV. These methods offer extraordinary sensitivity that can detect a single copy of the target sequence from the IHNV genome (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). ~~Using primers 309F/309R, it is possible to distinguish infectious forms of IHNV from non-infectious forms. Using MG831F/MG831R it is possible to distinguish the non-infectious forms.~~

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

- i) ~~The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The primers and TaqMan probe are designed by the Primer Express software (Applied Biosystems Life Technologies). The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5'-TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A-3' and 5'-GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA-3', respectively. The TaqMan probe (5'-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-3'), which corresponds to the region from nucleotide 1632 to 1644, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end (Applied Biosystems, part no. 450025).~~
- ii) ~~Preparation of DNA template: the extraction and purification of DNA template is the same as that described in the section of traditional PCR above.~~
- iii) ~~The real-time PCR reaction mixture contains: TaqMan Universal PCR Fast virus 1-step Master Mix (Applied Biosystems, part no. 4324018 Life Technologies, or commercially-available equivalent reagents), 0.3 µM of each primers, 0.15 µM of TaqMan probe, 5–50 ng DNA, and water in a reaction volume of 25–20 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.~~
- iv) ~~Amplification is performed with the GeneAmp 5700 Sequence Detection StepOnePlus PCR System (Applied Biosystems; ABI PRISM 7000, 7300, or 7500 Life Technologies; or equivalent can also be used PCR systems). The cycling profile is: activation-initial denaturation of AmpliTaq Gold for 10 minutes–20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 45 seconds–1 second and annealing/extension at 60°C for 4 minute. The levels of fluorescence are measured at the end of the annealing and extension step 20 seconds.~~
- v) ~~At the end of the reaction, real-time fluorescence measurements will be taken with a built in charge-coupled device (CCD) camera fluorescence intensity is measured. A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase of PCR product. A cut-off Ct value is set through the analyses of several independent runs of negative and positive controls. Samples with a Ct value lower than 40 cut-off cycles are considered to be positive.~~
- vi) ~~It is necessary to include a 'no template' control in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture or in the heat block of the thermal cycler. A positive control should also be included, and it can be a plasmid containing the target sequence, or purified virions, or DNA extracted from IHNV-infected tissue.~~

Sequencing: PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified products from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the insertion of non-infectious IHNV genome in host DNA (Tang & Lightner, 2002; 2006).

Annexe 21 (suite)

Through PCR, IHNV was detected in *P. monodon* from South-East Asia. ~~Most~~ Some of these IHNV PCR assays ~~primers~~ also detected ~~reacted to~~ IHNV-related sequences in *P. monodon* populations in Africa, Australia and Thailand (Tang & Lightner, 2006; Saksmerprome *et al.*, 2011). To discriminate the IHNV-related sequences from the actual virus, PCR assays using primers that detect the IHNV viral sequence and do not react with IHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa or Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (e.g. Saksmerprome *et al.*, 2011) have been developed.

PCR commercial kits are available for detection of IHNV diagnosis and can be acceptable provided they have been validated as fit for such purpose. The OIE validation procedure is described in Chapter 1.1.2 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases*.

4.3.2. Serological methods

Shrimp are invertebrate animals and do not produce antibodies. Therefore, serological methods for detection of infection with IHNV are not available.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of infection with IHNV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended and/or not available for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for surveillance, detection and diagnosis of IHNV

Method	Surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	d	d	d	d
Bioassay	d	d	d	d	c	c
Direct LM <u>(wet mount)</u>	d	d	d	d	d	d
Histopathology	d	d	c	c	a	b
Transmission EM	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	d	c	d	d
<u>In-situ DNA probes hybridisation</u>	d	<u>dc</u>	<u>bc</u>	b	a	a
<u>Dot-blot hybridisation</u>	<u>d</u>	<u>d</u>	<u>c</u>	<u>c</u>	<u>a</u>	<u>a</u>
PCR, Real-time PCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus

As indicated in Table 5.1, PCR or real-time PCR is/are the recommended methods for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic IHHNV-induced lesions in the cuticular epithelium by histology (with or without confirmation by ISH with IHHNV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with IHHNV shall be is suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Clinical signs indicative of infection with IHHNV ~~and a positive result by *in-situ* hybridisation~~
- or
- ii) Histopathology indicative of infection with IHHNV ~~and a positive result by *in-situ* hybridisation~~
- or
- iii) Positive result by PCR

7.2. Definition of confirmed case

Infection with IHHNV is considered to be confirmed if two of the following criteria are met:

- i) Positive result by *in-situ* hybridisation
- ii) Positive result by PCR (always genotype specific)
- iii) Sequence analysis to confirm IHHNV nucleic acid sequence.

The two methods must target different areas of the genome.

8. References

- ALCIVAR-WARREN A., OVERSTREET R.M., DHAR A.K., ASTROFSKY K., CARR W.H., SWEENEY J. & LOTZ J.M. (1997). Genetic susceptibility of cultured shrimp (*Penaeus vannamei*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and *Baculovirus penaei*: possible relationship with growth status and metabolic gene expression. *J. Invertebr. Pathol.*, **70**, 190–197.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BELL T.A., LIGHTNER D.V. & BROCK J.A. (1990). A biopsy procedure for the non-destructive determination of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) ~~IHHN virus~~ infection in *Penaeus vannamei*. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 151–153.
- BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1991). Chapter 24. Unclassified Viruses of Crustacea. *In: Atlas of Invertebrate Viruses*, Adams J.R. & Bonami J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 597–622.

Annexe 21 (suite)

- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of **the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis IHHN virus** of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (EDS) (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 240 pp.
- ~~BONNICHON V., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 179–184.~~
- BRAY W.A., LAWRENCE A.L. & LEUNG-TRUJILLO J.R. (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.
- BROCK J.A. & LIGHTNER D.V. (1990). Diseases of Crustacea. Diseases Caused by Microorganisms. *In: Diseases of Marine Animals*, Vol. III, Kinne O., ed. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 245–349.
- BROCK J.A., LIGHTNER D.V. & BELL T.A. (1983). A review of four virus (BP, MBV, BMN, and IHHNV) diseases of penaeid shrimp with particular reference to clinical significance, diagnosis and control in shrimp aquaculture. Proceedings of the 71st International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1983/Gen:10/1–18.
- BROCK J.A. & MAIN K. (1994). A Guide to the Common Problems and Diseases of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute, Makapuu Point, P.O. Box 25280, Honolulu, Hawaii, USA, 241 pp.
- BROWDY C.L., HOLLOWAY J.D., KING C.O., STOKES A.D., HOPKINS J.S. & SANDIFER P.A. (1993). IHHN virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crust. Biol.*, **13**, 87–94.
- CARR W.H., SWEENEY J.N., NUNAN L., LIGHTNER D.V., HIRSCH H.H. & REDDINGTON J.J. (1996). The use of an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, **147**, 1–8.
- ~~CASTILLE F.L., SAMOCHA T.M., LAWRENCE A.L., HE H., FRELIER P. & JAENIKE F. (1993). Variability in growth and survival of early postlarval shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Aquaculture*, **113**, 65–81.~~
- CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. *In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress*, Jory D.E., ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2001). Detection and quantification of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and White spot virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 2835–2845.
- ~~DUDA T.F. JR. & PALUMBI S.R. (1999). Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar. Biol.*, **134**, 705–710.~~
- ~~FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.~~
- FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.

JAENIKE F., GREGG K. & HAMPER L. (1992). Shrimp production in Texas using specific pathogen-free stocks. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 295–302.

KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquac. Soc.*, **22**, 235–243.

KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (eds.) (2012). *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier ~~Academic press~~ **Academic Press**, San Diego USA.

KRABSETSVE K., CULLEN B.R. & OWENS L. (2004). Rediscovery of the Australian strain of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 153–158.

~~LIGHTNER D.V. (1983). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture*. Vol. 1. Crustacean Aquaculture, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 289–320.~~

LIGHTNER D.V. (1988). Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. *In: Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture*, Sindermann C.J. & Lightner D.V., eds. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 8–127.

LIGHTNER D.V. (1993). Diseases of penaeid shrimp. *In: CRC Handbook of Mariculture: Crustacean Aquaculture*, McVey J.P., ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996b). The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology **Epizootiology**, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquaculture Soc.* **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.

LIGHTNER D.V., BELL T.A., REDMAN R.M. & PEREZ L.A. (1992a). A collection of case histories documenting the introduction and spread of the virus disease IHHN in penaeid shrimp culture facilities in Northwestern Mexico. *ICES J. Mar. Sci.*, **194**, 97–105.

LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.*, **18**, 196–197.

LIGHTNER D.V., POULOS B.T., BRUCE L., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.R. (1992b). New developments in penaeid virology: application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K., eds. The Oceanic Institute, Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 233–253.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983a). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis, a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.

Annexe 21 (suite)

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983b). Detection of IHNV virus in *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei* imported into Hawaii. *J. World Mariculture Soc.*, **14**, 212–225.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG, K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., WILLIAMS R.R., MOHNEY L.L., CLERX J.P.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1985). Recent advances in penaeid virus disease investigations. Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis – a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.*, *J. World Mariculture Soc.*, **16**, 267–274.

LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.

MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1993). Partial cloning of the genome of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, an unusual parvovirus pathogenic for penaeid shrimps; diagnosis of the disease using a specific probe. *J. Gen. Virol.*, **74**, 2637–2643.

MARTINEZ-CORDOVA L.R. (1992). Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in Northwestern Mexico. *Progressive Fish Culturist Prog. Fish. Cult.*, **54**, 265–266.

MONTGOMERY-BROCK D., TACON A.G.J., POULOS B., & LIGHTNER D.V. (2007). Reduced replication of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in *Litopenaeus vannamei* held in warm water. *Aquaculture*, **265**, 41–48.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Histopathological studies on wild broodstock of white shrimp *Penaeus vannamei* in the Platanitos area, adjacent to San Blas, Nayarit, Mexico. *J. World Aquac. Soc.*, **30**, 192–200.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., NUNAN L.M., LIGHTNER D.V., MOTA-URBINA J.C., GARZA-AGUIRRE M.C. & CHAVEZ-SANCHEZ M.C. (1999). Prevalence of IHNV in wild broodstock of *Penaeus stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRIGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVAEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 330–334.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. H.K. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHNV parvovirus in wild penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) from the Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 23–34.

PRIMAVERA, J.H. & QUINTIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crust. Biol.*, **20**, 796–802.

PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.

ROCHE APPLIED SCIENCE (2006a). DIG Application Manual for Filter Hybridization. Roche Diagnostics. www.roche-applied-science.com/frames/frame_publications.htm. Indianapolis, USA.

ROCHE APPLIED SCIENCE (2006b). DIG Nonradioactive Labeling and Detection Product Selection Guide. Catalog Number 03-908-089-001. Roche Diagnostics, Indianapolis, USA.

ROSENBERY B. (2004). World Shrimp Farming 2004. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.

SAKSMERPROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylirostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.

SHIKE H., DHAR A.K., BURNS J.C., SHIMIZU C., JOUSSET F.X., KLIMPEL K.R. & BERGOIN M. (2000). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of shrimp is related to mosquito **Brevidensoviruses brevidensoviruses**. *Virology*, **277**, 167–177.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (2003a). Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus—a preliminary study. *Aquaculture*, **216**, 19–29.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2002). Low sequence variation among isolates of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) originating from Hawaii and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 93–97.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV)-**related sequences** in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Res.*, **118**, 185–191.

TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2007). A PCR assay for discriminating between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and **the** virus-related sequences in the genome of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 165–170.

TANG K.F.J., POULOS B.T., WANG J., REDMAN R.M., SHIH, H.H. & LIGHTNER D.V. (2003b). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.

WEPPE M. (1992). Demonstration de altas cuidades de la cepa de *P. stylirostris* (AQUACOP SPR 43) resistente al virus IHHN. Proceeding of the Ecuadorian Aquaculture Congress, CENAIM, Guayaquil, Ecuador, 229–232.

WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In*: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.

ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*(
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for **Infection with** infectious hypodermal and haematopoietic necrosis **virus** (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on **Infection with** infectious hypodermal and haematopoietic necrosis **virus**

NB: FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2015

CHAPTER 2.2.4.

INFECTION WITH INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious myonecrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious myonecrosis virus (IMNV), ~~which that is similar to members of the Family *Totiviridae*. is a viral disease of penaeid shrimp caused by infection with infectious myonecrosis virus (IMNV) (Lightner *et al.*, 2004; Nibert 2007; Poulos *et al.*, 2006).~~

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

~~IMNV is a totivirus.~~ Phylogenetic analysis of its RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene coding sequence indicates that IMNV is most closely related to *Giardia lamblia virus*, a member of the family *Totiviridae* (Fauquet *et al.*, 2005; Lightner, 2011; Nibert, 2007; Poulos *et al.*, 2006).

IMNV particles are icosahedral in shape and 40 nm in diameter, with a buoyant density of 1.366 g ml⁻¹ in caesium chloride. The genome consists of a single, double-stranded (ds) RNA molecule of ~~7560-8226-8230~~ bp (Loy *et al.*, 2015; Naim *et al.*, 2015). Sequencing of the viral genome reveals two non-overlapping open reading frames (ORFs). The ~~59-first~~ ORF (ORF1, nt ~~136-4953-470-5596~~) encodes a putative RNA-binding protein and a capsid protein. The coding region of the RNA-binding protein is located in the first half of ORF1 and contains a dsRNA-binding motif in the first 60 amino acids. The second half of ORF1 encodes a capsid protein, as determined by amino acid sequencing, with a molecular mass of 106 kDa. The ~~39-second~~ ORF (ORF2, nt ~~5241-7454-5884-8133~~) encodes a putative RdRp (Poulos *et al.*, 2006).

The complete genomes of IMNV types originating from Brazil and Indonesia have been sequenced and found to be 99.6% identical at the nucleotide level (Poulos *et al.*, 2006; Senapin *et al.*, 2007). The 99.6% full genome sequence identity (and anecdotal information on the introduction of *Penaeus vannamei* stocks from Brazil) indicate that the disease was introduced from Brazil to Indonesia in 2006.

~~Infection with IMNV IMN disease is not the same disease as white tail disease of penaeid shrimp and white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. These two diseases exhibit gross and histological signs that mimic similar to infection with IMNV IMN, but which are caused by two different types of virus: a nodavirus named *Penaeus vannamei* novavirus PvNV (Tang *et al.*, 2007) and a nodavirus named *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus MNV (see Chapter 2.2.8 White tail disease Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus).~~

2.1.2. Survival outside the host

Only anecdotal information is available. IMNV is apparently more difficult to inactivate with typical pond disinfection procedures (e.g. sun drying, chlorination, etc.) than are other penaeid shrimp viruses like white spot syndrome virus (WSSV), yellow head virus genotype 1 (YHV1), Taura syndrome virus (TSV) and infectious hypodermal and haematopoietic virus (IHHNV). Reservoir hosts are suspected, but none have been documented consistently.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

No data.

Annexe 22 (suite)**2.1.4. Life cycle**

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species (common and Latin names)**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IMNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: brown tiger prawn (*P. esculentus*), banana prawn (*P. merguensis*), and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

~~The principal host species in which IMNV is known to cause significant disease outbreaks and mortalities in farmed populations is *Penaous vannamei* (commonly called the Pacific white shrimp or white leg shrimp) (Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004). The Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*, and the black tiger shrimp, *P. monodon* have been infected experimentally with IMNV, but mortalities did not occur as a consequence of experimental infection in this laboratory trial (Tang *et al.*, 2005).~~

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: giant tiger prawn (*P. monodon*) and blue shrimp (*P. stylirostris*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: southern brown shrimp (*P. subtilis*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

Juveniles and subadults of *P. vannamei*, farmed in marine, brackish, and low salinity brackish water, appear to be most severely affected by infection with IMNV ~~IMN disease~~ (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No data.

2.2.5. Target organs and infected tissue

The principal target tissues for IMNV include the striated muscles (skeletal and less often cardiac), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005).

2.2.6. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of populations of *P. vannamei* that survive IMNV infections ~~and/or~~ epizootics may carry the virus ~~for life~~ and, although this has not been demonstrated scientifically, are believed to transmit virus vertically to progeny.

2.2.7. Vectors

There are no specific data on vectors. However, because of its non-enveloped particle structure, it is possible that IMNV, like TSV, will remain infectious in the gut and faeces of seabirds that feed on dead or moribund shrimp at farms with on-going infection with IMNV ~~IMN~~ epizootics, and be spread within and among farms by faeces or regurgitated shrimp carcasses (Vanpatten *et al.*, 2004).

2.2.8. Known or suspected wild aquatic animals carriers

~~Native wild penaeid shrimp in north-eastern Brazil have been anecdotally reported as hosts.~~

2.3. Disease pattern

In early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where infection with IMNV is enzootic, outbreaks of infection with IMNV-IMN disease associated with sudden high mortalities may follow stressful events such as capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in water salinity or temperature. ~~Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut.~~ Shrimp in the acute phase of infection with IMNV-IMN disease will present focal to extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some shrimp. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be high immediately following a “stress” event and continue for several days (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). Feed conversion ratios (FCR) of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007).

2.3.1. Transmission mechanisms

IMNV has been demonstrated to be transmitted horizontally by cannibalism (Lightner, 2011; Poulos *et al.*, 2006). Transmission via water and vertical transmission from broodstock to progeny probably occurs. Although vertical transmission is suspected from anecdotal evidence, it is not known whether this occurs via transovarial mechanism or by surface contamination of newly spawned eggs.

2.3.2. Prevalence

In regions where infection with IMNV is enzootic in farmed stocks of *P. vannamei*, its prevalence may reach 100% (Andrade *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2004).

2.3.3. Geographical distribution

Infection with IMNV has been reported to occur in north-eastern Brazil (Andrade *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006) and in the East Java Island (Senapin *et al.*, 2007) as well as west Java, Sumatra, Bangka, west Borneo, south Sulawesi, Bali, Lombok and Sumbawa in South East Asia Indonesia (Sutanto, 2014; Naim *et al.*, 2014). There are unofficial and anecdotal reports of infection with IMNV occurring in other South-East Asian countries (Senapin *et al.*, 2011).

2.3.4. Mortality and morbidity

Mortalities from infection with IMNV-IMN disease can range from 40% to 70% in cultivated *P. vannamei*, and feed conversion ratios (FCR) of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007).

2.3.5. Environmental factors

Temperature and salinity effects are considered to be likely predisposing factors to disease outbreaks, but no experimental data are available (Nunes *et al.*, 2004).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

No effective “vaccines” for infection with IMNV-IMN are available.

2.4.2. Chemotherapy

No effective therapeutic agents have been reported for infection with IMNV-IMN.

2.4.3. Immunostimulation

No data.

2.4.4. ~~Breeding for resistance~~ Resistance breeding

There are anecdotal reports of some selected lines of *P. vannamei* having better survival and culture performance in farms where infection with IMNV-IMN is enzootic. During a 20-day controlled laboratory study in which the shrimp were challenged with IMNV, some domesticated lines of *P. vannamei* were found to survive better than other lines (White-Noble *et al.*, 2010).

Annexe 22 (suite)**2.4.5. Restocking with resistant species**

While there are no published reports, some shrimp farms in Indonesia are believed to have stocked *P. monodon* and *P. stylirostris* because of data from a preliminary study ~~showing~~ suggesting that these species are more resistant to infection with IMNV-IMN than *P. vannamei* (Tang *et al.*, 2005).

2.4.6. Blocking agents

No data.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

While IMNV is believed to be transmitted vertically, there are no scientific data confirming this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is a good management practice recommended to reduce the transmission potential of a number of penaeid shrimp diseases from female spawners to their eggs or larvae, and the practice may reduce IMNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been applied successfully to prevent infection with IMNV ~~infections and development of clinical disease-IMN disease~~ at shrimp farms. Foremost among these has been the application of reverse-transcription-PCR (RT-PCR) for screening pond-reared broodstock or their spawned eggs or nauplii and discarding those that test PCR-positive (Andrade *et al.*, 2007). Following and restocking of affected farms or entire culture regions with IMNV-free stocks of *P. vannamei*, and the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* most suited to local culture conditions has proven to be the most successful husbandry practice for preventing and controlling other virus diseases of shrimp, and should be applicable to control and prevent infection with IMNV-IMN disease (Lee & O'Brien, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

3. Sampling**3.1. Selection of individual specimens**

Specimens suitable for testing for infection with IMNV ~~infection~~ using molecular methods (e.g. RT-PCR, nested RT-PCR, real-time RT-PCR, etc.) include postlarvae (PL), juveniles, subadults and adults. While IMNV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in larval stages, so these life stages may not be suitable for detecting IMNV or for certification for freedom of infection with IMNV-IMN disease.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0 *General information* (on diseases of crustaceans).

3.3. Pooling of samples

Tissue taken for molecular tests may be pooled. Pool sizes of 5 or less are recommended for tissue sampled from juveniles, subadults and adults. Eggs, larvae and PL can be pooled in larger numbers (e.g. up to 150 eggs or larvae and 5–50 PL depending on their size/age) may be necessary to extract sufficient RNA for RT-PCR testing. See also chapter 2.2.0.

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs or tissues

IMNV infects tissues of mesodermal origin. The principal target tissues in the acute phase of infection with IMNV ~~infection~~ are the striated muscles (skeletal and less commonly cardiac muscle), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ tubule parenchymal cells. In chronic infections, the lymphoid organ may be the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.5. Samples or tissues that are not suitable

IMNV replicates systemically but does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of IMNV infection.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

~~Only the acute phase of IMN disease can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute phase infection with IMNV IMN disease. Clinical signs may have a sudden onset following stresses (e.g. capture by cast netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity).~~ Affected shrimp present with visibly white tails. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be instantaneously high and continue for several days. Clinical signs may have a sudden onset following stresses (e.g. capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity).

4.1.2. Behavioural changes

~~Only shrimp in the acute-phase of IMN disease present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp become lethargic during or soon after stressful events such as capture by cast-netting, feeding, sudden changes in water temperature, sudden reductions in water salinity, etc.). Severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and often have a full gut.~~

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

~~Shrimp in the acute phase of IMN disease present focal to extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp. These signs may have a sudden onset following stresses (e.g. capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity). Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be instantaneously high and continue for several days.~~

Exposing the paired lymphoid organs (LO) by simple dissection will show that they are hypertrophied (3–4 times their normal size) (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

Annexe 22 (suite)**4.2.3. Microscopic pathology**

Infection with IMNV-IMN disease in the acute and chronic phases can be presumptively diagnosed using histology (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). However, the lesions in striated muscles and LO are not pathognomonic for infection with IMNV-IMN. White tail disease of penaeid shrimp caused by the *P. vannamei* nodavirus (PvNV) nodavirus PvNV can mimic infection with IMNV-IMN (Tang *et al.*, 2007). Hence, diagnostic information from other sources (e.g. history, gross signs, morbidity, mortality, or RT-PCR findings) may be required to confirm a diagnosis of infection with IMNV-IMN.

By histology using routine haematoxylin–eosin (H&E) stained paraffin sections (Bell & Lightner, 1988), tissue sections from shrimp with acute-phase infection with IMNV-IMN present myonecrosis with characteristic coagulative necrosis of striated (skeletal) muscle fibres, often with marked oedema among affected muscle fibres. Some shrimp may present a mix of acute and older lesions. In these shrimp, the affected muscle fibres appear to progress from presenting coagulative necrosis to presenting liquefactive necrosis, which is accompanied by moderate infiltration and accumulation of haemocytes. In the most advanced lesions, haemocytes and inflamed muscle fibres are replaced by a loose matrix of fibrocytes and connective tissue fibres that are interspersed with haemocytes and foci of (presumed) regenerating muscle fibres (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

Significant hypertrophy of the LO caused by accumulations of lymphoid organ spheroids (LOS) is a highly consistent lesion in shrimp with acute or chronic-phase infection with IMNV-IMN lesions. Often, many ectopic LOS are found in other tissues not near the main body of the LO. Common locations for ectopic LOS include the haemocoelom in the gills, heart, near the antennal gland tubules, and ventral nerve cord (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.2.4. Wet mounts

Stained or unstained tissue squashes of affected skeletal muscle or of the LO may show abnormalities. Tissue squashes of skeletal muscle when examined with phase or reduced light microscopy may show loss of the normal striations. Fragmentation of muscle fibres may also be apparent. Squashes of the LO may show the presence of significant accumulations of spherical masses of cells (LOS) amongst normal LO tubules.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

See Section 4.2.1.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not applicable for diagnostic purposes.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods****4.3.1.1. Microscopic methods***4.3.1.1.1. Wet mounts*

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Sections 4.2.3 and 4.2.6.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

None reported to date.

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Monoclonal antibodies (MAbs) have been developed to the capsid protein of IMNV (Kunanopparat *et al.*, 2011). Three MAbs were developed and when used in combination, they provided better sensitivity than any one of the MAbs used in isolation. However, the sensitivity was approximately tenfold lower than that of a one-step RT-PCR assay using the same sample.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

Published methods are available for the molecular detection of IMNV by *in-situ* hybridisation (ISH), nested RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005). A nested RT-PCR kit for detection of the virus is available commercially. All PCR tests have proved to be specific to IMNV.

As the sensitivity of the nested and real-time RT-PCR is greater than any other diagnostic method available currently, approaching a detection limit of 10 viral genome copies, these tests are the gold standard for detection of IMNV (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006).

DNA probe for ISH detection of IMNV

A cDNA library was generated from RNA extracted from purified IMNV. A IMNV-specific ISH DNA probe is prepared from clone IMNV-317 by PCR labelling with digoxigenin-11-dUTP (DIG). The PCR primers used for amplification of the 993 bp probe are IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') and IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3'). Following PCR, the DIG-labelled DNA probe is precipitated with ethanol, re-suspended in water and stored at -20°C until used. The ISH procedure for detecting IMNV follows that outlined by Tang *et al.* (2005).

RT-PCR for detection of IMNV

A nested RT-PCR method was developed to detect IMNV that uses two PCR primer sets that produce a 328 bp one-step amplicon and 139 bp two-step amplicon. The 1-step PCR can detect as little as 100 IMNV RNA copies and the 2-step PCR can detect in the order of 10 IMNV RNA copies (Poulos & Lightner, 2006).

Viral RNA can be isolated using any commercially available RNA isolation kit. The amount of tissue required will depend on the kit selected (e.g. Qiagen RNA extraction kit, Promega and Roche RNA purification kit recommend using 25–50 mg of tissue³). Depending on the kit used, the elution volume for Roche and Qiagen and low elution volume RNA isolation Promega extraction kit is 100 µl. The high elution volume RNA isolation Promega extraction kit is 500 µl. Extracted RNA should be maintained at -20°C before testing, however, for long-term storage the RNA should be kept at -70°C.

Following RNA extraction, the method is summarised below:

RNA templates:

1. Frozen or ethanol-fixed tissue (pleopods, cephalothorax, muscle)
2. Haemolymph (less sensitive than when other tissues are used)

³ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Annexe 22 (suite)

RT-PCR reaction mixture (Applied Biosystems rTth Enzyme and 5 × EZ Buffer #N808-0178 SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase, Life Technologies):

Reagent	Volume 25 µl reaction	Final concentration
DD dH ₂ O	6.5 5.5 µl	–
5 × EZ Buffer 2 × reaction mix	5.0 12.5 µl	1 ×
dNTP mix Forward/reverse primer (10mM each)	3.0 1.0 µl	300 µM each 0.4 µM
Primer F (100 ng µl ⁻¹) RT/Taq enzyme mix	1.0 µl	0.62 µM
Primer R (100 ng µl ⁻¹)	1.0 µl	0.62 µM
Mn(Oac) ₂ (25 mM)	2.5 µl	2.5 mM
rTth Enzyme (2.5 U µl ⁻¹)	6.5 1.0 µl	0.1 U µl ⁻¹
RNA template ¹	4–5 5.0 µl	1–50 ng total RNA

¹Template must be heated to >95°C boiled for 3 minutes and chilled on ice just prior to adding to reaction mix.

Reagent	Volume 25 µl reaction	Final concentration
DD dH ₂ O	6.5 5.5 µl	–
5 × EZ Buffer 2 × reaction mix	5.0 12.5 µl	1 ×
dNTP mix Forward/reverse primer (10mM each)	3.0 1.0 µl	300 µM each 0.4 µM
Primer F (100 ng µl ⁻¹) RT/Taq enzyme mix	1.0 µl	0.62 µM
Primer R (100 ng µl ⁻¹)	1.0 µl	0.62 µM
Mn(Oac) ₂ (25 mM)	2.5 µl	2.5 mM
rTth Enzyme (2.5 U µl ⁻¹)	6.5 1.0 µl	0.1 U µl ⁻¹
RNA template ¹	4–5 5.0 µl	1–50 ng total RNA

RT-PCR thermal cycling conditions:

PCR Primers	Temperature (°C)	Time	No. cycles	Amplicon length
	60, 95	30 minutes, 2 minutes	1	
45871/4914R	95, 60 62	45 seconds, 45 seconds	39	328 bp
	60	7 minutes	1	

Nested PCR reaction (Amersham Biosciences pure Taq-illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads #27-9558-04, GE Healthcare):

Reagent	25 µl reaction	Final concentration
DD H ₂ O	22.5 23 µl	–
Primer NF (100 ng µl ⁻¹ -10 µM)	4.0 0.5 µl	0.465 0.2 µM
Primer NR (100 ng µl ⁻¹ -10 µM)	4.0 0.5 µl	0.465 0.2 µM
Template ²	0.5 1.0 µl	–

²Template for the nested reaction is the product from the first step reaction

Nested PCR thermal cycling conditions:

Primers	Temperature (°C)	Time	No. cycles	Amplicon length
	95	2 minutes	1	
4725 NF/ 4863 NR	95, 65, 72	30 seconds, 30 seconds, 30 seconds	39	139 bp
	72	2 minutes	1	

Primer sequences:

Primer	Sequence (5' to 3')	Amplicon Length	Ref.
4587F	CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA	328 bp	Poulos & Lightner, 2006
4914R	ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT		
4725 NF	GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA	139 bp	
4863 NR	AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G		

Quantitative (real-time) RT-PCR for detection of IMNV

A real-time qRT-PCR method was developed to detect and quantify IMNV in shrimp tissue. The method can detect as few as 10 IMNV RNA copies per µl total RNA (Andrade *et al.*, 2007). The method as published is summarised below.

The Primer Express software (Applied Biosystems) was used to aid the design of the PCR primers and TaqMan probe targeted to the ORF1 region of the IMNV genome (GenBank accession no. AY570982) (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006). Primers IMNV412F (5'-GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA-3') and IMNV545R (5'-AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT-3') amplify a 134 bp DNA. The TaqMan probe, IMNVp1 (5'-6FAM-CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG-TAMRA-3'), which corresponds to the nucleotides 467–500, is labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) at its 5'-end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) at its 3'-end.

The IMNV genome fragment is amplified using an ~~ABI GeneAmp 5700 sequence detection system StepOnePlus PCR System~~ and the ~~TaqMan One-Fast virus 1-Step RT-PCR master mix (Applied Biosystems) Master Mix (Life Technologies)~~. Prior to the ~~real-time qRT-PCR~~, extracted RNA is boiled at ~~95–100°C~~ for ~~5–3~~ minutes to denature the dsRNA and chilled immediately in ~~wet~~ ice. The reaction mixture contains 1 µl RNA sample, ~~42.5~~ µl TaqMan Master mix (2×), ~~0.625~~ µl ~~Multiscribe mix (40×)~~, 300 nM each primer IMNV412F and IMNV545R, 200 nM IMNVp1 TaqMan probe in a ~~25–10–20~~ µl final volume. The ~~RT qRT-PCR~~ thermal cycling conditions used are ~~48–50°C~~ for ~~30–3~~ minutes, 95°C for ~~40 minutes–20 seconds~~ followed by 40 cycles of 95°C for ~~45–3~~ seconds and 60°C for ~~1 minute–20 seconds~~. ~~At the end of the samples reaction, fluorescence intensity is determined using serial dilutions measured, a threshold will be set to be above the baseline. Samples with a Ct value lower than 40 cycles are considered to be positive. It is necessary to include a 'no template' control in each reaction run. This is to rule out the presence of a synthetic fluorescence contaminants in the reaction mixture. A positive control should also be included, and it can be RNA extracted from IMNV-infected tissue, or in-vitro transcribed IMNV RNA standard containing the target sequence (see below), and the Gene Amp 5700 sequence detection software.~~

To synthesise an RNA standard for the real-time qRT-PCR, the PCR primers IMNV218F and IMNV682R (5'-GCT-GGA-CTG-TAT-TGG-TTG-AG-3' and 5'-AAC-CAA-GTT-CTT-CTT-CTC-CAG-TT-3', respectively) are used to amplify a 464 bp DNA product from the IMNV genome. The PCR product purified using a QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) was cloned into pGEM-T Easy Vector. A recombinant plasmid, pIMNV-1, confirmed to contain the 464 bp insert by sequence analysis, is linearised by digestion with *Pst*I and used as the template for an *in-vitro* RNA transcription using T7 RNA polymerase and associated reagents (Promega). RNA is synthesised at 37°C for 2 hours in a 50 µl reaction containing 1 µg plasmid DNA, followed by DNase I digestion at 37°C for 30 minutes for remove DNA. The length and integrity of the synthetic ssRNA is confirmed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide. The RNA is purified using a QIAquick PCR Purification kit, quantified by a spectrophotometer, and stored at –70°C.

Annexe 22 (suite)

4.3.1.2.4. Agent purification

While IMNV has been purified from infected shrimp tissue by sucrose density gradient ultracentrifugation (Poulos *et al.*, 2006), this is not recommended for diagnostic purposes.

4.3.2. Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrates which do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to IMNV.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of **infection infection with** IMNV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	c	c	c	d
Bioassay	d	d	c	c	c	c
Direct LM (wet mount)	d	d	ed	ed	c	c
Histopathology	d	d	b	b	a	c
Transmission EM	d	d	d	d	d	d
Antibody-based assays	d	d	d	d	c	dc
DNA probes (ISH)	d	d	ab	ab	a	a
Nested RT-PCR or real-time RT-PCR	a	a	a	a	a	a
real-time RT-PCR Sequencing	dd	ed	ad	ad	a	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; ISH = *in-situ* hybridisation (ISH); RT-PCR = reverse-transcription polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with infectious myonecrosis virus

As indicated in Table 5.1, nested RT-PCR (Section 4.3.1.2.3) is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, histological demonstration of characteristic IMNV-induced lesions in the striated muscles and the extreme hypertrophy of the LO caused by LOS formation (with or without confirmation by ISH with IMNV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1). The occurrence of significant mortality distinguishes infection with IMNV IMN from penaeid white tail disease caused by PvNV, in which the gross signs and histopathology mimics infection with IMNV IMN disease (Tang *et al.*, 2007).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with IMNV shall be is suspected if at least one of the following criteria is met:

i) Clinical-clinical signs consistent with infection with IMNV

or

ii) histopathology consistent with infection with IMNV

or

iii) a positive result by nested RT-PCR or real-time RT-PCR.

~~Sudden high mortalities, usually following stressful events such as capture by cast net, feeding, sudden changes in salinity or temperature, etc., in early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where IMNV is enzootic or where introduction of *P. vannamei* from infected regions or countries has occurred. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut, and shrimp in the acute phase of infection with IMNV IMN disease will present focal to extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp. Severely affected shrimp become moribund and mortalities can be instantaneously high and continue for several days. Exposing the paired LO by simple dissection will show that they are hypertrophied to 3–4 times their normal size.~~

7.2. Definition of confirmed case

~~Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):~~

Infection with IMNV is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

i) histopathology consistent with infection with IMNV ~~Histological demonstration of diagnostic acute, transition or chronic phase IMNV lesions in the striated muscles or the LO.~~

ii) ISH positive result in target tissues ~~(with an IMNV specific cDNA probe) signal to IMNV type lesions in striated necrotic muscle fibres or to distinctive LOS in the lymphoid organs of shrimp with transition or chronic phase IMNV infections in histological sections.~~

iii) One one ~~step or nested RT-PCR (followed by sequencing), or real-time RT-PCR with positive results for IMNV.~~

8. References

ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**, 9–15.

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.

CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

Annexe 22 (suite)

FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A., EDITORS (2005). Totiviridae. *In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Francisco, USA, pp. 571–580.

KUNANOPPARAT A., CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., **LONGYANY LONGYANT** S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, **171**, 141–148.

LEE C.S. & O'BRYEN P.J., EDITORS (2003). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, **106**, 110–130.

LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.F.J., REDMAN R.M., PASOS **DE** ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 85.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.

LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, **96** (Pt 7), 1821–1819.1829.

MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17: Selective breeding of penaeid shrimp. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 425–452.

NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, **189, 99–105.**

NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, **160**, 1579–1583.

NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1315–1318.

NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, **83**, 37–51 (in Portuguese).

POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 69–72.

POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **87**, 987–996.

SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, **266**, 32–38.

SENAPIN S., **PHIWSALYA, PHEWSAIYA**, K., GANGNONNGIW W. & FLEGEL T.W. (2011). False rumours of disease outbreaks caused by infectious myonecrosis virus (IMNV) in the whiteleg shrimp in Asia. *J. Negat. Results Biomed.*, **10**, 10.

SUTANTO Y. (2011). IMNV cases in Indonesia. Presented to Shrimp Club Indonesia Workshop, 2 March 2011.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 261–265.

TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 183–190.

TAUKHID & NUR'AINI Y.L. (2009). Infectious myonecrosis virus (IMNV) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Israeli J. Aquaculture*, **61**, 255–266.

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for **infection with** infectious myonecrosis **virus** (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on **infection with** infectious myonecrosis **virus**

NB: FIRST ADOPTED IN 2009; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

CHAPTER 2.2.5.

INFECTION WITH *HEPATOBACTER PENAEL* (NECROTISING HEPATOPANCREATITIS)

1. Scope

Infection with *Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent **Candidatus Candidatus *Hepatobacter penaei***, an obligate intracellular bacterium of the Order α -*Proteobacteria*. The disease is commonly known as necrotising hepatopancreatitis disease is caused by infection with a Gram-negative, pleomorphic intracellular alpha-proteobacterium (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Lightner *et al.*, 1992; Loy *et al.*, 1996a; 1996b) preliminarily called *Candidatus Hepatobacter penaei*. The principal host species in which necrotising hepatobacterium (NHPB) can cause significant disease outbreaks and mortalities are *Penaeus vannamei* and *P. stylirostris* (Del Río Rodríguez *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1993; Ibarra-Gómez *et al.*, 2007; Lightner & Redman, 1994; Morales Covarrubias *et al.*, 2011).

NHP has four distinct phases: initial, acute, transition and chronic. In acute and transition phase disease, pathognomonic lesions are typically present in histological sections of the hepatopancreas, while in the initial and chronic phases of the disease, there are no pathognomonic lesions, and molecular and antibody-based methods for NHPB detection are necessary for diagnosis (Morales Covarrubias, 2010; Morales Covarrubias *et al.*, 2010; 2012; Vincent & Lotz, 2005).

Synonyms: necrotising hepatobacterium (NHPB) or NHP bacterium (NHPB); rickettsial like organism (RLO).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

NHPB ~~Candidatus *Hepatobacter penaei*~~ is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium (Nunan *et al.*, 2013). It is a member of the α -subclass of *Proteobacteria* (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 × 0.9 µm), whereas the helical form (0.25 × 2–3.5 µm) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ associated with North and South American outbreaks of NHP suggests that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996).

2.1.2. Survival outside the host

No data.

2.1.3. Stability of the agent

~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~-infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze-thawing and after storage in 50% glycerine. ~~NHPB Candidatus *H. penaei*~~ frozen at –20°C to –70°C and –80°C have been shown to retain infectivity in experimental transmission trials with *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1992).

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

Annexe 23 (suite)

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing a species as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include: whiteleg shrimp (*P. vannamei*). Most penaeid species can be infected with NHPB, including the principal cultured species in Latin American, *P. vannamei* (Pacific white shrimp) and *P. stylirostris* (Pacific blue shrimp).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*).

NHPB infections are most severe in *P. vannamei* where the intracellular bacterium can cause acute epizootics and mass mortality (>90%). In *P. vannamei*, the juvenile, subadult and broodstock life stages are the most severely affected (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010).

NHPB causes chronic disease in *P. vannamei*, the main effects of which are slow growth, a soft cuticle and a flaccid body (Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

~~Outbreaks of NHP disease have been reported in *P. aztecus* (Johnson, 1990; Jory, 1997; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). NHP has also been seen in *P. californiensis* and *P. setiferus* (Frelief *et al.*, 1995; Lightner, 1996). *Penaeus setiferus* is reportedly less susceptible to disease than *P. vannamei* (Frelief *et al.*, 1995).~~

~~In an NHP survey of the Gulf of Mexico, *P. setiferus* and *P. duorarum* in the vicinity of coastal prawn farms along the Yucatan and Campeche coast revealed no histological evidence of NHP (Del Río Rodríguez *et al.*, 2006).~~

2.2.32. Susceptible stages of the host

~~NHPB-Infection with *H. penaei* has been demonstrated in juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei*.~~

2.2.43. Species or sub-population predilection

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

2.2.54. Target organs and infected tissue

~~The target tissue is the hepatopancreas; with NHPB-infection with *H. penaei* has been reported in all hepatopancreatic cell types.~~

2.2.65. Persistent infection with lifelong carriers

~~Some members of *P. vannamei* populations that survive NHPB-infection with *H. penaei* or epizootics may carry the intracellular bacteria for life and transmit it to other populations by horizontal transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; 2010; Vincent & Lotz, 2005).~~

Natural transmission of NHPB is thought to occur *per os* by cannibalism (Frelief *et al.*, 1993; 1995; Johnson, 1990; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010), although cohabitation and dissemination of NHPB via the water column may also play a role (Frelief *et al.*, 1993; 1995). NHPB in faeces shed into pond water has also been suggested as a possible means of transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Outbreaks of disease are often preceded by prolonged periods of high water temperature (approximately 30°C) and salinity (up to 40 parts per thousand [ppt]) (Frelief *et al.*, 1995; Lightner & Redman, 1994; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; 2011; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.7.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

NHPB is common in wild penaeid shrimp in Peru (*P. vannamei*) and Laguna Madre of Tamaulipas, Mexico (*P. aztecus*, *P. duorarum* and *P. setiferus*) (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Lightner & Redman, 1994).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Transmission mechanisms

Horizontal transmission of NHPB Candidatus *H. penaei* can be horizontal by through cannibalism; transmission or by contaminated water has also been demonstrated (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Frelief *et al.*, 1993; Gracia-Valenzuela *et al.*, 2011; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012; Vincent *et al.*, 2004). *H. penaei* in faeces shed into pond water has also been suggested as a source of contamination (Aranguren *et al.*, 2006; Briñez *et al.*, 2003; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006).

2.3.2. Prevalence

Some Reported mean-values for NHPB Candidatus *H. penaei* prevalence in wild stocks are between 5.6 and 15% in *P. duorarum*, and between 5 and 17% in *P. aztecus* collected from Carrizal and Carbonera, Laguna Madre of Tamaulipas, Mexico (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010). Lightner & Redman (1994) reported a prevalence of 0.77% in cultured *P. vannamei*, and 0.43% in cultured *P. stylirostris* collected from the Tumbes Region, Peru (Lightner & Redman, 1994).

Some Reported mean-values for NHPB Candidatus *H. penaei* prevalence in shrimp farms were between 0.6% and 1.3% in *P. vannamei* collected from shrimp farms in Belize, Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua and Venezuela (Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

2.3.3. Geographical distribution

NHPB Candidatus *H. penaei* appears to have a Western Hemisphere distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Del Río-Rodríguez *et al.*, 2006). In the Western Hemisphere, NHPB Candidatus *H. penaei* is commonly found in cultured penaeid shrimp in Belize, Brazil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Panama, Peru, United States of America, and Venezuela (Frelief *et al.*, 1992; Ibarra-Gómez *et al.*, 2007; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011).

2.3.4. Mortality and morbidity

In *P. vannamei*, infection by NHPB with *H. penaei* results in an acute, usually catastrophic disease with mortalities approaching 100%.

2.3.5. Environmental factors

The occurrence of infection with replication rate of NHPB Candidatus *H. penaei* in farms may increase during lengthy long periods of high temperatures (>29°C) and high salinity changes (20–38% ppt) (Morales-Covarrubias, 2008). In Mexico, NHPB Candidatus *H. penaei* has been detected at a low prevalence (<7%) in shrimp farms in the months of April, May, July and August. However, in the months of September and October when temperatures are high during the day and low at night, high prevalence and mortality (>20%) are observed (Morales-Covarrubias, 2010).

2.4. Control and prevention

Control

The use of the antibiotics, oxytetracycline and florfenicol 50%, in medicated feeds every 8 hours for 10 days is probably the best NHPB treatment currently available, particularly if it is detected in the initial phase (Frelier *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

Prevention

- a) Early detection (initial phase) of clinical NHPB infection with *H. penaei* is important for successful treatment because of the potential for cannibalism to amplify and transmit the disease.
- b) Shrimp starvation and cannibalism of infected shrimps NHPB infection with *H. penaei*, as well as and positive conditions for NHPB-Candidatus-*H. penaei* cultivation-multiplication, are important factors for the spread of NHPB-Candidatus-*H. penaei* propagation in *P. vannamei*.
- c) The use of quick-hydrated lime (Ca(OH)₂) to treat the bottom of ponds during pond preparation before stocking can help reduce the incidence of NHPB infection with *H. penaei*.
- d) Preventive measures include raking, tilling, and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged sun-drying (through exposure to sunlight) of ponds and water distribution canals for several weeks, disinfection of fishing gear and other farm equipment using calcium hypochlorite, and drying and extensive liming of ponds.
- e) The use of specific pathogen-free (SPF) broodstock is an effective preventive measure.

Control

The use of the antibiotics, oxytetracycline and florfenicol 50%, in medicated feeds every 8 hours for 10 days is probably the best NHPB treatment currently available, particularly if infection with *H. penaei* is detected in the initial phase (Frelier *et al.*, 1995; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

2.4.1. Vaccination

No scientifically confirmed reports.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. ~~Resistance breeding~~ Breeding for resistance

No scientifically confirmed reports.

2.4.5. Restocking with resistant species

No scientifically confirmed reports.

2.4.6. Blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Disinfection of eggs and larvae is a good management practice (Lee & O'Bryen, 2003) and is recommended for its potential to reduce NHPB-Candidatus-*H. penaei* contamination of spawned eggs and larvae (and contamination by other disease agents).

2.4.8. General husbandry practices

The prevalence and severity of infection with *H. penaei* may be increased by rearing shrimp in relatively crowded or stressful conditions. Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of NHPB-Candidatus-infection with *H. penaei* infections and disease. Among these has been the application of PCR to pre-screening of wild or pond-reared broodstock.

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection by ~~NHPB~~ with *H. penaei* are the following life stages: postlarvae [PL], juveniles and adults.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method, see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

~~Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, sub-adults and adults. However, for eggs, larvae and PL, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50-150 PL depending on their size or age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.~~

~~The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.~~

3.4. Best organs or tissues

~~NHPB~~ ~~Candidatus~~ *Hepatobacter penaei* infects most enteric tissue. The principal target tissue for ~~NHPB~~ ~~Candidatus~~ *H. penaei* is the hepatopancreas. Faeces may be collected and used for testing (usually by PCR, or dot-blot hybridisation with specific probes) when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Bradley-Dunlop *et al.*, 2004; Briñez *et al.*, 2003; Freliey *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

3.5. Samples or tissues those are not suitable

~~NHPB~~ ~~Candidatus~~ *H. penaei* does not replicate in the midgut, caeca, connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

~~The prevalence and severity of NHPB may be enhanced in a contained population by rearing shrimps in relatively crowded or stressful conditions. The 'crowding stress' factors may include high stocking densities, ablation, and marginal water quality (e.g. low dissolved oxygen, elevated water temperature, or elevated ammonia or nitrite) in the holding tank water. These conditions may encourage expression of low grade NHPB infection with *H. penaei* and the transmission of the agent from carriers to previously uninfected hosts in the population. This results in increased prevalence and severity of infections that can be more easily detected using the available diagnostic and detection methods for NHPB.~~

4.1.1. Clinical signs

A wide range of gross signs can be used to indicate the possible presence of ~~NHPB~~ infection with *H. penaei*. These include: lethargy, reduced food intake, atrophied hepatopancreas, anorexia and empty guts, noticeably reduced growth and poor length weight ratios ('thin tails'); soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; heavy surface fouling by epicomensal organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic.

Annexe 23 (suite)

4.1.2. Behavioural changes

In acute NHPB-disease, *P. vannamei* may present behavioural changes including lethargy and reduced feeding activity.

4.2. Clinical methods**4.2.1. Gross pathology**

~~NHPB-infection with *H. penaei* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adult and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Aranguren *et al.*, 2006; 2010; Bastos-Gomes *et al.*, 2010; Brock & Main, 1994; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012). Gross signs are not NHP-specific, but shrimp with acute NHP-infection with *H. penaei* show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance (see Section 4.1.1).~~

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology

Acute and chronic ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ in *P. vannamei* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stain histological methods (see Section 4.2.6).

4.2.3.1. Initial phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

~~Initial NHPB-infection with *H. penaei* is more difficult to diagnose using routine H&E histological methods. For diagnosis of initial infections, molecular methods are recommended for NHPB-Candidatus-*H. penaei* detection (e.g. by PCR or application of NHPB-Candidatus-*H. penaei*-specific DNA probes, dot-blot hybridisation tests or *in-situ* hybridisation (ISH) of histological sections).~~

4.2.3.2. The acute phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

~~Acute NHPB-disease-infection with *H. penaei* is characterised by atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule epithelia, presence of bacterial cells and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations). Hypertrophic cells, individual epithelial cells appeared to be separated from adjacent cells, undergo necrosis and desquamation in to the tubular lumen. The tubular epithelial cell lipid content is variable.~~

4.2.3.3. Transition phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

~~The transitional phase of NHPB-disease infection with *H. penaei* is characterised by haemocytic inflammation of the intertubular spaces in response to necrosis, cytolysis, and sloughing of hepatopancreas tubule epithelial cells. The hepatopancreas tubule epithelium is markedly atrophied, resulting in the formation of large oedematous (fluid filled or 'watery') areas in the hepatopancreas. Tubule epithelial cells within multifocal encapsulation are typically atrophied and reduced from simple columnar to cuboidal morphology. They contain little or no stored lipid vacuoles, markedly reduced or no secretory vacuoles and masses of bacteria. At this phase haemocyte nodules were observed in the presence of masses of bacteria in the centre of the nodule~~

4.2.3.4. Chronic phase of ~~infection with *H. penaei*~~ necrotising hepatopancreatitis

~~In the chronic phase of NHPB-infection with *H. penaei*, tubular lesions, multifocal encapsulation and oedematous areas decline in abundance and severity and are replaced by infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. There are areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells with masses of bacteria in the cytoplasm and low numbers of haemocyte nodules.~~

4.2.4. Wet mounts

Wet-mount squash examination of hepatopancreas (HP)-tissue is generally conducted to detect presumptive ~~NHPB disease~~ infection with *H. penaei*. The hepatopancreas may be atrophied and have any of the following characteristics: soft and watery; fluid filled centre; pale with black stripes (melanised tubules); pale centre instead of the normal orange coloration. For wet mount analysis the shrimp must be in the intermolt stage, and have not undergone a treatment that could alter the tubules. This technique uses tubular deformation or atrophy, mainly of the apical region to indicate early stages of ~~NHPB~~ infection with *H. penaei*.

~~NHPB disease~~ Infection with *H. penaei* has four phases (a semiquantitative scale):

Initial phase: low presence of tubular deformation (1–5 field⁻¹ organism⁻¹) and cell detachment.

Acute phase: infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules (6–10 field⁻¹ organism⁻¹), encapsulation present in different regions of the sample (i.e. atrophied tubules surrounded by multiple layers of haemocytes).

Transition phase: infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules (11–15 field⁻¹ organism⁻¹), melanised tubules, necrotic tubules and a high level of encapsulation present in different regions of the sample. ~~At this stage haemocyte nodules were observed with masses of bacteria in the centre of the nodule.~~

Chronic phase: areas with fibrosis, few melanised and necrotic tubules and very low presence of hypertrophied cells ~~with masses of bacteria in the cytoplasm.~~

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Electron microscopy/cytopathology

Not currently applicable for diagnostic purposes

4.3. Agent detection and identification methods

4.3.1. Direct detection methods

4.3.1.1. Microscopic methods

4.3.1.1.1. Wet mounts

See section 4.2.4

4.3.1.1.2. Smears

Not applicable

4.3.1.1.3. Fixed sections

See section 4.2.3.

4.3.1.1.4. Bioassay method

Confirmation of ~~NHPB~~ infection with *H. penaei* may be accomplished by bioassay of ~~NHPB~~ suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the intracellular bacteria (Cock *et al.*, 2009; Johnson, 1990; Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005). Oral protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped hepatopancreas of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks. The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only a normal feed, is required. When the hepatopancreas feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~, ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of ~~NHPB disease~~ infection with *H. penaei* and unusual mortalities.

Annexe 23 (suite)

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture or artificial media

~~NHPB Candidatus-*Hepatobacter penaei*~~ has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2007).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Immunohistochemistry (IHC) tests using monoclonal antibodies (MAbs) to ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~, are available for *H. penaei* detection, according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004).

4.3.1.2.3. Molecular techniques

ISH and PCR tests for ~~NHPB detection of *H. penaei*~~ have been developed, and PCR kits for ~~NHPB~~ are commercially available. ~~PCR tests for *H. penaei* have been developed and a number of methods and commercial products using these methods are available~~ (Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Gene probes and PCR methods provide greater diagnostic sensitivity than ~~de~~ classic histological approaches to ~~NHP~~ diagnose infection with *H. penaei*. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp.

4.3.1.2.3.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

~~Non radioactive, digoxigenin 11 dUTP (DIG) labelled probes for NHPB Candidatus *H. penaei* may be produced in the laboratory.~~ The ISH method of Loy & Frelier (1996) and Lightner (1996) provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ detection and diagnosis of infection that employ classical histological methods (Johnson, 1990; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012). The ISH assay of routine histological sections of acute, transition and chronic phase lesions in hepatopancreas with a specific DIG-labelled cDNA probe to ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~, provides a definitive diagnosis of ~~NHPB~~ infection with *H. penaei* (Lightner, 1996; Loy & Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Pathognomonic ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. (See Chapter 2.2.3 *Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

4.3.1.2.3.2. PCR method

Hepatopancreas and faeces may be assayed for ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ using PCR. Primers designated as NHPF2: 5'-CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAGT-3' and NHPR2: 5'-GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C-3', amplify a 379 base pair (bp) ~~designed against the GenBank accession number fragment~~ corresponding to the 16S rRNA of ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ (Nunan *et al.*, 2008). The PCR method outlined below generally follows the method described in Aranguren *et al.* (2010) ~~with modifications by an OIE Reference Laboratory in the USA.~~

- i) *Preparation of DNA template:* DNA can be extracted from 25–50 mg of fresh, frozen and ethanol-preserved hepatopancreas. Extraction of DNA should be performed using commercially available DNA tissue extraction kits following the manufacturer's procedures for production of quality DNA templates. DNA extraction kits include QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), MagMax™ Nucleic Acid kits (Life Technologies), or Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (Promega)⁴.
- ii) The following controls should be included when performing the PCR assay for ~~NHPB~~ a) known ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ negative tissue sample; b) a known ~~NHPB Candidatus-*H. penaei*~~ -positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.

⁴ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

- iii) The PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iv) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~ in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl⁻¹), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- v) If the thermal cycler does not have a heated lid, then light mineral oil (50 µl) is overlaid on the top of the 25 µl reaction mixtures to prevent condensation or evaporation during thermal cycling.
- vi) The cycling parameters are: Step 1: 95°C for 5 minutes, 1 cycle; Step 2: 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, 35 cycles; Step 3: 60°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes, 1 cycle; 4°C infinite hold.

Note: The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.

4.3.1.2.3.3. Real-time PCR method

Real-time PCR methods ~~have been developed~~ for detection of ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~. These ~~methods~~ have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real-time PCR is ~100 copies of the target sequence from the ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~ genome (Aranguren *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~ generally follows the method used in Aranguren *et al* (2010).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the 16S, rRNA gene of ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~ (GenBank U65509) (Loy & Frelie., 1996). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP1300F) and downstream (NHP1366R) primer sequences are: 5'-CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TACAC-3' and 5'-GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA-3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *Preparation of DNA template:* the extraction and purification of DNA template from hepatopancreas, is the same as that described in the section for traditional PCR.
- iii) *The real-time PCR reaction mixture contains:* TaqMan One-step real-time PCR SuperMix (Quanta, Biosciences), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng of DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) Amplification is performed with the master cycler Realplex 2.0 (Eppendorf). The cycling consists of initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 1 minute. After each cycle, the levels of fluorescence are measured.
- v) ~~At the end of the reaction, real time fluorescence measurements will be taken with a built in charge-coupled device (CCD) camera. A threshold will be set to be above the baseline that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase in PCR product.~~
- vi) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of fluorescence contaminants in the reaction mixture ~~or in the heat block of the thermal cycler, and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay.~~ A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, purified bacteria, or DNA extracted from ~~NHPB-*H. penaei*~~-infected hepatopancreas.

4.3.1.2.3.4. Sequencing

PCR products may be cloned and sequenced or sequenced directly when necessary to confirm infection by ~~NHPB-with *H. penaei*~~ or to identify false positives or nonspecific amplification (Aranguren *et al.*, 2010; Bustin *et al.*, 2009; Vincent & Lotz, 2005).

Annexe 23 (suite)

4.3.1.2.4. Agent purification

Methods for ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~ isolation and purification are available (Aranguren *et al.*, 2010; Nunan *et al.*, 2013; Vincent *et al.*, 2004; Vincent & Lotz, 2005). ~~The NHPB bacterium Candidatus *Hepatobacter penaei*~~ is unculturable using traditional bacteriological methods, thus ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ must be maintained through continual exposure of uninfected *LP. vannamei* stock to a population undergoing an epizootic of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~.

4.3.2 Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrate animals that do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of ~~NHPB-infection with *H. penaei*~~ are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	ed	ed	bd	d
Bioassay	d	d	d	d	c	d
Direct LM (wet mount)	d	d	ed	d	ed	d
Histopathology	d	bd	bc	c	a	bc
<i>In-situ</i> DNA probes	a	a	a	a	a	a
Transmission EM	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	c	c	bc	bc
Real-time PCR	a	a	a	a	a	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Sequencing	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; PCR = polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *H. penaei* Necrotising hepatopancreatitis

As indicated in Table 5.1, real-time PCR (Section 4.3.1.2.3.2) is the recommended method for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity. When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~-induced lesions in the hepatopancreas by histology (with or without confirmation by ISH with ~~NHPB-Candidatus-*H. penaei*~~-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of a suspect case

Infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

i) histopathology consistent with infection with *H. penaei*

or

ii) ISH positive results in target tissues

or

ii) a positive result by PCR or real-time PCR.

The presence of NHPB infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- Sudden high mortalities in late PL, juvenile or subadult *P. vannamei* or *P. stylirostris* in regions where NHPB infection with *H. penaei* is enzootic;
- Samples of cultured *P. vannamei* or *P. stylirostris* from ponds with feeding sea birds that present gross signs indicative of acute or transition phase infection with *H. penaei*, such as a general atrophied hepatopancreas, reddish colouration, lethargy, soft shells, empty guts, and the presence of numerous irregular black spots on the cuticle;
- Poor hatching success of eggs, and poor survival and culture performance of the larval and PL stages when broodstock are used from wild or farmed stocks where NHPB infection with *H. penaei* is enzootic.

7.2. Definition of confirmed case

Infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

i) histopathology consistent with infection with *H. penaei*

ii) ISH positive result in target tissues

iii) PCR (followed by sequencing), or real-time PCR with positive results for infection with *H. penaei*.

Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):

- Histological demonstration of diagnostic acute phase NHPB infection with *H. penaei* lesions in (especially) the atrophied hepatopancreas with moderate atrophy of the tubule mucosa, presence of bacteria and infiltrating haemocytes involving one or more of the tubules (multifocal encapsulations).
- ISH positive histological signal to lesions suggestive of NHPB infection with *H. penaei*.
- PCR positive results for NHPB infection with *H. penaei*.

8. References

AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PEREZ-CASTAÑEDA R. & ORTA-RODRIGUEZ R. (2010). Detection of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in wild shrimp from Laguna Madre, Mexico by a multiplex polymerase chain reaction. *Thai J. Vet. Med.*, **40**, 337–341.

Annexe 23 (suite)

- ARANGUREN L.F., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.
- ARANGUREN L.F., TANG K.F. **J.** & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.
- ~~BASTOS GOMES G., SANTOS DOMINGOS J.A., CAVALCANTI OLIVEIRA K.K., DE PAULA MENDES P., ARNS DA SILVA V. & SHINOZAKI MENDES E. (2010). Diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, through wet mount, histopathology and PCR techniques. *J. World Aquac. Soc.*, **41**, 816–822.~~
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (eds). (2001). Chapter 10: Necrotizing hepatopancreatitis. *In: Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases*. FAO Fisheries Technical Paper No. 402. Supplement 2. FAO, Rome, Italy, 207 p.
- BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & **D.V.** LIGHTNER. **D.V.** (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.
- BRIÑEZ B., ARANGUREN F. & SALAZAR M. (2003). Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 55–72. **55, 69-72.**
- ~~BROCK J.A. & MAIN F. (1994). A Guide to the Common Problems and Disease of Cultured *Penaeus vannamei*. Oceanic Institute. Makapuu Point, Honolulu, Hawaii, USA, 241 p.~~
- BUSTIN S. **A.**, **BENES V.**, GARSON J. **A.**, HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M. **W.**, SHIPLEY G. **L.**, VANDESOMPELE J. & WITTEWIT C. **T.** (2009). The MIQE guidelines: **minimal minimum** information for publication of quantitative **real-time** PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
- COCK J., GITTERLE T., SALAZAR M. & RYE M. (2009). Breeding for disease resistance of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **286**, 1–11.
- CRABTREE B.G., ERDMAN M.M., HARRIS D.L. & HARRIS I.T. (2006). Preservation of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) by freezing tissue collected from experimentally infected *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 175–179.
- DEL RIO-RODRIGUEZ R.E., SOTO-RODRIGUEZ S., LARA-FLORES M., CU-ESCAMILLA A.D. & GOMEZ-SOLANO M.I. (2006). A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, **255**, **606-201-606-609.**
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., LOY J.K., VARNER P., THOMPSON J.A. LAWRENCE A.L. & BRAY W.A. (1995). Management procedures for the treatment of necrotizing hepatopancreatitis in farmed shrimp. *In: Swimming Through Troubled Waters*. Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society '95. San Diego, CA, USA, 240 p.
- FRELIER P.F., SIS R.F., BELL T.A. & LEWIS D.H. (1992). Microscopic and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet. Pathol.*, **29**, 269–277.
- GRACIA-VALENZUELA M.H., LUZ ANGELICA ÁVILA-VILLA L.A., GLORIA YEPÍZ-PLASCENCIA G., HERNANDEZ-LOPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCIA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVAN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-GAMEZ J.C., GALAVIZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Cienc. Mar.*, **33**, 1–9.
- JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA, 25p.

~~JOY D.E. (1997). Necrotizing hepatopancreatitis and its management in shrimp ponds. *Aquaculture Magazine*, **23**, 98–101.~~

LEE C.S. & O'BRYEN P.J. (eds). (2003). Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.

LIGHTNER D.V. (ed.) (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.

~~LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BONAMI J.R. (1992). Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas Necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 235–239.~~

LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., **SERBAN I.T., TASCA S.I.** & TEMPLETON J.W. (1996a). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.

LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2008). Capítulo 3: Enfermedades bacterianas. *En: Patología e Inmunología de Camarones*, Editores Vielka Morales y Jorge Cuellar-Angel. Programa CYTED Red II-D vannamei, Panamá, Rep. De Panamá, 120–134.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2010). Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, SA de CV., Av. Río Churubusco 385, Col. Pedro María Anaya, México, D.F. Segunda edición. ISBN: ISBN 978-607-17-0436-8. 1-180.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., **LEMUS PEREIRA A.M., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P.**, SOLIS MONTIEL V.T., **RUIZ-LUNA A.** & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXI**, 434–446.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNANDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., OSUNA-DUARTE A.G., GARCIA-GASCA A., LIGHTNER D.V. & MOTA-URBINA J.C. (2006). Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 19–25.

MORALES-COVARRUBIAS M.S., TLAHUEL-VARGAS L., MARTINEZ-RODRIGUEZ I.E., LOZANO-OLVERA R. & PALACIOS-ARRIAGA J.M. (2012). Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXII**, 72–80.

NUNAN L.M., PANTOJA C.R., GOMEZ-JIMENEZ S. & LIGHTNER D.V. (2013). "Candidatus Hepatobacter penaei," an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Appl. Environ. Microbiol.*, **79** (4), 1407–1409. doi: 10.1128/AEM.02425-12. Epub 2012 Dec 14.

Annexe 23 (suite)

NUNAN L.M., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **80**, 69–73.

VINCENT A.G., BRELAND V.M. & LOTZ J.M. (2004). Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with necrotizing hepatopancreatitis (NHP) bacterium by *per os* exposure. *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 227–233

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2005). Time course of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in experimentally infected *Litopenaeus vannamei* and quantification of NHP bacterium using real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 163–169.

VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to KONA Kona stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

*
* *

NB: At the time of publication (2015) there was not yet an OIE Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

NB: FIRST ADOPTED IN 2012; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2015

CHAPTER 2.2.6.

INFECTION WITH TAURA SYNDROME VIRUS**1. Scope**

~~Infection with Taura syndrome virus means infection with the pathogenic agent Taura syndrome virus (TSV), of the Genus *Aparavirus*, Family *Dicistroviridae*, Order *Picornavirales*. Genus *Aparavirus* genus *Aparavirus* in the Family *Dicistroviridae*.~~

~~Taura syndrome (TS) is a viral disease of penaeid shrimp caused by infection with Taura syndrome virus (TSV) (Bonami *et al.*, 1997; Fauquet *et al.*, 2005; Lightner 1996a; Mari *et al.*, 1998).~~

2. Disease information**2.1. Agent factors****2.1.1. Aetiological agent, agent strains**

~~The aetiological agent of Taura syndrome (TS) is TSV was described as the cause of the disease commonly known as Taura syndrome by Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) of TSV have been documented based on the gene sequence encoding VP1 the largest and presumably dominant of the three major structural proteins of the virus. Based on VP1 sequence variations, these genotypic groups are: 1) the Americas group; 2) the South-East Asian group; 3) the Belize group; and 4) the Venezuelan group (Chang *et al.*, 2004; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).~~

At least two distinct antigenic variants of TSV have been identified by their differential reactivity to monoclonal antibody MAb 1A1, produced to a reference isolate from the Americas (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999): Type A represents those that react with MAb 1A1 (in the enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], Western blots and immunohistochemistry (IHC) with infected tissues) and those that do not. The MAB 1A1 non-reactors were subdivided into Types B (TSV 98 Sinaloa, Mexico) and Type C (TSV 02 Belize), based on host species and virulence. All TSV isolates of the Americas and most, if not all, South-East Asian genotypes react with MAb 1A1. In marked contrast, none of the Belize genotype group reacts with MAb 1A1 (Erickson *et al.*, 2002; 2005), nor does a TSV isolate from the 2005 epizootic in Venezuelan shrimp farms.

TSV particles are 32 nm in diameter, non-enveloped icosahedrons and have a buoyant density of 1.338 g ml⁻¹ in CsCl. The genome of TSV consists of a linear, positive-sense single-stranded RNA 10,205 nucleotides in length, excluding the 3' poly-A tail, and it contains two large open reading frames (ORFs). ORF 1 contains the sequence motifs for nonstructural proteins, such as helicase, protease and RNA-dependent RNA polymerase. ORF 2 contains the sequences for TSV structural proteins, including the three major capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (55, 40, and 24 kDa, respectively). The virus replicates in the cytoplasm of host cells (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

~~TSV has been assigned to the genus *Aparavirus* in the Family *Dicistroviridae* in the 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; King *et al.*, 2012).~~

Other reported causes of Taura syndrome: TS in Ecuador was initially linked to fungicide contamination of shrimp farms, a contention that was supported by litigation for ~ 16 years after the disease was scientifically shown to have a viral aetiology (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 2005). Hence, several papers in the literature propose a toxic aetiology for TS (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

Annexe 24 (suite)

2.1.2. Survival outside the host

No information available.

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

No information available.

2.1.4. Life cycle

Not applicable.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with TSV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern white shrimp (*P. setiferus*), blue shrimp (*P. stylirostris*), and whiteleg shrimp (*P. vannamei*).

The principal host species for TSV are the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, and the Pacific blue shrimp, *P. stylirostris*. While the principal host species for TSV all belong to the penaeid subgenus *Litopenaeus*, other penaeid species can be infected with TSV by direct challenge, although disease signs do not develop. Documented natural and experimental hosts for TSV include: *P. setiferus*, *P. schmitti*, *P. monodon*, *P. chinensis*, *P. japonicus*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. indicus* and *Metapenaeus ensis* (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2004; Lightner, 1996a, 1996b; Overstreet *et al.*, 1997; Srisuvan *et al.*, 2005; Stentiford *et al.*, 2009; Wertheim *et al.*, 2009).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: fleshy prawn (*P. chinensis*), giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), the copepod *Ergasilus manicatus*, and the barnacles *Chelonibia patula* and *Octolasmis muelleri*.

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: northern pink shrimp (*P. duorarum*), kuruma prawn (*P. japonicus*), southern white shrimp (*P. schmitti*), gulf killifish (*Fundulus grandis*), blue crab (*Callinectes sapidus*), the crabs *Uca vocans* and *Sesarma mederi*, and Indo-Pacific swamp crab (*Scylla serrata*).

2.2.3. Susceptible stages of the host

Infection with TSV has been documented in all life stages (i.e. post-larvae [PL], juveniles and adults) of *P. vannamei* (the most economically significant of the two principal host species) except eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

2.2.4. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No data—All postlarval stages of *P. vannamei*, and populations of other known susceptible species.

2.2.5. Target organs and infected tissue

TSV infects and has been shown to replicate (using ISH with specific DNA probes) principally in the cuticular epithelium (or hypodermis) of the general exoskeleton, foregut, hindgut, gills and appendages, and often in the connective tissues, the haematopoietic tissues, the lymphoid organ (LO), and antennal gland. The enteric organs (endoderm-derived hepatopancreas, midgut and midgut caeca mucosal epithelia) and smooth, cardiac, striated muscle, and the ventral nerve cord, its branches and its ganglia typically show no histological signs of infection with TSV and are usually negative for TSV by ISH (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Hasson *et al.*, 1997; 1999a; 1999b; Jimenez *et al.*, 2000; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998a; 1998b; Lightner *et al.*, 1995; Srisuvan *et al.*, 2005).

2.2.6.5. Persistent infection with lifelong carriers

Some members of populations of *P. vannamei* or *P. stylirostris* that survive infection with TSV ~~infections or epizootics~~ may carry the virus for life (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b) and, although not documented, are assumed to pass the virus to their progeny by vertical transmission.

2.2.7.6. Vectors

Sea birds: TSV has been demonstrated to remain infectious for up to 48 hours (after ingestion of TSV-infected shrimp carcasses) in the faeces passed by wild or captive sea gulls (*Larus atricilla*) and chickens (*Gallus gallus domesticus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastro-intestinal system of any bird species. These findings implicate birds as being an important mechanical vector for the transmission of the virus within affected farms or farming regions (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Aquatic insects: the water boatman (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], an aquatic insect that feeds on shrimp carcasses in shrimp farm ponds), has also been shown to serve as a mechanical vector of TSV (Brock, 1997; Lightner, 1995, 1996a, 1996b).

Frozen TSV-infected commodity products: TSV has been found in frozen commodity shrimp (*P. vannamei*) products in samples from markets in the USA that originated in Latin America and South East Asia. Improper disposal of wastes (liquid and solid, i.e. peeled shells, heads, intestinal tracts, etc.) from value added reprocessing of TSV-infected shrimp at coastal locations may provide a source of TSV that may contaminate wild or farmed stocks near the point of the waste stream discharge (Lightner, 1996b; Nunan *et al.*, 2004).

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

No data.

2.3. Disease pattern

Infection with TSV is best known as a disease of nursery- or grow-out-phase *P. vannamei* that occurs within ~14–40 days of stocking PLs into grow-out ponds or tanks, hence, shrimp with infection with TSV are typically small juveniles of from ~0.05 g to <5 g. Larger shrimp may also be affected, especially if they are not exposed to the virus until they are larger juveniles or adults (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz, 1997).

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission of TSV can be by horizontal or vertical routes. Horizontal transmission through by cannibalism or by contaminated water has been demonstrated (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; White *et al.*, 2002). Vertical transmission from infected adult broodstock to their offspring is strongly suspected but has not been experimentally confirmed.

2.3.2. Prevalence

In regions where the virus is enzootic in farmed stocks, the prevalence of infection with TSV has been found in various surveys to range from 0 to 100% (Brock, 1997; Jimenez *et al.*, 2000; Laramore, 1997).

2.3.3. Geographical distribution

TSV is now widely distributed in the shrimp-farming regions of the Americas, South-East Asia and the Middle East (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2009; Yu & Song, 2000).

Annexe 24 (suite)

The Americas: following its recognition in 1992 as a distinct disease of cultured *P. vannamei* in Ecuador (Brock *et al.*, 1995; Jimenez, 1992; Lightner *et al.*, 1995), TSV spread rapidly throughout many of the shrimp-farming regions of the Americas through shipments of infected PL and broodstock (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012). Within the Americas, TS and/or Infection with TSV has been reported from virtually every penaeid shrimp-growing country in the Americas and Hawaii (Aguirre Guzman & Ascencio Valle, 2000; Brock, 1997; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2012; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001). TSV is enzootic in cultured penaeid shrimp stocks on the Pacific coast of the Americas from Peru to Mexico, and it has been occasionally found in some wild stocks of *P. vannamei* from the same region (Lightner & Redman, 1998a; Lightner *et al.*, 1995). TSV has also been reported in farmed penaeid stocks from the Atlantic, Caribbean, and Gulf of Mexico coasts of the Americas, but it has not been reported in wild stocks from these regions (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 2005; 2011; Lightner *et al.*, 2012).

Asia and the Middle East: Infection with TSV was introduced into Chinese Taipei in 1999 with infected imported Pacific white shrimp, *P. vannamei*, from Central and South American sources (Tu *et al.*, 1999; Yu & Song, 2000). Since that original introduction, the virus has spread with movements of broodstock and PL to China (People's Rep. of), Thailand, Malaysia, and Indonesia where it has been the cause of major epizootics with high mortality rates in introduced unselected stocks of *P. vannamei* not selected for resistance (Chang *et al.*, 2004; Lightner, 2011; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005). Recently In During 2010 and 2011, infection with TSV has also been was associated with significant mortalities in farmed *P. indicus* being farmed in Saudi Arabia. By a phylogenetic analysis based on the viral capsid protein 2 (also named as VP1) sequence, the Saudi Arabian TSV clustered into a new, distinct group (Tang *et al.*, 2012; Wertheim *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortality and morbidity

At a farm level, TS epizootics outbreaks of infection with TSV involving unselected (i.e. not selected for TSV resistance) stocks of *P. vannamei* not selected for resistance, the principal host species for infection with TSV, typical cumulative mortalities range from 40 to >90% in cultured populations of PL, juvenile, and subadult life stages. TSV-resistant lines of *P. vannamei* are available which show survival rates of up to 100% in laboratory challenge with all four TSV genotypes (Lightner *et al.*, 2009; Moss *et al.*, 2001).

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks of infection with TSV are more frequent when salinities are below 30 ppt (Jimenez *et al.*, 2000).

2.4. Control and prevention

2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for TSV are available.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. ~~Resistance~~ Breeding for resistance

After TSV emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to infection with TSV (genotype 1, MAb 1A1 Type A). Following from this discovery and due to the disease occurrence in TSV reaching Mexico in 1994 where it caused crop failures of *P. vannamei*, selected lines of TSV-resistant *P. stylirostris* became the dominant shrimp farmed in western Mexico from 1995. However, in 1998–1999, a new 'strain' of TSV (Type B; Erickson *et al.*, 2002; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarin-Herzberg & Ascencio, 2001) emerged and caused massive epizootics in *P. stylirostris*. The emergence of this new 'strain' of TSV was soon followed in late 1999 by the introduction of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp farms in western Mexico, to which *P. stylirostris* had no resistance, effectively ending any interest in the culture of *P. stylirostris* in Mexico.

TSV-resistant domesticated stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have been developed. Some domesticated lines of TSV-resistant *P. vannamei* (that are also TSV-free) are in widespread use by the shrimp-farming industries of the Americas and South-East Asia (Clifford, 1998; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002). After the appearance of infection with TSV in Central America, improved TSV resistance was reported in wild caught *P. vannamei* PLs used to stock shrimp farms in the region (Laramore, 1997).

2.4.5. Restocking with resistant species

Selected lines of TSV resistant *P. vannamei* have been developed and are commercially available (Clifford, 1998; Laramore, 1997; Moss *et al.*, 2001; White *et al.*, 2002).

2.4.6. Blocking agents

Resistance to infection with TSV was reported by expression of the TSV coat protein antisense RNA in *P. vannamei* zygotes. Transgenic juveniles reared from zygotes protected in this manner showed improved resistance to TSV challenge by *per os* or intramuscular (IM) injection routes (Lu & Sun, 2005). Similar results have been produced by injection of short random double-stranded RNAi sequences into juvenile *P. vannamei* (Robalino *et al.*, 2004).

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

It is possible that TSV might be transmitted vertically (transovarian transmission), despite ~~no~~ the lack of published reports documenting this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is good management practice and it is recommended for its potential to reduce TSV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry and disease control and management practices have been used successfully to reduce the risks of infection with TSV ~~infections and disease~~ occurring during farm grow-out. These include the application of PCR assays for prescreening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), following and restocking of entire culture regions with TSV-free stocks (Dixon & Dorado, 1997), and the development of specific pathogen free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Lotz *et al.*, 1995; Moss *et al.*, 2001; Pruder *et al.*, 1995; Wyban 1992; Wyban *et al.*, 2004). The adoption of the latter technology (SPF stocks) has proven to be among the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with TSV. Unfortunately, there is a misconception in the industry that SPF is a genetic trait rather than a condition of health status. The development of SPF *P. vannamei* that were free not only of TSV, but also of all the major known pathogens of penaeid shrimp, has resulted in the introduction of the species to Asia and to its surpassing *P. monodon* in 2005 as the dominant farmed shrimp species in Asia, as well as the Americas where the SPF stocks were developed (FAO, 2006; Lightner, 2005; Rosenberry, 2004).

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Suitable specimens for testing for infection with TSV include PL, juveniles and adults. While TSV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for TSV detection or certification of freedom from infection with TSV.

3.2. Preservation of samples for submission

For routine histology or molecular assays, and guidance on preservation of samples for the intended test method see Chapter 2.2.0.

3.3. Pooling of samples

~~Samples taken for molecular tests may be combined as pooled samples representing no more than five specimens per pooled sample of juveniles, subadults and adults. However, for eggs, larvae and PL pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50–150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.~~

Annexe 24 (suite)

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated.

3.4. Best organs and tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of infection with TSV is the cuticular epithelium. In chronic infections the LO is the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.5. Samples or tissues that are not suitable

TSV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection with TSV.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Only acute-phase ~~TS-clinical infection with TSV-disease~~ clinical infection with TSV-disease can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute-phase clinical infection with TSV-disease.

4.1.2. Behavioural changes

Only shrimp with acute-phase clinical infection with TSV ~~TS-disease~~ present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp apparently become hypoxic and move to the pond edges or pond surface where dissolved oxygen levels are higher. Such shrimp may attract seabirds in large numbers. In many ~~TS-disease~~ outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicates the presence of a serious disease outbreak (which is often either infection with TSV or ~~infection with~~ white spot syndrome virus ~~when sea birds are observed~~) to the farm manager.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

~~Infection~~ Infection with the TSV has three distinct phases, acute, transition, and chronic, which are grossly distinguishable (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). Gross signs presented by juvenile, subadult and adult shrimp in the transition phase of infection with TSV are unique and provide a presumptive diagnosis of the disease.

Acute phase: gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase infection with TSV include expansion of the red chromatophores giving the affected shrimp a general, overall pale reddish coloration and making the tail fan and pleopods distinctly red; hence 'red tail' disease was one of the names given by farmers when the disease first appeared in Ecuador (Lightner *et al.*, 1995). In such shrimp, close inspection of the cuticular epithelium in thin appendages (such as the edges of the uropods or pleopods) with a ×10 hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute infection with TSV ~~TS~~ typically have soft shells, an empty gut and are often in the late D stages of the moult cycle. Acutely affected shrimp usually die during ecdysis. ~~If the affected shrimp are larger than ~1 g, moribund shrimp may be visible to sea birds at the pond edges and surface. Thus, during the peak of severe epizootics, hundreds of sea birds (gulls, terns, herons, cormorants, etc.) may be observed feeding on affected moribund shrimp that accumulate at the surface of the affected pond surface and edges (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Garza *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995; Vanpatten *et al.*, 2004).~~

Transition (recovery) phase: although only present for a few days during outbreaks of infection with TSV-TS epizootics, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a tentative diagnosis of infection with TSV-infection. During the transition phase (which may be occurring while many shrimp in the affected populations are still in the acute phase and daily mortalities are high), fair to moderate numbers of shrimp in affected ponds show random, multifocal, irregularly shaped melanised cuticular lesions. These melanised spots are haemocyte accumulations indicating the sites of resolving TSV lesions in the cuticular epithelium. Such shrimp may or may not have soft cuticles and red-chromatophore expansion, and may be behaving and feeding normally (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011).

Chronic phase: after successfully moulting, shrimp in the transition phase move into the chronic phase of infection with TSV in which persistently infected shrimp show no obvious signs of disease (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011; Lightner *et al.*, 1995). However, *P. vannamei* that are chronically infected with TSV may be less resistant to normal environmental stressors (i.e. sudden salinity reductions) than uninfected shrimp (Lotz *et al.*, 1995).

4.2.2. Clinical chemistry

Not applicable.

4.2.3. Microscopic pathology (for penaeid hosts)

Infection with TSV in the acute and chronic phases can be diagnosed ~~most reliably~~ using histological methods (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Pathognomonic TSV-induced pathology is unique in acute-phase infections (Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a; 2011). In chronic infections with TSV-infections, the only lesion typically presented by infected shrimp is the presence of an enlarged LO with multiple LO spheroids (LOS) (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner 2011), which cannot be distinguished from LOS induced by chronic infections of other RNA viruses (Lightner, 1996a). When LOS are observed by routine histology and chronic infection with TSV infection is suspected, a molecular test (ISH with TSV-specific probes, or reverse-transcription [RT] PCR [see Section 4.3.1.2.7]) is recommended for confirmation of infection with TSV-infection.

4.2.3.1. Acute phase of Taura syndrome

Diagnosis of infection with TSV in the acute phase of the disease is dependent on the histological demonstration (in haematoxylin and eosin [H&E] stained preparations) of multifocal areas of necrosis in the cuticular epithelium of the general body surface, appendages, gills, hindgut, and foregut (the oesophagus, anterior and posterior chambers of the stomach). Cells of the subcuticular connective tissues and adjacent striated muscle fibres basal to affected cuticular epithelium are occasionally affected. In some severe cases of acute-phase infection with TSV, the antennal gland tubule epithelium is also destroyed. Prominent in the multifocal cuticular lesions are conspicuous foci of affected cells that display an increased eosinophilia of the cytoplasm and pyknotic or karyorrhectic nuclei. Cytoplasmic remnants of necrotic cells are often extremely abundant in these infections with TSV acute-phase lesions and these are generally presented as spherical bodies (1–20 µm in diameter) that range in staining from eosinophilic to pale basophilic. These structures, along with pyknotic and karyorrhectic nuclei, give acute-phase TS lesions a characteristic 'peppered' or 'buckshot-riddled' appearance, which is considered to be pathognomonic for the infection when there is no concurrent necrosis of the parenchymal cells of the LO tubules. The absence of necrosis of the LO in acute-phase infection with TSV infections distinguishes it from acute-phase infection with yellowhead virus genotype 1-disease in which similar patterns of necrosis to those induced by infection with TSV may occur in the cuticular epithelium and gills (Lightner, 1996a).

In TSV-infected tissues, pyknotic or karyorrhectic nuclei give a positive (for DNA) Feulgen reaction, which distinguishes them from the less basophilic to eosinophilic cytoplasmic inclusions that do not contain DNA. The absence of haemocytic infiltration or other signs of a significant host-inflammatory response distinguishes the acute phase of infection with TSV from the transitional phase of the disease (Bondad-Reantaso *et al.*, 2001; Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; 1997; Erickson *et al.*, 2002; 2005; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

Annexe 24 (suite)**4.2.3.2. Transition (recovery) phase of infection with Taura syndrome virus**

In the transitional phase of infection with TSV, typical acute-phase cuticular lesions decline in abundance and severity and are replaced by conspicuous infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. The masses of haemocytes may become melanised giving rise to the irregular black spots that characterise the transition phase of the disease. In H&E sections, such lesions may show erosion of the cuticle, surface colonisation and invasion of the affected cuticle and exposed surface haemocytes by *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 2011). Sections of the LO during the transition phase of infection with TSV may appear normal with H&E staining. However, when sections of the LO are assayed for TSV by ISH with a specific cDNA probe (or by ISH with MAb 1A1 for TSV type A, genotype 1), large quantities of TSV are shown accumulating in the more peripheral parenchymal cells of the LO tubules (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3.3. Chronic phase of infection with Taura syndrome virus

Shrimp in the chronic phase of infection with TSV display no gross signs of infection, and histologically the only sign of infection is the presence of numerous prominent LOS, which may remain associated with the main body of the paired LO, or which may detach and become ectopic LOS bodies that lodge in constricted areas of the haemocoel (i.e. the heart, gills, in the subcuticular connective tissues, etc.). Such LOS are spherical accumulations of LO cells and haemocytes and may be distinguished from normal LO tissues by their spherical nature and the lack of the central vessel that is typical of normal LO tubules. When assayed by ISH with a cDNA probe for TSV (or with MAb 1A1 using ISH) some cells in the LOS give positive reactions to the virus, while no other target tissues react (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; 2011).

4.2.4. Wet mounts

Direct microscopy of simple unstained wet mounts from excised pieces of the gills, appendage tips, etc., examined by phase- or reduced-light microscopy may be used to demonstrate (and make a tentative diagnosis of acute-phase infection with TSV ~~infection~~) focal lesions of acute-phase infection with TSV ~~infection~~ in cuticular epithelial cells. Preparations presenting acute-phase infection with TSV ~~infection~~ will contain numerous spherical structures (see the histopathological methods in Section 4.2.3 above), which are pyknotic and karyorrhectic nuclei and cytoplasmic remnants of necrotic cells.

4.2.5. Smears

Not applicable.

4.2.6. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.2.7. Electron microscopy/cytopathology

Not currently applicable for diagnostic purposes.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods****4.3.1.1. Microscopic methods***4.3.1.1.1. Wet mounts*

See Section 4.2.4.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification

4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

TSV has not been grown *in vitro*, as no crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Pantoja et al., 2004). ~~Despite a~~ Although one publication ~~that~~ incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle et al., 2003), two other laboratories that repeated the study ~~and~~ both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines with that are known to have susceptibility to human picornaviruses (Luo et al., 2004; Pantoja et al., 2004).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

An MAb for detection of TSV may be used to assay samples of haemolymph, tissue homogenates, or Davidson's AFA-fixed tissue sections from shrimp (Erickson *et al.*, 2002; 2005; Poulos *et al.*, 1999). TSV MAb 1A1 may be used to distinguish some variants or 'strains' of TSV from other strains (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

4.3.1.2.3. Bioassay method

Confirmation of infection with TSV may be accomplished by bioassay of TSV-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the virus (Brock *et al.*, 1997; Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Oral or injection protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped carcasses of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks (White *et al.*, 2002). The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only SPF (TSV-free) tissue and normal shrimp feed is required. When the carcass feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for TSV, TSV-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of disease and unusual mortalities (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

With the injection bioassay protocol, a variety of sample types may be tested for TSV. Whole shrimp are used if they were collected during an outbreak of infection with TSV-~~epizootic~~. Heads only should be used if shrimp display gross transition-phase lesions (multifocal melanised spots on the cuticle) or no clinical signs of infection (chronic phase) as the virus, if present, will be concentrated in the LO (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). For non-lethal testing of broodstock, haemolymph samples may be taken and used to expose the indicator shrimp by IM injection (Lightner, 1996a).

To perform the IM (injection) bioassay for TSV:

Note that tissues and the resulting homogenate should be kept cool during the entire protocol by maintaining on ice.

- i) Prepare a 1:2 or 1:3 ratio of TSV-suspect shrimp heads or whole shrimp with TN buffer (~~see Chapter 2.2.2, infectious hypodermal and haematopoietic necrosis [IHHN], for the composition of this buffer~~ 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.4 M NaCl) or sterile 2% saline prepared with distilled water.
- ii) Homogenise the mixture using a tissue grinder or blender. Do not permit the mixture to heat up by excessive homogenisation or grinding.
- iii) Clarify the homogenate by centrifugation at 3000 **g** for 10 minutes. Decant and save the supernatant fluid. ~~Discard the pellet.~~
- iv) Centrifuge the supernatant fluid at 27,000 **g** for 20–30 minutes at 4°C. Decant and save the supernatant fluid. ~~Discard the pellet.~~
- v) Dilute the supernatant fluid from step iv to 1/10 to 1/100 with sterile 2% saline. This solution may now be used as the inoculum to inject indicator shrimp (or filter sterilised as described in step vi).

Annexe 24 (suite)

- vi) Filter the diluted supernatant fluid from step v using a sterile syringe (size depends on the final volume of diluted supernatant) and a sterile 0.45 µm syringe filter. ~~Multiple filters may have to be used as they clog easily.~~ Filtrate should be collected in a sterile test tube or beaker. The solution can ~~now~~ be stored frozen (~~recommend -20°C at -20°C (or -80°C for short term [weeks] storage and -80°C for a long-term [months to years] storage)~~ or used immediately to inject indicator shrimp.
- vii) Indicator shrimp should be from **infection with** TSV-susceptible stocks of SPF *P. vannamei* (such as the 'Kona stock') (Moss *et al.*, 2001), which are commercially available from a number of sources in the Americas, and not from selected lines of known **infection with** TSV-resistant stocks.
- viii) Inject 0.01 ml per gram of body weight using a 1 ml tuberculin syringe. Indicator shrimp should be injected intramuscularly into the third tail segment. If the test shrimp begin to die within minutes post-injection, the inoculum contains excessive amounts of proteinaceous materials and should be further diluted prior to injecting additional indicator shrimp. Sudden death occurring post-injection is referred to as 'protein shock', and is the result of systemic clotting of the shrimp's haemolymph in response to the inoculum (Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).
- ix) Haemolymph samples may be diluted (1/10 or 1/20 in TN buffer), filter sterilised (if necessary), and injected into the indicator shrimp without further preparation.
- x) If TSV was present in the inoculum, the indicator shrimp should begin to die within 24–48 hours post-injection. Lower doses of virus may take longer to establish a lethal infection and shrimp should be monitored for at least 10–15 days post-injection.
- xi) The presence (or absence) of TSV in the indicator shrimp should be confirmed by histological analysis (or ISH by gene probe, if available) of Davidson's fixed moribund shrimp. If additional confirmation is needed beyond demonstration of pathognomonic TSV lesions, RT-PCR with sequencing of the resulting amplicon can be carried out.

4.3.1.2.4. Sentinel shrimp bioassay method

As a variation to the bioassay technique, a 'sentinel shrimp' system may be used. For example, TSV-sensitive stocks of small juvenile SPF *P. vannamei* may be held in net-pens in tanks, or in the same water system, with other shrimp of unknown **infection with** TSV status to bioassay for the presence of infectious agents such as TSV.

4.3.1.2.5. Dot-blot immunoassay method

- i) For the dot-blot immunoassay method, 1 µl of test antigen (purified virus, infected shrimp haemolymph or SPF shrimp haemolymph) is dotted on to the surface of MA-HA-N45 assay plates (Millipore, ~~South San Francisco, California [CA], USA~~)⁵.
- ii) After air drying, the wells are blocked for 1 hour at room temperature with 200 µl of a buffer containing phosphate-buffered saline and 0.05% Tween 20 (PBST) mixed with 10% normal goat serum (Life Technologies, ~~Gibco BRL~~) and 2% Hammersten casein (Amersham Life Sciences, ~~Arlington Heights, Illinois, USA~~).
- iii) The wells are washed three times with PBST and then reacted with 100 µl primary antibody (MAb or mouse polyclonal antibodies) for 30 minutes at room temperature.
- iv) Alkaline-phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG, γ chain specific, secondary antibody (Zymed, ~~South San Francisco, CA~~) diluted 1/1000 in PBST plus 10% normal goat serum is used for detection (30 minutes at room temperature).
- v) After washing three times with PBST, once with PBS and once with distilled water, the reactions are visualised by development for 15 minutes at room temperature with nitroblue tetrazolium and bromo-chloro-indoyl phosphate (Roche Diagnostics, ~~Corp.~~) in 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (100 mM each) buffer containing 50 mM MgCl₂, pH 9.5.
- vi) Reactions are stopped with distilled water.

⁵ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

- vii) The reactions are graded using a scale from 0 to +4, with the highest intensity reaction being equivalent to the reaction generated using the MAb against the reference control consisting of semi-purified TSV. A negative reaction is one in which no coloured spot is visible in the well.

4.3.1.2.6. Other antibody-based methods

The TSV MAb 1A1 may be applicable to other antibody-based test formats (i.e. indirect fluorescent antibody [IFAT] or immunohistochemistry [IHC] tests with tissue smears, frozen sections, or deparaffinised fixed tissues). MAb 1A1 is applicable for use in an IHC format using Davidson's AFA-fixed tissue sections (Erickson *et al.*, 2002; 2005).

It is recommended that unexpected results from MAb-based tests for detection of TSV should be interpreted in the context of clinical signs, case history, and in conjunction with other test results (e.g. RT-PCR test results, or findings from histology or ISH with a TSV-specific DNA probe – see appropriate sections in this chapter).

4.3.1.2.7. Molecular techniques

ISH and RT-PCR tests for detection of TSV have been developed, and kits of RT-PCR methods for TSV are commercially available. The dot-blot method for TSV detection is not available.

4.3.1.2.7.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for detection of TSV may be produced in the laboratory. The ISH method provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for TSV detection and diagnosis that employ classic histological methods (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner & Redman 1998b; Mari *et al.*, 1998). The ISH assay of routine histological sections of acute- and transition-phase lesions in the cuticular epithelium, other tissues, and of LOS in transition and chronic phase with a specific DIG-labelled cDNA probe to TSV, provides a definitive diagnosis of infection with TSV ~~infection~~ (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Pathognomonic TSV-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. Not reacting to the probe are the prominent karyorrhectic nuclear fragments and pyknotic nuclei that contribute to the pathognomonic 'buckshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (See Chapter 2.2.3 Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

False-negative ISH results may occur with Davidson's fixed tissues if tissues are left in fixative for more than 24–48 hours. The low pH of Davidson's fixative causes acid hydrolysis of the TSV single-stranded RNA genome, resulting in false-negative probe results. This hydrolysis can be avoided through the use of neutral fixatives, including an 'RNA-friendly' fixative developed for shrimp, or by the proper use (avoiding fixation times over 24 hours) of Davidson's fixative (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998).

4.3.1.2.7.2. Reverse-transcription (RT)-PCR method

Tissue samples (haemolymph, pleopods, whole small shrimp, etc.) may be assayed for TSV using RT-PCR. Primers designated as 9992F and 9195R, amplify a 231 base pair (bp) sequence of the TSV genome (Nunan *et al.*, 1998). The fragment amplified is from a conserved sequence located in the intergenic region and ORF 2 of TSV. Primer 9992F is located near the 3' end of intergenic region and 9195R is located on ORF 2 within VP2 (= CP1) (Mari *et al.*, 2002; Nunan *et al.*, 1998). A new pair of TSV primers (7171F and 7511R) has been developed and shown to have an improved sensitivity for TSV detection (Navarro *et al.*, 2009). ~~These replacement primers are 9992F/9195R and they are located within ORF 2.~~

Annexe 24 (suite)

Primer	Product	Sequence	Temperature	G+C%
9992F	231 bp	5'-AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT-3'	69°C	55%
9195R		5'-TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC-3'	63°C	50%
7171F	341 bp	5'-CGA-CAG-TTG-GAC-ATC-TAG-TG-3'	63°C	50%
7511R		5'-GAG-CTT-CAG-ACT-GCA-ACT-TC-3'		50%

The RT-PCR method outlined below for detection of TSV generally follows the method used in Nunan *et al.* (1998).

- i) Preparation of RNA template: RNA can be extracted from fresh, frozen and ethanol-preserved tissues. Extraction of RNA should be performed using commercially available RNA tissue extraction kits, such as the High Pure RNA Tissue Kit (Roche, Penzberg, Germany) and following the manufacturer's procedures for production of quality RNA templates. Viral RNA can be isolated using any commercially available RNA isolation kit. The amount of tissue required will depend on the kit selected (i.e. Qiagen RNA extraction kit, Promega and Roche RNA purification kit recommend using 25–50 mg of tissue). Depending on the kit used, the elution volume for Roche and Qiagen and low elution volume RNA isolation Promega extraction kit is 100 µl. Extracted RNA should be maintained at –20°C before testing, however, for long-term storage the RNA should be kept at –70°C.
- ii) The RT-PCR assay is carried out in solution, using 40–5 µl of total RNA extracted from haemolymph, frozen shrimp tissues, ethanol fixed tissue as the template (concentration of RNA = 1–100 ng ml⁻¹).
- iii) The following controls should be included in every RT-PCR assay for TSV: (a) known TSV-negative tissue sample; (b) a known TSV-positive sample (tissue or purified virus); and (c) a 'no-template' control.
- iv) ~~The GeneAmp® EZ rTth RNA PCR kit (Applied Bioscience, Foster City, CA) was used. SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Tag DNA polymerase, Life Technologies) can be used for all amplification reactions described here. Alternative kits. Other commercially available equivalent reagent can also be used and adjusted for use for this assay.~~
- v) The optimised RT-PCR conditions (final concentrations in 50–25 µl total volume) for detection of TSV in shrimp tissue samples are: primers (0.62 µM each), dNTPs (300 µM each), rTth DNA polymerase (2.5 U 50 µl⁻¹), manganese acetate (2.5 mM), in 5 × EZ buffer (25 mM Bicine, 57.5 mM potassium acetate, 40% [w/v] glycerol, pH 8.2).
- vi) ~~If the thermal cycler does not have a heated lid, then light mineral oil (50 µl) is overlaid on the top of the 50 µl reaction mixtures to prevent condensation or evaporation during thermal cycling.~~

<u>Reagent</u>	<u>Volume</u>	<u>Final concentration</u>
<u>dH₂O</u>	<u>5.5 µl</u>	
<u>2× Reaction Mix</u>	<u>12.5 µl</u>	<u>1×</u>
<u>Primer Forward/Reverse (10 M each)</u>	<u>1.0 µl</u>	<u>0.4 µM</u>
<u>RT/Tag enzyme Mix</u>	<u>1.0 µl</u>	
<u>RNA template*</u>	<u>5.0 µl</u>	<u>1–50 ng</u>

- vi) The RNA template and all the reagents are combined and reverse transcription is allowed to proceed at 60°C for 30 minutes, followed by 94°C for 2 minutes ~~95°C for 2 minutes~~. At the completion of reverse transcription, the samples are amplified for 39 cycles under the following conditions: denaturation at 95°C for 45 seconds, and then annealing/extension at 62°C for 45 seconds. A final extension step for 7 minutes at 60°C follows the last cycle. in a 4°C soak file.

~~Note: The reaction conditions described here were optimised using an automatic Thermal Cycler GeneAmp 980 (Applied Biosystems). The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.~~

- ~~vii) A 6 µl of the completion of reverse transcription, the samples are amplified for 40 cycles under the following conditions: denaturation at 94°C for 45 seconds, and then annealing/extension at 60°C for 45 seconds. A final extension step for 7 minutes at 60°C follows the last cycle and the process is terminated in a 4°C soak file.~~
- ~~ix) Following the termination of RT-PCR, the amplified cDNA solutions are drawn off from beneath the mineral oil and placed into clean 0.5 ml microfuge tubes.~~
- ~~x) A 10 µl sample of the amplified products can then be added to the well of a 2.0-1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 g ml⁻¹), and electrophoresed in 0.5 × TBE (Tris, boric acid, ethylene diamine tetra-acetic acid [EDTA]).~~
- ~~xi) A 1 kb DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) is used as a marker.~~
- ~~xiii) Details of the composition of the reagents and buffers used here may be found in Chapter 2.2.2 IHHN.~~

4.3.1.2.7.3. Real-time RT-PCR method for TSV

Real-time RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of ~~ream~~ real-time RT-PCR is ~100 copies of the target sequence from the TSV genome (~~Dahr~~ Dhar et al., 2002; Tang et al., 2004).

The real-time RT-PCR method using TaqMan chemistry described below for TSV generally follows the method used in Tang et al. (2004).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the ORF1 region of the TSV genomic sequence (GenBank AF277675) that encodes for nonstructural proteins. The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software (~~Applied Biosystems Life Technologies~~). The upstream (TSV1004F) and downstream (TSV1075R) primer sequences are: 5'-TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T-3' and 5'-GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT-3', respectively. The TaqMan probe, TSV-P1 (5'-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-3'), which corresponds to the region from nucleotide 1024 to 1051, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 5-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' end and N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end (~~Applied Biosystems, catalog no. 450025~~).
- ii) Preparation of RNA template: the extraction and purification of RNA template from haemolymph, or shrimp tissue, is the same as that described in the section for ~~traditional~~ conventional RT-PCR.
- iii) It is necessary to include a 'no template control' in each reaction run. This is to rule out the presence of contaminants in the reaction mixture ~~or in the heat block of the thermal cycler~~. A positive control should also be included, and this can be an *in-vitro* transcribed RNA containing the target sequence, purified virions, or RNA extracted from TSV-infected tissue.
- iv) The real-time RT-PCR reaction mixture contains: TaqMan One step RT-PCR Fast virus 1-Step Master Mix (~~Applied Biosystems, part no. 4309169 Life Technologies~~), 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of TaqMan probe, 5–50 ng of RNA, and water in a reaction volume of 25 10 µl. ~~For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.~~
- v) Amplification can be performed with the ~~GeneAmp 5700 Sequence Detection StepOnePlus PCR System~~ (~~Applied osystems; ABI PRISM 7000, 7300, 7500, or newer models Life Technologies~~ or equivalent thermocycler real-time PCR systems). The cycling consists of reverse transcription at ~~48-50~~ 50°C for 30 minutes and initial denaturation at 95°C for ~~40 minutes~~ 20 seconds, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for ~~15-3~~ 15 seconds and annealing/extension at 60°C for ~~1 minute~~ 30 seconds. The levels of fluorescence are measured at the end of each annealing/extension cycle 30 seconds.

Annexe 24 (suite)

- vi) At the end of the reaction, real-time fluorescence measurements are analysed. A threshold will be set to be above the baseline ~~that begins to detect the increase in signal associated with an exponential increase in PCR product~~. Samples will be defined as negative if there is no Ct (threshold cycle) value after 40 cycles. Samples with a Ct value lower than 40 cycles are considered to be positive.

4.3.1.2.7.4. Sequencing

RT-PCR products may be ~~cloned and~~ sequenced when necessary to confirm infection by TSV or to identify false positives or nonspecific amplification (Mari *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2005; Srisuvan *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

4.3.1.2.8. Agent purification

Methods for TSV isolation and purification are available (Bonami *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1995; Mari *et al.*, 2002; Poulos *et al.*, 1999), but these are not recommended for routine diagnosis of TS.

4.3.2. Serological methods

Not applicable because shrimp are invertebrate animals which do not produce specific antibodies that could be used to demonstrate infection by or prior exposure to TSV.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of **infection with** TSV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended or not available for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for surveillance, detection and diagnosis

Method	Surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	c	c	b	c
Bioassay	d	d	d	d	c	b
Direct LM (wet mount)	d	d	c	dc	c	d
Histopathology	d	b	b	c	a	a
Transmission EM	d	d	d	d	c	c
Antibody-based assays	d	d	c	c	b	b
<i>In-situ</i> DNA probes	d	c	b	b	a	a
RT-PCR, Real-time RT-PCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy;
RT-PCR = reverse-**transcription transcriptase**-polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from **infection with** Taura syndrome **virus**

As indicated in Table 5.1, RT-PCR (Section 4.3.1.2.7.2) **or real-time RT-PCR (Section 4.3.1.2.7.3) are** the recommended methods for targeted surveillance for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity.

When investigating acute mortality episodes as part of a targeted surveillance programme, demonstration of pathognomonic TSV-induced lesions in the cuticular epithelium by histology (with or without confirmation by ISH with TSV-specific DNA probes) is a suitable method (Table 5.1).

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with TSV ~~shall be is~~ suspected if at least one of the following criteria is met:

i) histopathology consistent with infection with TSV

or

ii) a positive result by RT-PCR or real-time RT-PCR.

A suspect case is represented by:

- ~~• Sudden high mortalities in late PL, juvenile or subadult *P. vannamei* or *P. stylirostris* in regions where TSV is enzootic;~~
- ~~• The sudden presence of numerous sea birds (gulls, cormorants, herons, terns, etc.) 'fishing' in one or more shrimp culture ponds;~~
- ~~• Samples of cultured *P. vannamei* or *P. stylirostris* from ponds with feeding sea birds that present gross signs indicative of acute or transition phase TS, such as a general reddish colouration, lethargy, soft shells, empty guts, and the presence of numerous irregular black spots on the cuticle; or~~
- ~~• Demonstration of foci of necrosis in the cuticular epithelium using low magnification (i.e. a ×10 hand lens or by direct microscopic examination of wet mounts) to examine the edges of appendages such as uropods or pleopods, or the gills.~~

7.2. Definition of confirmed case

Infection with TSV is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

i) histopathology consistent with infection with TSV

ii) ISH positive result in target tissues

iii) RT-PCR (followed by sequencing), or real-time RT-PCR with positive results for **infection with** TSV.

~~Any combination of a molecular (PCR or ISH) test and a morphological (histology) test using at least two of the following three methods (with positive results):~~

- ~~• Histological demonstration of diagnostic acute phase lesions of infection with TSV in (especially) the cuticular epithelia of the foregut (oesophagus, anterior, or posterior chambers of the stomach) and/or in the gills, appendages, or general cuticle. Such lesions are pathognomonic for infection with TSV only when they occur without accompanying severe acute necrosis (with nuclear pyknosis and karyorrhexis) of the parenchymal cells of the lymphoid organ tubules (which may occur in acute phase yellowhead virus infections).~~

Annexe 24 (suite)

- ~~ISH positive (with a TSV specific cDNA probe) signal to TSV type lesions in histological sections (i.e. cuticular acute phase TS lesions) or to distinctive lymphoid organ spheroids (LOS) in the lymphoid organs of shrimp with chronic phase TS lesions.~~
- ~~RT-PCR positive results for infection with TSV.~~
- ~~Sequencing of PCR product encompassing CP2 may be accomplished, as needed, to determine the TSV genotype (Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).~~

8. References

- AGUIRRE GUZMAN G. & ASCENCIO VALLE F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res. Dev. Microbiol.*, **4**, 333–348.
- AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISENO-GARCIA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.
- BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.
- BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P., EDITORS (2001). Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper 402, Supplement 2. Rome, FAO, 240 pp.
- BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol Biotechnol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.
- BROCK J.A., GOSE R.B., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1997). Recent developments and an overview of Taura Syndrome of farmed shrimp in the Americas. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 275–283.
- CHANG Y.S., PENG S.E., YU H.T., LIU F.C., WANG C.H., LO, C.F. & KOU G.H. (2004). Genetic and phenotypic variations of isolates of shrimp Taura syndrome virus found in *Penaeus monodon* and *Metapenaeus ensis* in Taiwan. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2963–2968.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress, D.E. Jory, ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., ROUX M.M. & KLIMPEL K.R. (2002). Quantitative assay for measuring the Taura syndrome virus and yellow head virus load in shrimp by real-time RT-PCR using SYBR Green **Chemistry chemistry**. *J. Virol. Methods*, **104**, 69–82.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, May/June, 30–42.
- ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). Taura **Syndrome syndrome Virus virus** from Belize represents a unique variant. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 91–98.
- ERICKSON H.S., ZARAIN-HERZBERG M. & LIGHTNER D.V. (2002). Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 1–10.

~~FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A. (2005). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 1259 pp.~~

FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.

~~FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2006). State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 134 p.~~

GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.

HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T., MARI J. & BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.L.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.

HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura Syndrome in *Penaeus vannamei*: Demonstration demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.

INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 365–379.

JIMENEZ R. (1992). Syndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador. Camara Nacional de Acuicultura*, Guayaquil, Ecuador, 1–16.

JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.

KING A., ADAMS M., CARSTENS E. & LEFKOWITZ E.J., EDITORS (2012). Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, Academic Press, London, UK, 840–845.

LARAMORE C.R. (1997). Shrimp culture in Honduras following the Taura syndrome virus. *In: Proceeding of the 4th Symposium on Aquaculture in Central America: Focusing on Shrimp and Tilapia, Tegucigalpa, Honduras*, World Aquaculture Soc., Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–7.

LIGHTNER D.V. (1995). Taura syndrome: an economically important viral disease impacting the shrimp farming industries of the Americas including the United States. Proceedings of the 99th Annual Meeting US Animal Health Association, Reno, Nevada, USA, 36–52.

LIGHTNER D.V. (ED.) (1996A). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.

LIGHTNER D.V. (1996B). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.

LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquac.*, **9**, 27–52.

Annexe 24 (suite)

- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. (2011). Status of shrimp diseases and advances in shrimp health management. *In: Diseases in Asian Aquaculture VII*, Bondad-Reantaso M.G., Jones J.B., Corsin F. & Aoki T., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia, 121–134.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998a). Strategies for the control of viral diseases of shrimp in the Americas. *Fish Pathol.*, **33**, 165–180.
- LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998b). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 384-424.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.
- LOTZ J.M. (1997). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.
- LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.
- LOTZ J.M., BROWDY C.L., CARR W.H., FRELIER P.F. & LIGHTNER D.V. (1995). USMSFP suggested procedures and guidelines for assuring the specific pathogen status of shrimp broodstock and seed. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 66–75.
- LU Y. & SUN P.S. (2005). Viral resistance in shrimp that express an antisense Taura syndrome virus coat protein gene. *Antiviral Res.*, **67**, 141–146.
- LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of **Penaeid penaeid** shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.
- MARI J., POULOS B.T., LIGHTNER D.V. & BONAMI J.R. (2002). Shrimp Taura syndrome virus: genomic characterization and similarity with members of the genus Cricket paralysis-like viruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 947–928 **915-926**.
- MOSS S.M., ARCE S., ARGUE B.J., OTOSHI C.A., CALDERON F.R.O. & TACON A.G.J. (2001). *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 1–19.
- NAVARRO S.A., TANG K.F.J & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.
- NIELSEN L., SANG-OUW W., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.

- NUNAN L.M., TANG NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). Real time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura Syndrome Virus (TSV). *Aquaculture*, **229**, 1–10.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCILWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.
- POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of the Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.
- PRUDER G.D., BROWN C.L., SWEENEY J.N. & CARR W.H. (1995). High health shrimp systems: seed supply – theory and practice. *In: Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 40–52.
- ROBALINO J., BROWDY C.L., PRIOR S., METZ A., PARNELL P., GROSS P. & WARR G. (2004). Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* **78**, 10442–10448.
- ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.
- ROSENBERRY B. (2004). *World Shrimp Farming 2004*. Number 17, Published by Shrimp News International, San Diego, California, USA, 276 pp.
- SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.
- ~~STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura syndrome, Yellowhead disease and White Spot Disease and implication of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.~~
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Res.*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., NAVARRO S.A., PANTOJA C.R., ARANGUREN F.L. & LIGHTNER D.V. (2012) New genotypes of white spot syndrome virus (WSSV) and Taura syndrome virus (TSV) from the Kingdom of Saudi Arabia. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 179–185.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura ~~Syndrome syndrome Virus virus~~ by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.
- WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, **33**, 341–348.
- WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.
- WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV Challenges Advance Selective Breeding in Pacific White Shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 40–41.

Annexe 24 (suite)

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in pacific Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32 35**, 21–24.

ZARIN ZARAIN-HERZBERG M. & ASCENCIO-VALLE F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for Infection with Taura syndrome virus
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).
Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on Infection with Taura syndrome virus

NB: FIRST ADOPTED IN 2000; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2015

CHAPTER 2.2.8.

INFECTION WITH *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* NODAVIRUS (WHITE TAIL DISEASE)

1. Scope

Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus means infection with the pathogenic agent *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV), (of the Family Nodaviridae. The disease is commonly known as white tail disease (WTD). or white muscle disease (WMD) is defined as a viral infection caused by *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associate extra small virus (XSV). They cause a milky whitish appearance in larvae/postlarvae (PL)/early juveniles, and are responsible for large scale mortalities in the freshwater prawn *M. rosenbergii*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

The aetiological agents are two viral pathogens, namely MrNV (primary) and extra small virus (XSV) (associate) (Qian *et al.*, 2003; Romestand & Bonami, 2003). MrNV is important in WTD-disease outbreaks in prawns, but the role of XSV in pathogenicity remains unclear. Strains are not yet known. MrNV belongs in the family Nodaviridae (Bonami *et al.*, 2005; King *et al.*, 2012 Van Regenmortel *et al.*, 2000). XSV is the first sequenced satellite virus in animals and it is also the first record of a satellite-nodavirus association (Bonami *et al.*, 2005).

2.1.2. Survival outside the host

Survival outside the host is not known, however viral inoculum prepared from tissue homogenate stored at – 20°C caused 100% mortality in post-larvae (PL) of *M. rosenbergii* by immersion challenge (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

Agent stability is not known. However, heat treatment at 65°C for 2 hours destroyed infectivity of MrNV and XSV in challenge experiments (Qian *et al.*, 2003).

2.1.4. Life cycle

Not known.

2.2. Host factors

Infection with MrNV is responsible for huge mortalities in larvae and PL of the freshwater prawn, *M. rosenbergii*, in hatcheries with subsequent economic losses to nursery systems.

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with MrNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).

The giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879). Other proven or suspected hosts are not yet known.

Annexe 25 (suite)**2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility**

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results (but not active infection) have been reported in the following species: kuruma prawn (*P. japonicus*), Indian white prawn (*P. indicus*), giant tiger prawn (*P. monodon*), dragonfly (*Aeshna* sp.), giant water bug (*Belostoma* sp.), beetle (*Cybister* sp.), backswimmer (*Notonecta* sp.), hairy river prawn (*Macrobrachium rude*), monsoon river prawn (*Macrobrachium malcolmsonii*), brine shrimps (*Artemia* sp.) and red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*).

2.2.32. Susceptible stages of the host

Larvae, PL and early juveniles are susceptible, whereas adults are resistant and act as carriers (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.2.34. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

No mortality was observed either in naturally or experimentally (MrNV/XSV) infected subadult and adult prawns. Experimental studies confirmed vertical transmission from infected broodstock to PL (Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a).

2.2.45. Target organs and infected tissue

MrNV and XSV are confined to gill tissue, head muscle, heart, abdominal muscle, ovaries, pleopods and tail muscle, but not the hepatopancreas or eyestalk (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003). ~~The presence of both viruses in ovarian tissue indicates the possibility of vertical transmission of infection with MrNV WTD from broodstock to larvae and PL. Experiments proved that Pleopods are would be a convenient source of RNA for non-destructive screening of MrNV and XSV without stress to the prawns (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).~~

2.2.56. Persistent infection with lifelong carriers

Challenge experiments indicate long-term persistent infection in adults and also the possibility of transmitting MrNV WTD from broodstock to larvae and PL (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a).

2.2.67. Vectors

Not known. Penaeid shrimp (*Penaeus indicus*, *P. monodon*, *P. japonicus*) (Sudhakaran *et al.*, 2006b), *Artemia* (Sudhakaran *et al.*, 2006c), and aquatic insects (*Belostoma* sp., *Aeshna* sp., *Cybister* sp., and *Notonecta* sp.) are vectors of WTD (Sudhakaran *et al.*, 2008).

2.2.8. Known or suspected wild aquatic animal carriers

Not known.

2.3. Disease pattern

A high prevalence of infection with MrNV-WTD infection has been reported in hatchery-reared larvae and PL of *M. rosenbergii*. ~~The disease WTD may be transmitted both vertically and horizontally in culture systems.~~

2.3.1. Transmission mechanisms

Transmission is vertical (trans-ovum) and horizontal by the waterborne route (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a).

2.3.2. Prevalence

Prevalence is variable from 10% to 100% in hatchery, nursery and grow-out systems, as well as in experimental infection by immersion challenge, and 100% mortality has been reported 5-7 days after the appearance of the first gross signs in PL in natural or experimental infection (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b).

2.3.3. Geographical distribution

The disease was first reported in the French West Indies (Arcier *et al.*, 1999), later in China (People's Rep. of) (Qian *et al.*, 2003), India (Sahul Hameed *et al.*, 2004b), Chinese Taipei (Wang & Chang, 2006; Wang *et al.*, 2008), Thailand (Yoganandhan *et al.*, 2006) and Australia (Owens *et al.*, 2009).

2.3.4. Mortality and morbidity

Larvae, PL and juveniles of *M. rosenbergii* are highly susceptible to infection with MrNV-WTD, which often causes high mortalities in these life stages. Mortality may reach a maximum in about 5 or 6 days after the appearance of the first gross signs. Very few PL with infection with MrNV-WTD survive beyond 15 days in an outbreak, and PL that survive may grow to market size like any other normal PL. Adults are resistant to infection with MrNV-WTD, but act as carriers (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.3.5. Environmental factors

Not much is known about environmental factors. However, outbreaks of infection with MrNV-WTD may be induced by rapid changes in salinity, temperature and pH (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003).

2.4. Control and prevention

~~No work has been carried out~~ Information on control and prevention of infection with MrNV is limited ~~WTD~~. However, proper preventive measures, such as screening of brood stock and PL, and good management practices may help to prevent infection with MrNV-WTD in culture systems. As the life cycle of *M. rosenbergii* is completed under controlled conditions, specific pathogen free (SPF) brood stock and PL can be produced by screening using sensitive diagnostic methods such as reverse-transcription PCR (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

2.4.1. Vaccination

Not yet available.

2.4.2. Chemotherapy

No known chemotherapeutic agents reported for infection with MrNV-WTD.

2.4.3. Immunostimulation

No reports available concerning the use of immunostimulants infection with MrNV-WTD.

2.4.4. ~~Resistance breeding~~ Breeding for resistance

None reported.

2.4.5. Restocking with resistant species

No report on the occurrence of resistant species.

2.4.6. Blocking agents

Not known.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Routine procedures followed for crustacean viral disease control are suggested. For example, application of formalin or iodophor helps to eliminate virus (Chen *et al.*, 1992).

Annexe 25 (suite)

2.4.8. General husbandry practices

Experimental infection confirmed the possibility of horizontal and vertical transmission of MrNV-WTD in culture systems (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a-2007a). Good husbandry practices, such as proper disinfection of tanks, water and broodstock, and the use of RT-PCR negative broodstock in the hatchery grow-out ponds may be useful in the prevention of infection with MrNV-WTD in culture systems (Chen *et al.*, 1992; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2008-2008a). There is no evidence of WTD-prevention that crop rotation either with rice or polyculture with fish prevents infection with MrNV. Some farmers have considered either mixed culture of shrimp (*P. monodon*) with *M. rosenbergii* or crop rotation of these two species as a viable alternative for their sustenance and economic viability. This situation invites the possibility of transmitting pathologically significant organisms from native to non-native hosts as observed by Sudhakaran *et al.* (2006b, 2006a) and Ravi *et al.* (2009) in their studies. Based on their results, it would seem that mixed culture of *M. rosenbergii* with *P. monodon* should be avoided before adopting any preventive measures in the management of infection with MrNV.

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Infection with MrNV WTD of freshwater prawns is mainly diagnosed indicated by the whitish coloration of abdominal and tail muscle (Arcier *et al.*, 1999; Romestand & Bonami, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004b). However, this clinical sign is not specific to infection with MrNV WTD and diagnosis is not easy, particularly in the earlier stages of infection. WTD-affected-PL affected by infection with MrNV are more milky and opaque. Once this clinical sign appears, death usually follows; mortality rates are variable and reach up to 95%. The tissues most affected in moribund PLs/early juveniles are striated muscles of the abdomen, cephalothorax and tail. PLs with whitish muscle are suitable for diagnostic purposes (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.2. Preservation of samples for submission

Infected larvae or PL with prominent signs of whitish muscle in the abdominal region are collected from disease outbreak areas. Samples are washed in sterile saline, transferred to sterile tubes, transported to the laboratory on dry ice and stored at -70°C until further processed (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). Frozen samples can be used for virus isolation and detection by RT-PCR or ELISA (Romestand & Bonami, 2003). Samples for virus detection by RT-PCR can be transported to the laboratory after fixing in 70% ethanol (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). See also Chapter 2.2.0 *General information* (on diseases of crustaceans).

3.3. Pooling of samples

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger shrimp should be processed and tested individually. However, samples small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually as the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated. Infected larvae or PL (5 to 10 in number) can be pooled for screening tests. See also chapter 2.2.0.

3.4. Best organs or tissues

The whole PL body is preferred (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). All the organs, except eyestalks and the hepatopancreas, of adult *M. rosenbergii* are best for screening the viruses by RT-PCR. Pleopods (swimming legs) are a convenient source of RNA for non-destructive screening of MrNV and XSV ~~without stress to the broodstock~~ (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.5. Samples or tissues that are not suitable

Eyestalks and the hepatopancreas of adult prawns are not suitable (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003).

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

Infected PL become opaque and develop a whitish appearance, particularly in the abdominal region. The whitish discolouration appears first in the second or third abdominal segment and gradually diffuses both anteriorly and posteriorly. In severe cases, degeneration of telson and uropods may occur. Mortality may reach a maximum in about 5 days after the appearance of the first gross signs.

4.1.2. Behavioural changes

PLs are highly susceptible to infection with MrNV WTD and mortality reaches a maximum in about 5 days after the appearance of whitish discolouration. Floating exuviae (moult) in the tanks appear abnormal and resemble 'mica flakes' (Arcier *et al.*, 1999). The infected PL show progressive weakening of their feeding and swimming ability (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

~~Infection with MrNV-WTD of *M. rosenbergii*, resulting from MrNV and XSV infection, is mainly diagnosed indicated by whitish coloration of abdominal muscle; however, this clinical sign is not pathognomonic specific to WTD, but it is associated with high mortality rates.~~

4.2.2. ~~Clinical chemistry~~

~~The prophenol oxidase activity significantly increased in MrNV and XSV injected prawns on day 3 and 5 post-injection (p.i.) and became normal on 10 day p.i. onwards. Superoxide anion concentration was found to be increased significantly on day 3, 5, and 10 p.i. whereas SOD activity decreased significantly up to 10 day p.i. and became normal after 15 day p.i. The total haemocyte count decreased significantly in MrNV and XSV injected prawns on day 1 and 3 p.i. and there was no significant change in the level of hemocyanin in MrNV and XSV injected and normal prawns (Ravi *et al.*, 2010).~~

4.2.3. Microscopic pathology

The most affected tissue in infected PL is striated muscle of the cephalothorax, abdomen and tail. Histological features include the presence of acute Zenker's necrosis of striated muscles, characterised by severe hyaline degeneration, necrosis and muscular lysis. Moderate oedema and abnormal open spaces among the affected muscle cells are also observed, as is the presence of large oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies in infected muscles (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006). Pathognomonic oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies are demonstrated in the target tissues by histology (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

The presence of MrNV in infected cells can be demonstrated in histological sections using a DIG-labelled DNA *in-situ* hybridisation probe specific for MrNV (Sri Widada *et al.*, 2003).

4.2.4. Wet mounts

None to date.

4.2.5. Smears

None to date.

4.2.6. Electron microscopy/cytopathology

Using transmission electron microscopy (TEM), infected cells appear necrotic, exhibiting a disorganised cytoplasm. TEM studies reveal the presence of two types of non-enveloped para-spherical virus particles of different sizes within the cytoplasm of connective cells and muscle cells. Large viral particles are five- to six-sided, with a diameter of 26–27 nm, and would be characteristic of MrNV. Smaller viral particles similar in structure (five- to six-sided), but with a diameter of 14–16 nm, would be characteristic of XSV (Qian *et al.*, 2003).

Annexe 25 (suite)**4.3. Agent detection and identification methods****4.3.1. Direct detection methods**

Genome and antibody-based diagnostic methods are available to detect MrNV/XSV (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

4.3.1.1. Microscopic methods*4.3.1.1.1. Wet mounts*

None to date.

4.3.1.1.2. Smears

None to date.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3.

4.3.1.2. Agent isolation and identification*4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media*

MrNV/XSV can be easily propagated in the C6/36 mosquito *Aedes albopictus* cell line (Sudhakaran *et al.*, 2007a, 2007b) and this cell line can be cultured easily in Leibovitz L-15 medium containing 100 International Units ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 2.5 µg ml⁻¹ fungizone supplemented with 10% fetal bovine serum at 28°C (Sudhakaran *et al.*, 2007a, 2007b). The C6/36 cell line was found to be useful for propagation of these viruses, and viral replication was confirmed by RT-PCR, acridine orange staining, infectivity studies and electron microscopy. A specific cytopathic effect was not observed in MrNV-infected cell lines, but multiple vacuolations were observed. Other cell lines, namely the fish SSN-1 cell line, partially support the multiplication of these viruses (Hernandez-Herrera *et al.*, 2007).

4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Antibody-based diagnostic methods for MrNV include the ELISA described by Romestand & Bonami (2003) or the triple-antibody sandwich (TAS) ELISA based on a monoclonal antibody (Qian *et al.*, 2006).

4.3.1.2.2.1. ELISA protocol (Romestand & Bonami, 2003)

- i) Homogenise infected or healthy PL samples in 0.5 ml phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuge at 10,000 **g** for 15 minutes. Collect and store the supernatant at -20°C for diagnostic purposes.
- ii) Coat ELISA plates with 50 µl per well sample supernatant and incubate overnight at 4°C.
- iii) Block with 250 µl 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 hour at 37°C.
- iv) Add 50 µl IgG anti-MrNV with 1% BSA and incubate for 2 hours at room temperature.
- v) Add 50 µl of an anti-mouse IgG conjugated to peroxidase at 0.4 µg ml⁻¹ and incubate for 1 hour at room temperature.
- vi) Add 50 µl orthophenylene diamine chromogen at 0.4 mg ml⁻¹ in substrate buffer (citric acid 0.1 M, sodium acetate 0.1 M, pH 5.4, H₂O₂ at a 0.33% final concentration).
- vii) Stop the reaction after 15 minutes by adding 25 µl of H₂SO₄ to each well.
- viii) Measure OD (optical density) at 492 nm with an ELISA plate reader.

NOTE: two rinses with PBS should be performed between each step described above.

4.3.1.2.2.2. TAS-ELISA protocol (Qian et al., 2006)

- i) Coat ELISA plates with rabbit polyclonal antibody raised against MrNV and incubate for 2 hours at 37°C and keep at 4°C before use.
- ii) Block with 250 µl 1% BSA in PBS for 1 hour at 37°C.
- iii) Homogenise infected or healthy PL samples in 0.5 ml PBS and centrifuge at 10,000 **g** for 15 minutes. Collect and store the supernatant at –20°C for diagnostic purposes.
- iv) Add 100 µl of sample to each well and incubate overnight at 4°C.
- v) Add 50 µl of a monoclonal antibody raised against MrNV with 1% BSA and incubate for 2 hours at room temperature.
- vi) Add 50 µl of an anti-mouse IgG conjugated to peroxidase at 0.4 µg ml⁻¹ and incubate for 1 hour at room temperature.
- vii) Add 50 µl orthophenylene diamine chromogen at 0.4 mg ml⁻¹ in substrate buffer (citric acid 0.1 M, sodium acetate 0.1 M, pH 5.4, H₂O₂ at a 0.33% final concentration).
- viii) Stop the reaction after 15 minutes by adding 25 µl H₂SO₄ to each well.
- ix) Measure OD (optical density) at 492 nm with an ELISA plate reader.

NOTE: two rinses with PBS should be performed between each step described above.

4.3.1.2.3. Molecular techniques

4.3.1.2.3.1. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

The protocol for the RT-PCR for detection of MrNV/XSV developed by Sri Widada *et al.* (2003) and Sahul Hameed *et al.* (2004a; 2004b) is recommended for all situations. MrNV and XSV can be detected by RT-PCR separately using a specific set of primers or these two viruses can be detected simultaneously using a single-tube one-step multiplex RT-PCR (Yoganandhan *et al.*, 2005). Nested RT-PCR (RT-nPCR) is also available and recommended for screening broodstock and seed (Sudhakaran *et al.*, [2006a](#) [2007a](#)).

Total RNA extraction

- i) Collect 50 mg of PL or 100 mg of an organ piece (gill tissue, abdominal muscle, tail muscle or pleopods) from adult prawns and homogenate in 300 µl TN buffer (20 mM Tris/HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4).
- ii) Centrifuge the homogenate at 12,000 **g** for 15 minutes at room temperature and collect the supernatant.
- iii) Take 150 µl of supernatant and add 1 ml TRIzol. Mix thoroughly and incubate for 5 minutes at room temperature.
- iv) After 5 minutes, add 200 µl chloroform to the sample, mix well and centrifuge at 12,000 **g** for 15 minutes at room temperature.
- v) Collect the aqueous phase and transfer to a fresh tube, and precipitate RNA by mixing with 500 µl isopropanol.
- vi) Incubate the sample for 10 minutes at room temperature and centrifuge at 12,000 **g** for 10 minutes at 4°C.
- vii) Dissolve the RNA pellet in 50 µl of TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA [ethylene diamine tetraacetic acid], pH 7.5) after a wash with 75% ethyl alcohol.
- viii) Quantify the RNA by measuring the absorbance at 260 nm using UV spectrophotometer and check the purity by measuring the ratio of OD_{260nm}/OD_{280nm}.

Annexe 25 (suite)*RT-PCR protocol*

Three RT-PCR methods are described to detect MrNV and XSV. The first protocol is a one-step RT-PCR adapted from Sri Widada *et al.* (2003) and Sahul Hameed *et al.* (2004b), and this method can be used for confirmation of MrNV and XSV in PL of prawns collected from suspected WTD outbreaks. The second protocol is a sensitive RT-nPCR protocol described by Sudhakaran *et al.* (2006a 2007a). This test can be used for screening healthy PL, juveniles and broodstock for viruses. The third protocol is a multiplex RT-PCR procedure adapted from Yoganandhan *et al.* (2005). It can be used for the simultaneous detection of MrNV and XSV in disease outbreaks or for screening seeds and broodstock. In all the protocols described here, a commercial RT-PCR kit allowing reverse transcription and amplification in a single reaction tube is used.

Protocol 1: RT-PCR for specific detection of MrNV or XSV in infected prawn PL or juveniles (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2007b 2008b):

The following controls should be included in every RT-PCR assay for MrNV or XSV: a) a known MrNV/XSV-negative tissue sample; b) a known MrNV/XSV-positive sample (tissue or purified virus); and c) a 'no-template' control.

For RT-PCR, a commercial RT-PCR kit is used. The reaction is performed in 50 µl RT-PCR buffer containing 20 pmol of each primer specific to MrNV or XSV and RNA template (10–100 ng), using the following cycles: RT at 52°C for 30 minutes; denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds, annealing at 55°C for 40 seconds, and elongation at 68°C for 1 minute, ending with an additional elongation step for 10 minutes at 68°C. Analyse the RT-PCR products by electrophoresis on a 1% agarose gel stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker and detect using an ultraviolet transilluminator.

A positive reaction will be indicated by a 425 bp product for MrNV and a 546 bp product for XSV. The sensitivity of the assay is approximately 2.5 fg of total RNA.

PCR primer sequences for MrNV (annealing temperature 55°C; product size 425 bp):

Forward: 5'-GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'
Reverse: 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG-3'

PCR primer sequences for XSV (annealing temperature 55°C; product size 546 bp):

Forward: 5'-CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA-3'
Reverse: 5'-CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA-3'

*Protocol 2: The RT-nPCR for detection of MrNV and XSV (Sudhakaran *et al.*, 2007a)*

The RT-nPCR is more sensitive and useful for screening seed and broodstock (Sudhakaran *et al.*, 2006a 2007a):

For the RT-nPCR, the first step of the RT-PCR, as described in protocol 1, should be performed with external primers and the nPCR should be carried out using an RT-PCR product as a template. For RT-nPCR, add 2 ml RT-PCR product to a PCR tube containing 20 µl of reaction mixture (10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 µM of each dNTP, 20 pmol of each internal primer, 1.25 units of heat-stable DNA polymerase). The RT-nPCR protocol for both viruses comprise an initial 95°C for 10 minutes, followed by 30 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 55°C and 1 minute at 72°C with a final extension at 72°C for 5 minutes. Analyse the RT-nPCR products by electrophoresis on a 1% agarose gel, stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker, and detect using an ultraviolet transilluminator.

If the viral load is sufficiently high, a 425 bp DNA-product will be amplified for MrNV and 546 bp DNA-product for XSV in the first PCR step. In the nPCR step, a 205 bp product indicates detection of MrNV and a 236 bp product indicates detection of XSV. The detection sensitivity of the RT-nPCR is ~1000-fold greater than the one-step RT-PCR.

The sequence of external primers for MrNV and XSV is given in protocol 1 and the sequence of internal primers is given below:

The sequence of internal primers for MrNV (annealing temperature 55°C; product size 205 bp):

Forward: 5'-GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT-3'
Reverse: 5'-GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG-3'

The sequence of internal primers for XSV (annealing temperature 55°C; product size 236 bp):

Forward: 5'-ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA-3'
Reverse: 5'-GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3'

Protocol 3: multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of MrNV and XSV (Yoganandhan *et al.*, 2005).

To avoid the necessity of carrying out two separate RT-PCR reactions, a modified method for simultaneous detection of MrNV and XSV in a single-tube, one-step multiplex RT-PCR assay can be performed. The reaction is performed in 50 µl RT-PCR buffer containing 20 pmol of each primer specific to MrNV and XSV, and RNA template (10–100 ng), using the following cycles: RT at 52°C for 30 minutes; denaturation at 95°C for 2 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds, annealing at 55°C for 40 seconds, and elongation at 68°C for 1 minute, ending with an additional elongation step for 10 minutes at 68°C. Analyse the RT-PCR products by electrophoresis on a 1% agarose gel, stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker, and detect using an ultraviolet transilluminator.

If MrNV and XSV are present in the sample, a 681 bp **DNA-product** for MrNV and 500 bp **DNA-product** for XSV will be amplified. The presence of both 681 bp and 500 bp products indicates the presence of MrNV and XSV. The detection sensitivity of the multiplex RT-PCR assay is approximately 25 fg of total RNA.

PCR primer sequences for MrNV (annealing temperature 55°C; product size 681 bp):

Forward: 5'-GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C-3'
Reverse: 5'-GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC-3'

PCR primer sequences for XSV (annealing temperature 55°C; product size 500 bp):

Forward: 5'-GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G-3'
Reverse: 5'-CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C-3'

Protocol 4: Real-time RT-PCR assay

Real-time RT-PCR assay can be performed to quantify the MrNV/XSV in the infected samples using the SYBR Green dye based on the method described by Hernandez-Herrera *et al.* (2007) and Zhang *et al.* (2006).

- i) Extraction of total RNA from the samples as per the procedure mentioned above.
- ii) Incubate the RNA samples at 37°C for 1 hour in RT mixture (150 ng of total RNA, 8 U µl⁻¹ M-MLV RT in buffer, 20 ng µl⁻¹ hexaprimers and 0.2 mM dNTP) to obtain total cDNA and quantify the amount of cDNA by measuring the absorbance at 260 nm.
- iii) Perform real-time RT-PCR using real-time PCR mixture (1 µl of cDNA [10 ng], 6 µl of sterile water, 0.5 µl of each primer specific to MrNV and XSV [25 µM concentration] and 2 µl of reaction mixture containing Fast Start *Taq* polymerase, dNTP mix, SYBR Green, 10 mM MgCl₂ and 1 µl dye solution).
- iv) The PCR programme consists of initial *Taq* polymerase activation for 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 5 seconds at 60°C and 10 seconds at 72°C. Melting temperatures will be measured by returning to 70°C for 30 seconds and gradual heating to 95°C in 10 minutes. The negative control reactions should contain water in place of cDNA template in each run to ensure the absence of viruses.

Annexe 25 (suite)

v) The number of viral cDNA copies in the sample will be determined using Light Cycler fit point method.

PCR primer sequences for MrNV (annealing temperature 60°C; product size 211 bp):

Forward: 5'-AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG-3'

Reverse: 5'-CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G-3'

PCR primer sequences for XSV (annealing temperature 58°C; product size 68 bp):

Forward: 5'-AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA-3'

Reverse: 5'-CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG-3'

4.3.1.2.3.2. *In-situ* hybridisation method (Sri Widada *et al.*, 2003; Zsikla *et al.*, 2004)

- i) Fix infected PL in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RNA friendly fixative) (Hasson *et al.*, 1997).
- ii) Embed the tissues in paraffin according to standard procedures (Bell & Lightner, 1988) and cut into 7 µm sections. Place sections on to positively charged microscope slides.
- iii) Dry the slides in an oven at 60°C. Remove paraffin and rehydrate through an ethanol series to water.
- iv) Incubate the sections twice for 5 minutes with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated Tris/HCl (0.2 M, pH 7.4) and 10 minutes with DEPC-treated Tris/HCl containing 100 mM glycine.
- v) Treat the sections for 5 minutes at 37°C with TE buffer (10 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0) containing 10 µg ml⁻¹ RNase-free proteinase K.
- vi) Post-fix the sections with DEPC-treated PBS containing 4% formaldehyde for 5 minutes.
- vii) The sections are acetylated for 10 minutes with 0.1 M triethanolamine (TEA) buffer, pH 8, containing 0.25% (v/v) acetic anhydride.
- viii) After dehydration, incubate the slides at 42°C for 16 hours in a humid chamber with hybridisation buffer containing 40% deionised formamide, 10% dextran sulphate, 1× Denhart's solution, 4× SSC (standard saline citrate), 10 mM dithiothreitol (DTT), 1 mg ml⁻¹ yeast tRNA, 1 mg ml⁻¹ denatured and sheared salmon sperm DNA and 40 ng ml⁻¹ denatured digoxigenin-labelled DNA probe specific to MrNV.
- ix) Wash the slides at 37°C for 10 minutes with 1 × SSC, for 10 minutes with 0.5 × SSC and for 5 minutes twice with buffer III (100 mM Tris/HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl).
- x) Incubate for 20 minutes in buffer IV (buffer III, 1% normal goat serum) at room temperature.
- xi) Incubate the slides for 1 hour in a humid chamber with buffer III containing 1% normal goat serum and 0.1% sheep anti-DIG alkaline phosphatase.
- xii) Wash the slides successively for 10 minutes three times with buffer III and for 5 minutes twice with buffer V (100 mM Tris/HCl [pH 9.5], 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂).
- xiii) Develop the reaction by incubating the slides in buffer V containing NBT and BCIP in a dark and humid chamber for a minimum of 2 hours or overnight. Stop the reaction by incubating the slides in buffer III 2× for 15 minutes.
- xiv) Counterstain the slides with 1% Brown Bismarck, mount with a cover-slip and examine with a bright field microscope.
- xv) Positive hybridisation appears as a dark blue to black precipitate against the yellow to brown counterstain.

4.3.1.2.3.3. *Loop-mediated isothermal amplification* (Haridas *et al.*, 2010; Pillai *et al.*, 2006; Puthawibool *et al.*, 2010)

Haridas *et al.* (2010) and Pillai *et al.* (2006) have applied loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid diagnosis of MrNV and XSV in the freshwater prawn. A set of four primers, two outer and two inner, have been designed separately for detection of MrNV and XSV. In addition, a pair of loop primers specific to MrNV and XSV has been used to accelerate LAMP reaction.

- i) Extraction of total RNA from the samples as per the procedure mentioned above.
- ii) Carry out the RT-LAMP reaction in the reaction mixture (2 µM each of inner primers FIP and BIP, 0.2 µM each of outer primers F3 and B3, 1400 µM of dNTP mix, 0.6 M betaine, 6 mM MgSO₄, 8 U of Bst DNA polymerase along with 1× of the supplied buffer, 0.125 U of AMV RTase and the specified amount of template RNA in a final volume of 25 µl) at 55, 60, 63 and 65°C for 1 each, followed by heat inactivation at 80°C for 2 minutes to terminate the reaction. Uninfected samples and reaction mix without template serve as the negative controls.
- iii) Analyse the LAMP products by electrophoresis on a 2% agarose gel, stain with ethidium bromide and a suitable DNA ladder marker, and detect using an ultraviolet transilluminator.
- iv) Without use of agarose electrophoresis, amplification of DNA can be detected by addition 1.0 µl of 10⁻¹ diluted SYBR Green to the reaction mixture and observe the colour change.

4.3.1.2.3.4. Sequencing

For confirmation of suspected new hosts of MrNV/XSV, the DNA fragment amplified from the PCR should be sequenced according to standard protocols (Sambrook & Russell, 2001).

4.3.1.2.4. Agent purification

MrNV and XSV can be purified according to the protocol described by Bonami *et al.* (2005). The detailed procedure for viral purification is given below:

- i) Collect sufficient quantity of infected PL and **homogenate-homogenise** in PBS buffer (pH 7.4) using a tissue blender.
- ii) Centrifuge at 10,000 **g** for 25 minutes at 4°C. Collect supernatant and centrifuge again at 160,000 **g** for 4 hours at 4°C.
- iii) Suspend the pellet in PBS and extract two or three times with freon (1,1,2-trichloro-2,2,1-trifluoroethane).
- iv) Collect the aqueous layer and centrifuge at 160,000 **g** for 4 hours at 4°C.
- v) Suspend the pellet in TN buffer and separate the two viruses with a 15–30% (w/v in PBS) sucrose gradient, followed by a CsCl gradient.
- vi) Examine the purity of the viruses by TEM using collodion-carbon-coated grids, negatively stained with 2% PTA (phosphotungstic acid), pH 7.0.

4.3.2. Serological methods

None developed

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of infection with MrNV WTD are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category a or b have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Annexe 25 (suite)

Table 5.1. Methods for targeted ~~MrNV~~ surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	c	c	d	c	d
Bioassay	d	c	d	d	c	c
Direct LM	d	c	c	d	c	c
Histopathology	d	c	c	c	b	b
Transmission EM	d	d	d	d	d	a
Antibody-based assays	d	c	d	d	b	b
<i>In-situ</i> DNA probes	c	b	b	c	a	a
PCR, Real-time RT-PCR, RT-PCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	a	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

The method for targeted surveillance to declare freedom from infection with MrNV WTD is RT-nPCR.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

Infection with MrNV is considered to be confirmed is suspected if at least two or more one of the following criteria are met:

i) clinical signs consistent with infection with MrNV

or

ii) histopathology consistent with infection with MrNV

or

iii) a positive result by RT-PCR.

or

iv) a positive result by real-time RT-PCR.

Appearance of whitish muscle associated with mortality is a suspected case of infection with MrNV WTD. It usually affects larval, PL and juvenile stages of *M. rosenbergii* and may appear as a cessation of feeding, reduced swimming activity and whitish coloration of the abdominal and tail muscles. Mortality reaches a maximum of up to 95% at 5 days after the appearance of the whitish colouration. Corroborative diagnostic criteria are summarised in Section 4.2 above.

7.2. Definition of confirmed case

Infection with MrNV is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

- i) histopathology consistent with infection with MrNV
- ii) ISH positive result in target tissues.
- iii) RT-PCR (followed by sequencing).
- iv) Real-time RT-PCR.

~~Suspect cases should first be checked by RT-PCR and confirmed by nRT-PCR, sequencing, TEM and DNA probes.~~

8. References

- ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.
- BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of monodon baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, pp 177–184.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR C.B., NAIR C.M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probe probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
- HSIEH C.Y., WU Z.B., TUNG M.C., TU C., LO S.P., CHANG T.C., CHANG C.D., CHEN S.C., HSIEH Y.C. & TSAI S.S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671.
- KING A.M.Q., ADAMS M.J., CARSTENS E.B. & LEFKOWITZ E.J. (2012). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, USA, p.1327.
- OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.
- PILLAI D., BONAMI J.-R. & SRI WIDADA J. (2006). Rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV), the pathogenic agents of white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), by loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **29**, 275–283.

Annexe 25 (suite)

PUTHAWIBOOL T., SENAPIN S., FLEGEL T.W. & KIATPATHOMCHAI W. (2010). Rapid and sensitive detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawns by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Mol. Cell. Probes*, **24**, 244–249.

QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W. LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.

RAVI M., NAZEER BASHA A., SARATHI M., ROSA IDALIA H.H., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by **MrNV** **MrNV** and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, **292**, 117–120.

RAVI M., NAZEER BASHA A., TAJU G., RAM KUMAR R. & SAHUL HAMEED A.S. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (**MrNV** **MrNV**) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 428–433.

ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of **MrNV** **MrNV** in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (**MrNV** **MrNV**) and its associated small virus (XSV) like particles in *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.

SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *Macrobrachium M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.

SAMBROOK J. & RUSSELL D.W. (2001). Chapter 12 DNA Sequencing. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Editions. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, P 12.1–12.120.

SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.

SUDHAKARAN R., HARIBABU P., RAJESH KUMAR S., SARATHI M., ISHAQ AHMED V.P., SARATH BABU V., VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008 2008a). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* **noda virus nodavirus** (**MrNV** **MrNV**) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145.

SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2006a 2007a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (**MrNV** **MrNV**) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **29**, 1–9. **30**, 27–35.

SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a 2007b). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* **Noda virus** (**MrNV**) **nodavirus** and extra small virus (XSV) in C6/36 **mosquito** cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.

SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006b 2006a). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* **noda virus nodavirus** (**MrNV** **MrNV**) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.

SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., RAJESH KUMAR S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b 2008b). Cloning and sequencing of capsid protein of Indian isolate of extra small virus from *Macrobrachium rosenbergii*. *Virus Res.*, **131**, 283–287.

SUDHAKARAN R., YOGANANDHAN K., ISHAQ AHMED V.P. & SAHUL HAMEED A.S. (2006c). *Artemia* as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus transmission (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Dis. Aquat. Org.*, **70**, 155–160.

VAN REGENMORTEL M.H.V., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., CARTENS E.B., ESTES M.K., LEMON S.M., MANILOFF J., MAYO M.A., MCGEOCH D.J., PRINGLE C.R. & WICKNER R.B. (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, USA.

WANG C.S. & CHANG J.S. (2006). RT-PCR amplification and sequence analysis of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) associated with white tail disease of *M. rosenbergii* (de Man) cultured in Taiwan. GenBank direct submission.

WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H., & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.

YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAN LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.

YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 4–5 65–69.

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

ZSIKLA V., BAUMANN M. & CATHOMAS G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.*, **57**, 54 654–656.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

NB: FIRST ADOPTED IN 2009; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

CHAPITRE 1.5.

CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA LISTE DES ESPÈCES SENSIBLES À UNE INFECTION PAR UN AGENT PATHOGÈNE SPÉCIFIQUE

Article 1.5.1.

L'objectif du présent chapitre est de proposer des critères permettant de déterminer les espèces à même de figurer sur la liste des *espèces sensibles* de l'article 1.5.2. XX.2. de chaque chapitre du *Code aquatique* traitant spécifiquement d'une *maladie*.

Article 1.5.2.

Champ d'application

La sensibilité à une *infection* ne se traduit pas nécessairement par des manifestations cliniques. Toutefois, les espèces pouvant être porteuses de l'*agent pathogène* sans que ce dernier ne se multiplie ne doivent pas être considérées comme appartenant aux *espèces sensibles*.

La décision d'inclure une espèce en particulier dans la liste des *espèces sensibles* figurant dans les chapitres traitant des maladies spécifiques doit reposer sur l'établissement de preuves solides, conformément à l'article 1.5.3. Toutes les espèces d'un groupe taxonomique peuvent être incluses dans la liste des espèces sensibles sous réserve que certains critères soient satisfaits, conformément à l'article 1.5.9.

Cependant, le Le fait qu'une espèce soit potentiellement sensible constitue également une information importante, et, à ce titre, doivent figurer à la section 2.2.1. 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility (Espèces pour lesquelles la sensibilité n'a pu être explicitement démontrée) du chapitre traitant de la *maladie spécifique concernée* du *Manuel aquatique*.

Article 1.5.3.

Approche

Dans le présent chapitre est décrite une approche en trois étapes permettant d'évaluer la sensibilité d'une espèce à une *infection* par un *agent pathogène* donné. Elle repose sur l'utilisation de :

- 1) critères permettant de déterminer si la voie de transmission correspond aux voies de transmission naturelles de l'*infection* (tels que décrits à l'article 1.5.4.) ;
- 2) critères permettant de déterminer si l'*agent pathogène* a été identifié de façon adéquate (tels que décrits à l'article 1.5.5.) ;
- 3) critères permettant de déterminer si les preuves de la présence de l'*agent pathogène* suffisent pour conclure à l'*infection* (tels que décrits à l'article 1.5.6.).

Article 1.5.4.

Étape 1 : critères permettant de déterminer si la voie de transmission correspond aux voies de transmission naturelles de l'infection

Les preuves de la transmission doivent être classées comme relevant :

- 1) de l'apparition naturelle, qui regroupe des situations où l'*infection* est apparue sans intervention expérimentale (par exemple, au sein de populations sauvages ou d'élevage), ou
- 2) de procédures expérimentales non invasives, qui consistent en une induction de l'*infection* par cohabitation avec des hôtes infectés, par immersion ou par ingestion, ou
- 3) de procédures expérimentales invasives, qui consistent en une induction de l'*infection* par injection, par exposition à des concentrations anormalement élevées d'agents pathogènes ou à des facteurs de stress (par exemple, température) auxquels l'hôte n'est pas soumis dans son environnement naturel ou dans son milieu d'élevage.

Annexe 26 (suite)

Il est important de savoir si les conditions expérimentales (par exemple, voie d'administration et titre infectieux) reproduisent les conditions naturelles de transmission de la *maladie*. Il est également important de prendre en compte les facteurs environnementaux, car ces derniers peuvent modifier la résistance de l'hôte ou la voie de transmission de l'*agent pathogène*.

Article 1.5.5.

Étape 2 : critères permettant de déterminer si l'agent pathogène a été identifié de façon adéquate

L'*agent pathogène* doit être identifié et son identification confirmée, conformément aux méthodes décrites à la section 7 (critères de diagnostic corroboratifs) du chapitre traitant de la *maladie* concernée du *Manuel aquatique* ou à d'autres méthodes dont l'équivalence a été démontrée.

Article 1.5.6.

Étape 3 : critères permettant de déterminer si les preuves de la présence de l'agent pathogène suffisent pour conclure à l'infection

Une combinaison des critères suivants doit être utilisée pour pouvoir conclure à la présence de l'*infection* (voir article 1.5.7.) :

- A. l'*agent pathogène* se multiplie dans l'hôte, ou les stades de développement de l'*agent pathogène* sont présents dans ou sur l'hôte ;
- B. une forme viable de l'*agent pathogène* a été isolée chez les *espèces sensibles* proposées, ou son infectiosité a été démontrée lors de la transmission à des individus naïfs ;
- C. il y a des modifications cliniques ou pathologiques associées à l'*infection* ;
- D. la localisation spécifique de l'agent pathogène est constatée dans les tissus cibles attendus.

Le type de preuves permettant de démontrer la présence de l'*infection* dépendra de l'*agent pathogène* et des espèces hôtes potentielles considérés.

Article 1.5.7.

Résultats de l'évaluation

La décision d'inclure une espèce dans la liste des *espèces sensibles* doit être motivée par l'établissement de l'existence de preuves solides. Les preuves doivent concerner les aspects suivants :

- 1) la transmission s'est effectuée de façon naturelle ou a été réalisée dans des conditions expérimentales reproduisant les conditions naturelles de l'*infection*, conformément à l'article 1.5.4. ;

ET

- 2) l'identité de l'*agent pathogène* a été confirmée conformément à l'article 1.5.5. ;

ET

- 3) il existe des preuves de l'*infection* par l'*agent pathogène* chez les espèces hôtes suspectées d'être sensibles, conformément aux critères A à D figurant à l'article 1.5.6. Les preuves permettant de satisfaire au seul critère A sont suffisantes pour conclure à l'*infection*. En l'absence de preuves permettant de satisfaire au critère A, il est requis de satisfaire au moins à deux des trois critères B, C et D pour conclure à l'*infection*.

Article 1.5.8.

Espèces pour lesquelles la sensibilité n'a pu être explicitement démontrée

La décision d'inclure une espèce dans la liste des *espèces sensibles* figurant à l'article 1.5.2. de chaque chapitre traitant spécifiquement d'une *maladie* doit être motivée par l'établissement de l'existence de preuves solides.

Cependant, lorsque les preuves permettant de démontrer la sensibilité, selon l'approche décrite à l'article 1.5.3., sont insuffisantes, parce que la transmission n'a pas été réalisée dans des conditions expérimentales reproduisant les conditions naturelles de l'*infection*, ou l'identité de l'*agent pathogène* n'a pas été confirmée, ou la présence de l'*infection* n'a été que partiellement prouvée, cette information doit figurer dans le chapitre traitant de la *maladie* concernée du *Manuel aquatique*.

Si les preuves permettant de démontrer la sensibilité d'une espèce sont insuffisantes, l'*Autorité compétente* doit évaluer, préalablement à la mise en place de mesures sanitaires pour l'importation, le risque de propagation de l'*agent pathogène* concerné, conformément aux recommandations figurant au chapitre 2.1.

Article 1.5.9.

~~Agents pathogènes affectant un nombre important d'hôtes~~ Inclusion d'un échelon taxonomique supérieur à celui de l'espèce dans la liste des espèces sensibles

Dans le cas des agents pathogènes affectant un nombre important d'hôtes, il peut être préférable, aux fins de l'évaluation à conduire, d'opter pour un échelon taxonomique supérieur à celui de l'espèce (le genre ou la famille par exemple). Un agent pathogène sera considéré comme affectant un nombre important d'hôtes dès lors qu'il aura été démontré quedes représentants de trois familles au moins y sont sensibles.

1) La décision d'opter pour un échelon taxonomique supérieur à celui de l'espèce doit être prise seulement lorsque :

A. il a été démontré qu'au moins une espèce par famille, pour trois familles ou plus était sensible;

ET

AB. il a été démontré que plus d'une espèce au sein du groupe de l'échelon taxonomique était sensible, au moyen des critères énoncés ci-dessus ;

ET

BC. il a été démontré qu'aucune espèce appartenant au groupe à l'échelon taxonomique n'était résistante à l'infection.

Il est nécessaire d'opter pour le plus petit échelon taxonomique le plus petit possible qu'il est possible de déterminer au moyen de cet élément de preuve, aux fins de l'évaluation.

2) Il est démontré qu'une espèce est résistante à l'infection lorsque Les preuves qu'une espèce est résistante à l'infection peuvent inclure :

A. l'absence de l'infection chez les espèces exposées l'infection est absente chez une espèce exposée à l'agent pathogène dans les conditions naturelles reconnues pour favoriser sa présence ainsi que l'apparition de la maladie chez les espèces sensibles ;

OU

B. l'absence d'infection l'infection est absente chez les espèces exposées à l'agent pathogène lors d'une études de transmission en milieu contrôlé, au moyen de procédures expérimentales.

CHAPITRE 5.4.

CRITÈRES D'ÉVALUATION DE LA SÉCURITÉ SANITAIRE DES MARCHANDISES PRODUITS ISSUES D'ANIMAUX AQUATIQUES

Exceptionnellement, dans le cadre du présent chapitre, les termes « sécurité sanitaire » sont également appliqués à la santé des animaux, au regard des *maladies listées*.

Article 5.4.1.

Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des animaux aquatiques et des produits issus d'animaux aquatiques importés (ou en transit) indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés à partir d'un du statut sanitaire du pays, d'une de la zone ou d'un du compartiment d'exportation au regard de la maladie X non déclaré indemne de maladie X

~~Dans tous les chapitres dédiés aux maladies, L'alinéa 1 de l'article X.X.3. figurant dans tous les chapitres dédiés aux maladies (titres 8 à 11) précise les animaux aquatiques et les produits issus d'animaux aquatiques qui peuvent faire l'objet d'échanges commerciaux être importés (ou en transit) indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire à partir d'un du pays, d'une de la zone ou d'un du compartiment non déclaré indemne d'exportation au regard de la maladie X. Les critères d'inclusion des animaux aquatiques et des produits issus d'animaux aquatiques énumérés à l'alinéa 1 de l'article X.X.3. reposent sur l'absence de l'agent de la maladie chez les animaux aquatiques et dans les produits issus d'animaux aquatiques commercialisés ou l'inactivation de l'agent pathogène par un traitement ou une transformation.~~

L'évaluation de la sécurité sanitaire ~~des animaux aquatiques et des~~ du produits issus d'un animal aquatique, selon des critères relatifs au traitement ou à la transformation, peut seulement être réalisée quand les types de traitement ou de transformation sont clairement définis. Il n'est pas forcément nécessaire de fournir des détails concernant l'ensemble du traitement ou de la transformation. Néanmoins, les étapes considérées comme critiques dans la procédure d'inactivation de l'agent pathogène concerné doivent être détaillées.

Tout traitement ou toute transformation est supposé (i) s'effectuer selon des protocoles normalisés incluant des étapes considérées comme critiques dans l'inactivation de l'agent pathogène concerné et (ii) être réalisé selon les bonnes pratiques de fabrication ; (iii) enfin toute autre étape de ce traitement ou de cette transformation, ainsi que la manipulation ultérieure du produits issus d'un animal aquatique commercialisés, ne doit pas en compromettre la sécurité sanitaire.

Critères

Pour qu'il puisse faire l'objet d'échanges internationaux en toute sécurité selon les dispositions prévues à l'article X.X.3., ~~un animal aquatique ou~~ un produit issu d'un animal aquatique doit se conformer aux conditions énoncées ci-après :

- 1) Absence d'agent pathogène dans ~~l'animal aquatique ou~~ le produit issu d'un animal aquatique commercialisé :
 - a) il est fortement probable que l'agent de la maladie ne soit pas présent ~~dans les tissus de l'animal aquatique ou~~ dans les matières premières constituant le produit issu d'un animal aquatique ;

ET

- b) l'eau (y compris sous forme de glace) utilisée pour transformer ou transporter ~~l'animal aquatique ou~~ le produit issu d'un animal aquatique n'est pas contaminée par l'agent pathogène et le processus de transformation ultérieure prévient également la contamination croisée ~~de l'animal aquatique ou~~ du produit issu d'un animal aquatique à commercialiser.

OU

- 2) Dans l'éventualité où l'agent pathogène est présent ou contamine ~~les tissus de l'animal aquatique ou~~ les matières premières du produit issu d'un animal aquatique, le traitement ou le procédé de transformation ~~de l'animal aquatique ou~~ aboutissant au produit issu d'un animal aquatique final commercialisable doit permettre d'inactiver cet agent pathogène :
 - a) procédé physique (tel que la variation de température, le séchage et le fumage) ;
ET / OU
 - b) procédé chimique (tel que l'iode, le pH, le sel et la fumée) ;
ET / OU
 - c) procédé biologique (tel que la fermentation).

Annexe 27 (suite)

Article 5.4.2.

Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire ~~des animaux aquatiques ou~~ des produits issus d'animaux aquatiques importés (ou en transit), destinés à la vente au détail pour la consommation humaine, ~~à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie X indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de la maladie X~~

~~Dans tous les chapitres dédiés aux maladies,~~ L'alinéa 1 de l'article X.X.12. (pour les chapitres dédiés spécifiques aux *maladies* des amphibiens et des poissons) ou de l'article X.X.11. (pour les chapitres dédiés spécifiques aux *maladies* des crustacés et des mollusques) précise ~~les animaux aquatiques et leurs~~ les produits issus d'animaux aquatiques destinés à la vente au détail pour la consommation humaine. Les critères d'inclusion ~~des animaux aquatiques et des produits issus d'animaux aquatiques~~ énumérés à l'alinéa 1 de l'article X.X.12. (pour les chapitres dédiés spécifiques aux *maladies* des amphibiens et des poissons) ou de l'article X.X.11. (pour les chapitres dédiés spécifiques aux *maladies* des crustacés et des mollusques) sont les formes et présentation du produit, le volume de déchets générés attendus par le consommateur et la présence probable d'*agents pathogènes* viables présents dans ces déchets.

Aux fins de l'application des présents critères, la vente au détail signifie que le consommateur achète ou s'approvisionne directement ~~en animaux aquatiques ou en produits issus d'animaux aquatiques~~ destinés à la consommation humaine. La filière de la vente au détail peut également inclure la distribution en gros des produits à condition qu'ils ne subissent pas de transformations supplémentaires par le grossiste ou le détaillant, c'est-à-dire qu'ils ne soient pas éviscérés, nettoyés, filetés, congelés, décongelés, cuits, déconditionnés, conditionnés et reconditionnés.

L'hypothèse de départ est (i) que ~~les animaux aquatiques et~~ les produits issus d'animaux aquatiques sont destinés à la consommation humaine uniquement, (ii) qu'il n'est pas toujours possible de s'assurer que les déchets générés sont manipulés de manière à limiter le risque d'introduction de l'*agent* de la *maladie*, l'importance du risque sanitaire encouru dépendant de la gestion des déchets pratiquée dans les pays ou territoires de chacun des États membres, (iii) que tout traitement ou toute transformation préalablement à l'importation est supposé être réalisé selon les bonnes pratiques de fabrication, et (iv) que toute autre étape de ce traitement ou de cette transformation, ainsi que la manipulation ultérieure ~~des animaux aquatiques ou des~~ du produits issus d'un animal~~ux~~ *aquatiques* préalablement à leur importation, ne doit pas en compromettre la sécurité sanitaire.

Critères

Pour qu'ils puissent faire l'objet d'*échanges internationaux* selon les dispositions prévues à l'alinéa 1 de l'article X.X.12. (pour les chapitres dédiés spécifiques aux *maladies* des amphibiens et des poissons) ou de l'article X.X.11. (pour les chapitres dédiés spécifiques aux *maladies* des crustacés et des mollusques), ~~les animaux aquatiques ou les produits issus d'animaux aquatiques~~ doivent se conformer aux conditions énoncées ci-après :

- 1) ~~les animaux aquatiques ou~~ les produits issus d'animaux aquatiques, destinés à la consommation humaine, sont préparés et emballés pour la vente au détail, ET

SOIT

- 2) seule une faible quantité de déchets bruts est générée par le consommateur ;

SOIT

- 3) l'*agent pathogène* n'est pas présent à l'état naturel dans les déchets générés par le consommateur.

— Texte supprimé

CHAPTER 2.2.7.

INFECTION WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS DISEASE

1. Scope

For the purpose of this chapter, Infection with disease (WSD) is considered to be infection with white spot syndrome virus (WSSV) means infection with the pathogenic agent white spot syndrome virus (WSSV), Family *Nimaviridae*, Genus *Whispovirus*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

Various WSSV isolates with small genetic polymorphisms have been identified (variants). It should be realised, however, that as the *Nimaviridae* is a newly recognised family, the species concept will be subject to change after existing and new isolates have been studied in more detail.

2.1.1. Aetiological agent, agent strains

WSSV was assigned by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) as the only member of the genus *Whispovirus* within the *Nimaviridae* family. Virions of WSSV are ovoid or ellipsoid to bacilliform in shape, have a regular symmetry, and measure 80–120 nm in diameter and 250–380 nm in length. Most notable is the thread- or flagella-like extension (appendage) at one end of the virion. Today, although various geographical isolates with genotypic variability have been identified, they are all classified as a single species (white spot syndrome virus) within the genus *Whispovirus* (Lo *et al.*, 2012).

2.1.2. Survival outside the host

The agent is viable for at least 30 days at 30°C in seawater under laboratory conditions (Momoyama *et al.*, 1998); and is viable in ponds for at least 3–4 days (Nakano *et al.*, 1998).

2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

The agent is inactivated in <120 minutes at 50°C and <1 minute at 60°C (Nakano *et al.*, 1998).

2.1.4. Life cycle

In-vitro studies with primary cell culture and *in-vivo* studies with postlarvae (PL) show that the replication cycle is approximately 20 hours at 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

2.2. Host factors

WSSV has an extremely wide host range. The virus can infect a wide range of aquatic crustaceans especially decapod, including marine, brackish and freshwater prawns, crabs, crayfish and lobsters (Maeda *et al.*, 2000).

2.2.1. Susceptible host species

To date, no decapod (order Decapoda) crustacean from marine and brackish or freshwater sources has been reported to be resistant to infection with WSSV (Fiegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2009).

2.2.2. Susceptible stages of the host

All life stages are potentially susceptible, from eggs to broodstock (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999).

Annexe 28 (suite)

2.2.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

The best life stages of crustaceans for detection **of infection with WSSV** are late PL stages, juveniles and adults. Probability of detection can be increased by exposure to stressful conditions (e.g. eye-stalk ablation, spawning, moulting, changes in salinity, temperature or pH, and during plankton blooms).

2.2.4. Target organs and infected tissue

The major targets of **infection with WSSV** ~~infection~~ are tissues of ectodermal and mesodermal embryonic origin, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the tubular epithelial cells of these two organs are of endodermal origin, and they do not become infected.

2.2.5. Persistent infection with lifelong carriers

Persistent infection occurs commonly and lifelong infection has been shown (Lo & Kou, 1998). Viral loads during persistent infection can be extremely low and are very hard to detect even by sensitive methods such as real-time and nested PCR.

2.2.6. Vectors

The virus can transmit from host to host and does not need a biological vector.

2.2.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

Wild decapods include *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995a), *Acetes* sp., *Alpheus* sp., *Callinassa* sp., *Exopalaemon* sp., *Helice* sp., *Hemigrapsus* sp., *Macrophthalmus* sp., *Macrophthel* sp., *Metaplex* sp., *Orithyia* sp., *Palaemonoidea* sp., *Scylla* sp., *Sesarma* sp., *Stomatopoda* sp. and (He & Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002), can be easily infected by WSSV and may express the disease under suitable environmental conditions. However, non-decapodal crustaceans, such as copepods (Huang *et al.*, 1995a), rotifers (Yan *et al.*, 2004), *Artemia salina* (Chang *et al.*, 2002), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), and *Tachypleidue* sp. (He & Zhou, 1996) may become wild aquatic animal carriers by latent infection without disease. Other marine molluscs, polychaete worms (Vijayan *et al.*, 2005), as well as non-crustacean aquatic arthropods such as sea slaters (*Isopoda*) and Euphydradae insect larvae can mechanically carry the virus without evidence of infection (Lo & Kou, 1998).

2.3. Disease pattern

Infection **with WSSV** sometimes causes disease and sometimes not (Tsai *et al.*, 1999), depending on factors as yet poorly understood but related to species tolerance and environmental triggers. With an appropriate infection dose to allow sufficient time before mortality, animals susceptible to disease show large numbers of virions circulating in the haemolymph (Lo *et al.*, 1997), but this may also occur for tolerant species that show no mortality. Thus, high viral loads *per se* do not cause disease or mortality for all susceptible species.

2.3.1. Transmission mechanisms

The infection **with WSSV** can be transmitted vertically (trans-ovum), horizontally by consumption of infected tissue (e.g. cannibalism, predation, etc.), and by water-borne routes. Transmission of infection **with WSSV** can occur from apparently healthy animals in the absence of disease. Dead and moribund animals can be a source of disease transmission (Lo & Kou, 1998).

2.3.2. Prevalence

Prevalence of **infection with WSSV** is highly variable, from <1% in infected wild populations to up to 100% in captive populations (Lo & Kou, 1998).

2.3.3. Geographical distribution

~~WSD~~ **Infection with WSSV** has been identified from crustaceans in China (People's Rep. of), Japan, Korea (Rep. of), South-East Asia, South Asia, the Indian Continent, the Mediterranean (Stentiford & Lightner, 2011), the Middle East, and the Americas. ~~WSD-free~~ **Zones** and compartments **free from infection with WSSV** are known within these regions (Lo *et al.*, 2012).

2.3.4. Mortality and morbidity

All penaeid shrimp species are highly susceptible to infection with WSSV, often resulting in high mortality. Crabs, crayfish, freshwater prawns, spiny lobsters and clawed lobsters are susceptible to infection with WSSV, but morbidity and mortality as a consequence of infection is highly variable (Lo & Kou, 1998). High level infections with WSSV are known in some decapods in the absence of clinical disease.

2.3.5. Environmental factors

Disease outbreaks may be induced by stressors, such as rapid changes in salinity. Water temperature has a profound effect on disease expression, with average water temperatures of between 18 and 30°C being conducive to WSD WSSV outbreaks (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001).

2.4. Control and prevention

Although the underlying mechanism remains unknown, laboratory experiments have shown that 'vaccinated' shrimp and crayfish have better survival rates after WSSV challenge. It was first shown that *Penaeus japonicus* shrimp that survived natural and experimental WSSV infections displayed resistance to subsequent challenge with WSSV (Venegas *et al.*, 2000). Later studies showed that intramuscular injection of inactivated WSSV virions or recombinant structural protein, (VP28), provided shrimp with some protection against experimental WSSV infection. Furthermore, shrimp fed with food pellets coated with inactivated bacteria over expressing VP28 showed better survival rates after WSSV challenge (Witteveldt *et al.*, 2004). However, although these results seemed promising, the protection was effective only when the shrimp were infected with a low dosage of WSSV. Also, the effect usually lasted for only a few days, or in the case of crayfish, for about 20 days. Another potential means of protecting shrimp against infection with WSSV infection is to use RNA interference (RNAi). WSSV gene-specific double-stranded (ds) RNAs produced strong anti-WSSV activity, protecting the shrimp against infection with WSSV infection, but the same study showed that long dsRNA induced both sequence-dependent and independent antiviral responses in shrimp (Robalino *et al.*, 2005). A more recent study even showed that oral administration of bacterially expressed VP28 dsRNA could protect shrimp against infection with WSSV infection (Sarathi *et al.*, 2008). To date, however, there are still no field trial data for either the vaccination or the RNAi approach.

2.4.1. Vaccination

No consistently effective vaccination methods have been developed for infection with WSSV.

2.4.2. Chemotherapy

No scientifically confirmed reports for infection with WSSV.

2.4.3. Immunostimulation

Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (fucoidan) and other immunostimulants may improve resistance to infection with WSSV-WSD (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

2.4.4. Resistance breeding

No significant improvements have been reported for infections with WSSV.

2.4.5. Restocking with resistant species

Not applicable for infection with WSSV-WSD.

2.4.6. Blocking agents

There are no efficient blocking agents that can be recommended at this time. rVP28 has an effect, but it cannot yet be used as a practical blocking agent.

2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

For transovum transmission, disinfection of egg is likely to be effective (Lo & Kou, 1998), but this has not yet been confirmed in formal scientific trials.

Annexe 28 (suite)

2.4.8. General husbandry practices

A number of husbandry practices have been used successfully to manage **infection with WSSV-WSD**, such as avoiding stocking in the cold season, use of specific pathogen free (SPF) or polymerase chain reaction (PCR)-negative seed stocks, and use of biosecure water and culture systems (Withyachumnarnkul, 1999) polyculture of shrimp and fish (He *et al.*, unpublished data).

3. Sampling

3.1. Selection of individual specimens

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 4.1.1) or exhibit behavioural changes (Section 4.1.2) should be selected for **WSSV-detection of infection with WSSV**.

3.2. Preservation of samples for submission

See Chapter 2.2.0 *General information* (for diseases of crustaceans) for guidance on preservation of samples for the intended test method.

3.3. Pooling of samples

~~Samples taken for molecular or antibody-based test methods for **infection with WSSV-WSD** may be combined as pooled samples of no more than five specimens per pooled sample of juveniles or subadults. However, for eggs, larvae and PL, pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50 to 150 PL depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material. See also chapter 2.2.0.~~

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore larger life stages should be processed and tested individually. However, small life stages, especially PL or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough material for molecular testing.

3.4. Best organs or tissues

Tissue tropism analysis from both experimentally infected shrimp and wild-captured brooders shows that tissues originating from the ectoderm and mesoderm, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues, as well as other target tissues (e.g. antennal gland, haematopoietic organ, etc.), are the main target tissues for **infection with** WSSV. Samples of or from the pleopods, gills, haemolymph, stomach or abdominal muscle are recommended for submission (Lo *et al.*, 1997).

For non-destructive screening by PCR, it is recommended to submit (a small piece of) gill, (a small aliquot of) haemolymph or (a small piece of) pleopod. There is also some evidence to suggest that an ablated eyestalk would be a good alternative, provided that the compound eye is removed prior to submission.

Please see section 4.3.1.2.4.1 for details of the sample procedure.

3.5. Samples/tissues that are not suitable

Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the columnar epithelial cells of these two organs are of endodermal embryonic origin (Lo *et al.*, 1997), and they are not appropriate tissues for detection. The compound eye may contain a PCR inhibitor (Lo *et al.*, 1997) and it is therefore not suitable for PCR-based diagnosis.

4. Diagnostic methods

4.1. Field diagnostic methods

4.1.1. Clinical signs

White spots embedded within the exoskeleton are the most commonly observed clinical sign. In most shrimp, these spots range from barely visible to 3 mm in diameter, and they sometimes coalesce into larger plates. However, it should be noted that environmental stress factors, such as high alkalinity, or bacterial disease can also cause white spots on the carapace of shrimp, and that moribund shrimp with **infection with WSSV-WSD** may in fact have few, if any, white spots. Therefore, the appearance of white spots is absolutely not a good diagnostic sign of **infection with WSSV-infection**. Furthermore, other crustaceans, such as most crayfish, are often reported to show no sign of white spots when infected with WSSV.

High degrees of colour variation with a predominance of reddish or pinkish discoloured shrimp are seen in diseased populations.

4.1.2. Behavioural changes

The presence of white spots does not always mean that the condition is terminal. For instance, under non-stressful conditions, infected shrimp that have white spots may survive indefinitely. However, if the shrimp also appear lethargic, if their colour changes to pink or reddish-brown, if they gather around the edges of ponds/tanks at the water surface, or if there is a rapid reduction in food consumption, then a very high mortality rate in the shrimp population can be expected within a few hours to a few days of the onset of these signs.

4.2. Clinical methods

4.2.1. Gross pathology

See Section 4.1.1 and 4.1.2 above.

4.2.2. Clinical chemistry

Haemolymph withdrawn from WSSV-infected shrimp always has a delayed (or sometimes completely absent) clotting reaction.

4.2.3. Microscopic pathology

4.2.3.1. Wet mounts

Demonstration of hypertrophied nuclei in squash preparations of the gills and/or cuticular epithelium, which may be stained or unstained.

4.2.3.1.1 T-E staining

A T-E staining solution may be prepared from Trypan blue 0.6%, Eosin Y 0.2%, NaCl 0.5%, phenol 0.5%, and glycerol 20% (Huang & Yu, 1995) and used as follows:

- i) Place a piece of lesion tissue (e.g. a piece of gill or stomach epithelium without the cuticle) on a slide and mince with a scalpel.
- ii) Add 1–2 drops of the T-E staining solution to the minced tissue, mix and allow to stain for 3–5 minutes.
- iii) Lay a cover glass over the stained tissue and cover with several pieces of absorbent paper. Use a thumb to squash the mince into a single layer of cells.

If the sample was taken from a heavily infected shrimp, it should be easy to see the hypertrophied nuclei and intranuclear eosinophilic or vacuolation-like inclusion bodies under a 400–000× light microscope.

Annexe 28 (suite)**4.2.3.2. Smears**

Demonstration of aggregates of WSSV virions in unstained smear preparations of haemolymph by dark-field microscopy.

NOTE: This is the simplest of the microscopic techniques and is recommended for people with limited expertise in diagnosing infection with WSSV. The aggregates appear as small reflective spots of 0.5 µm in diameter (Momoyama *et al.*, 1995).

4.2.3.3. Fixed sections

Histological demonstration of pathognomonic inclusion bodies in target tissues.

4.2.3.4. *In situ* hybridisation

Use of WSSV-specific DNA probes with histological sections to demonstrate the presence of WSSV nucleic acid in infected cells.

4.2.3.5. Immunohistochemistry

Use of WSSV-specific antibodies with histological sections or wet mounts to demonstrate the presence of WSSV antigen in infected cells.

4.2.4. Electron microscopy/cytopathology

Demonstration of the virus in tissue sections or in semi-purified negatively stained virus preparations (e.g. from haemolymph). See Section 2.1.1 for virion morphology.

4.3. Agent detection and identification methods**4.3.1. Direct detection methods**

Not reported.

4.3.1.1. Microscopic methods

See Section 4.2.3 above.

4.3.1.1.1. Wet mounts

See Section 4.2.4 above.

4.3.1.1.2. Smears

See Section 4.2.5 above.

4.3.1.1.3. Fixed sections

See Section 4.2.3 above.

4.3.1.2. Agent isolation and identification*4.3.1.2.1. Bioassay method*

If SPF shrimp are available, the following bioassay method is based on Nunan *et al.* (1998) and Durand *et al.* (2000), is suitable for WSSV diagnosis.

- i) For bioassay, remove the pleopods from shrimp suspected of being infected with WSSV infection and homogenise in TN buffer (0.02 M Tris/HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4).
- ii) Following centrifugation at 1000 **g** for 10 minutes, dilute the supernatant fluid 1/10 with 2% NaCl and filter (0.2 µm filter).

- iii) Inject 0.2 ml of inoculum into the dorso-lateral aspect of the fourth abdominal segment of indicator shrimp (e.g. SPF *P. vannamei* at the juvenile stage), injecting between the tergal plates into the muscle of the third abdominal segment.
- iv) Examine moribund shrimp grossly or by using the methods described above. If at 3–5 days after inoculation there are still no moribund shrimp and all test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

4.3.1.2.2. Cell culture/artificial media

WSSV can be isolated from primary cultures of lymphoid or ovary cells. However, it is NOT recommended to use cell culture as a routine isolation method because of: 1) the high risk of contamination, and, 2) the composition of the medium varies depending on the tissue type, host species and experimental purpose; that is, to date there is no standard or recognised medium that can be recommended. As primary cell culture is so difficult to initiate and maintain for virus isolation purposes, bioassay should be the primary means for virus propagation.

4.3.1.2.3. Antibody-based antigen detection methods

Both polyclonal and monoclonal antibodies raised against either the virus or a recombinant viral structural protein have been used in various immunological assays including western blot analysis, immunodot assay, indirect fluorescent antibody test (IFAT), immunohistochemistry (IHC) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect WSSV (Huang *et al.*, 1995a; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004). Antibody-based methods can be fast, convenient and applicable to field use, but as they have only about the same sensitivity as 1-step PCR, they are recommended only to confirm acute **infection with WSSV-WSD**.

4.3.1.2.4. Molecular techniques

4.3.1.2.4.1 Polymerase chain reaction (PCR)

The PCR protocol described here is from Lo *et al.* 1996a and b, and uses sampling methods from Lo *et al.* 1997). It is recommended for all situations where **infection with WSSV** diagnosis is required. A positive result in the first step of this standard protocol implies a serious **infection with WSSV-infection**, whereas, when a positive result is obtained in the second amplification step only, a latent or carrier-state infection is indicated. Alternative PCR assays have also been developed (e.g. Numan & Lightner, 2011), but before use they should first be compared with the protocol described here.

PCR commercial kits are available for WSSV **detection diagnosis** and are acceptable provided they have been validated as fit for such purpose. Please consult the OIE Register for kits that have been certified by the OIE (<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/certification-of-diagnostic-tests/the-register-of-diagnostic-tests/>).

DNA extraction

- i) Collect 100–200 mg shrimp tissue (pleopod of live juvenile to subadult shrimp, postlarvae 11 upwards [PL11 up] with removed heads, or whole PL10, or use 100 µl haemolymph) in a 1.5 ml microfuge tube with 600 µl lysis solution (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8, 25 mM EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid], 0.5% SLS [sodium N-laurylsarcosinate] or 2% SDS [sodium dodecyl sulphate], and 0.5 mg ml⁻¹ proteinase K added just before use). For non-destructive screening, pleopods can be removed using red-hot forceps. For this procedure, the animal should be wrapped in a wet towel such that only the organ to be excised is left exposed.
- ii) Using a disposable stick, homogenise the tissue in the tube thoroughly.
- iii) After homogenisation, incubate at 65°C for 1 hour.
- iv) Add 5 M NaCl to a final concentration of 0.7 M. Next, slowly add 1/10 volume of N-cetyl N,N,N-trimethylammonium bromide (CTAB)/NaCl solution (10% CTAB in 0.7 M NaCl) and mix thoroughly.

NOTE: In addition to the CTAB extraction method described here, commercial extraction kits are often used as part of normal surveillance activities.

Annexe 28 (suite)

- v) Incubate at 65°C for 10 minutes, and then, at room temperature, add an equal volume of chloroform/isoamyl alcohol (24/1) and mix gently. Centrifuge at 13,000 *g* for 5 minutes and then transfer the aqueous solution (upper layer) to a fresh 1.5 ml tube and add an equal volume of phenol.
- vi) Mix gently and centrifuge at 13,000 *g* for 5 minutes. Collect the upper layer solution and repeat the phenol extraction process once or twice.
- vii) Transfer the final upper layer to a new tube, mix gently with two volumes of chloroform/isoamyl alcohol (24/1) and centrifuge at 13,000 *g* for 5 minutes.
- viii) Transfer the upper layer to a new tube and precipitate DNA by adding two volumes of 95% or absolute ethanol followed by standing at –20°C for 30 minutes or –80° C for 15 minutes.
- ix) Centrifuge at 13,000 *g* for 30 minutes and discard the ethanol. Wash the DNA pellet with 70% ethanol, dry and resuspend in 100 µl sterilised double-distilled water at 65°C for 15 minutes.
- x) Use 1 µl of this DNA solution for one PCR.

Note: the following nested PCR procedures are well established and provide reliable diagnostic results under the specified conditions. Care should be taken, however, to ensure that DNA samples are prepared from the recommended organs, and that the PCR temperature is accurately applied (particularly for annealing, the recommended temperature is 62°C). To prevent the possibility of false positive results, it is important to adhere to the specified procedures, especially when they are used to test new candidate hosts such as *Cherax quadricarinatus* (Claydon *et al.*, 2004), as well as *Procambarus clarkii* (red swamp crayfish) and *Procambarus zonangulus* (Southern white river crayfish). For diagnosed incidences of **infection with** WSSV in a new host or in a previously free zone, DNA sequencing should be used to confirm the positive results.

First-step PCR

- i) Add 1 µl DNA template solution (containing about 0.1–0.3 µg DNA) to a PCR tube containing 100 µl of reaction mixture (10 mM Tris/HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 µM of each dNTP, 100 pmol of each primer, 2 units of heat-stable DNA polymerase).
- ii) The outer primer sequences are 146F1, 5'-ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG-3' and 146R1, 5'-TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A-3'.
- iii) The PCR profile is one cycle of 94°C for 4 minutes, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes, followed by 39 cycles of 94°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, and 72°C for 2 minutes and a final 5-minute extension at 72°C. The WSSV-specific amplicon from this reaction is 1447 bp. The sensitivity is approximately 20,000 copies of a plasmid template.

Second step of the (nested) PCR

This second step is necessary for the detection of **infection with** WSSV in shrimp at the carrier stage.

- i) Add 10 µl of the first-step PCR product to 90 µl of a PCR cocktail with the same composition as above except that it contains the second (inner) primer pair: 146F2 (5'-GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A-3') and 146R2 (5'-TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG-T-3').
- ii) Use the same PCR amplification protocol as above. The WSSV-specific amplicon from this reaction is 941 bp. The overall sensitivity of both steps is approximately 20 copies of a WSSV plasmid template.
- iii) To visualise, electrophorese 10 µl PCR products on 1% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 µg ml⁻¹.
- iv) Decapod-specific primers (143F 5'-TGC-CTT-ATC-AGCTNT-CGA-TTG-TAG-3' and 145R 5'-TTC-AGN-TTT-GCA-ACC-ATA-CTT-CCC-3' yielding an 848 bp amplicon; N represents G, A, T, or C) should be used in control reactions to verify the quality of the extracted DNA and the integrity of the PCR. In the penaeid shrimp *P. aztecus*, the PCR product generated by this decapod-specific primer pair corresponds to nucleotide sequence 352–1200 of the 18s rRNA. The decapod 18s RNA sequence is highly conserved and produces a similar sized PCR product in almost all decapods. A positive control (WSSV DNA template) and negative controls (no template and shrimp DNA template) should be included in every assay.

4.3.1.2.4.2 DNA sequencing of PCR products

For confirmation of suspected new hosts of **infection with** WSSV, the DNA fragment amplified from the two-step nested diagnostic PCR should be sequenced. The cloning and sequencing protocols described here are according to Claydon *et al.* (2004).

Note: to save time and money, it is acceptable to sequence the PCR amplicon directly. If a positive result is obtained, then go to step iv below. In the event that only band[s] of unexpected size are obtained, then the sample should be tested again using the cloning and sequencing procedures described below.

- i) Excise the DNA fragments selected for further analysis from the agarose gels and purify them using any of the commercially available PCR clean up kits.
- ii) Ligate amplicons into vector plasmid and clone the construct.
- iii) Use suitable primers to amplify the inserted amplicon, and then subject the amplified product to DNA sequencing.
- iv) Compare the sequences obtained with available databases using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to determine approximate phylogenetic affiliations.

4.3.1.2.4.3 Taqman real-time PCR method

The protocol described here is from Durand & Lightner (2002). This detection method is highly specific to WSSV, is extremely sensitive (four copies) and has a wide dynamic range (seven logs).

Construction of positive control vector and preparation of standard curve

The DNA fragment of 69 bp amplified by the forward and reverse primers (indicated below) is cloned in pGEM-T easy or other suitable vectors, and then confirmed by sequencing. The plasmid DNA is purified by any commercial plasmid extraction kits and the concentration is determined by using a spectrophotometer or other methods. The gene copy number is determined according to the molar mass derived from the plasmid DNA containing the 69 bp insert. The plasmid DNAs are then serially diluted tenfold to generate standard curves ranging from 10^2 to 10^7 copies.

DNA extraction

DNA extraction should be performed according to the above protocol described for PCR (4.3.1.2.4.1) or by using a commercial kit. The concentration of purified DNA can be determined by spectrophotometer or by other methods.

Real-time PCR

The TaqMan assay is carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix, which contains AmpliTaq Gold DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs with dUTP and optimised buffer components (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA⁶). Primer sequences are WSS1011F: 5'-TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG-3', WSS1079R: 5'-GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A-3', Taqman Probe: 5'-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-3'.

- i) Add a sample of 10–50 ng of DNA to set up a 25 µl reaction mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.15 µM of TaqMan probe.
- ii) The PCR profile is one cycle of 50°C for 2 minutes for AmpErase uracil-N-glycosylase (UNG) and 95°C for 10 minutes for activation of AmpliTaq, followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

⁶ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

Annexe 28 (suite)

- iii) To determine the WSSV copy number of the extracted DNA samples, the samples are subjected to PCR reaction alongside the serially diluted plasmid DNA standard. After reaction, the software accompanying the PCR system automatically determines the Ct value for each PCR sample. Based on the Ct values, the software calculates the standard curve for standard dilution and determines the WSSV copy number for the DNA samples by extrapolating values from the standard curve.

4.3.1.2.4.4. *In-situ hybridisation (ISH) method*

The protocol described here is based on that developed by Nunan & Lightner (1997).

- i) Fix moribund shrimp with Davidson's AFA fixative for 24–48 hours.
- ii) Embed the tissues in paraffin and cut into 5 µm sections. Place sections on to positively charged microscope slides.
- iii) Heat the slide on a hot plate at 65°C for 30 minutes.
- iv) Deparaffinise, rehydrate and then treat for 2–30 minutes (depending on tissue type) with 100 µg ml⁻¹ proteinase K in Tris/NaCl/EDTA (TNE) buffer at 37°C.
- v) Post-fix the slides by chilling in pre-cooled 0.4% formaldehyde for 5 minutes at 4°C and wash the slides in 2 × standard saline citrate (SSC; 1 × SSC = 150 mM NaCl, 15 mM tri-sodium citrate, pH 7.0) at room temperature.
- vi) Pre-hybridise the slides with pre-hybridisation solution (50% formamide, 0.2% Ficoll 400, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin, 5 × SSC, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl, pH 8) for 30 minutes at 42°C.
- vii) Follow with hybridisation with the 1447 bp WSSV-specific PCR amplicon (or with any other WSSV-specific PCR amplicon; see Section 4.3.1.2.3.1 "First-step PCR" above) that has been labelled with digoxigenin. It is recommended that the probe be labelled by incorporating DIG-dNTP by the PCR method. Optimum concentration should be determined by testing and adjusting until a high specific signal is obtained against a low background.
- viii) For hybridisation, boil the probe for 10 minutes and immediately place on ice. Dilute the probe to 30–50 ng ml⁻¹ in pre-hybridisation solution and apply 500 µl to each slide.
- ix) Put the slide on a hotplate at 85–95°C for 6–10 minutes (make sure that it does not reach boiling point), quench slides on ice for 5 minutes and then transfer to a humid chamber for 16–20 hours at 42°C.
- x) After hybridisation, wash the slides twice for 15 minutes each time with 2 × SSC at room temperature, twice for 5 minutes with 1 × SSC at 37°C, and twice for 5 minutes with 0.5 × SSC at 37°C.
- xi) For hybridisation detection, wash slides with maleic acid buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5) for 5 minutes at room temperature.
- xii) Block the slides with blocking solution (2% normal goat serum and 0.3% Triton X-100 in maleic acid buffer) for 30 minutes at 37°C.
- xiii) Add 250 µl anti-DIG alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibody solution (1 µl ml⁻¹ anti-DIG/AP-Fab fragment in maleic acid buffer containing 1% normal goat serum and 0.3% Triton X-100) to each slide, and incubate at 37°C for 30 minutes.
- xiv) Wash the slides twice with maleic acid buffer for 10 minutes each and once with detection buffer (100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5) at room temperature.
- xv) Add 500 µl development solution (prepare immediately before use by adding 45 µl NBT salt solution [75 mg ml⁻¹ in 70% dimethylformamide], 35 µl 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidinum salt [X-phosphate] solution [50 mg ml⁻¹ in dimethylformamide] and 1 ml 10% PVA to 9 ml of detection buffer) to each slide and incubate in the dark in a humid chamber for 1–3 hours.

- xvi) Stop the reaction by washing the slides in TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) for 15 minutes at room temperature. Wash the slides in distilled water for ten dips, counterstain the slides in 0.5% aqueous Bismarck Brown Y for approximately 5 minutes and then rinse with water. Wet mount using aqueous mounting media for observation immediately or dehydrate the slides and mount with mounting media for long-term preservation.
- xvii) Mount the slides with cover-slips and examine with a bright field microscope. Positive hybridisation appears as a dark blue to black precipitate against the yellow to brown counterstain.

4.3.1.2.4.5. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

The protocol described here is from Kono *et al.* (2004). The LAMP method is sensitive and rapid, and it amplifies the target nucleic acids under isothermal conditions, therefore needing no sophisticated machine for thermal cycling.

DNA extraction

DNA extraction could be performed according to the above protocol described for PCR (4.3.1.2.4.1) or by other suitable methods or by commercial kits.

LAMP reaction

- i) Add DNA to a tube to set up a 25 µl reaction mixture (20 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8M Betaine, 1.4 mM of each dNTP, 40 pmol of WSSV-FIP and -BIP primers, 5 pmol of WSSV-F3 and -B3 primers).
- ii) The primer sequences are WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC-GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
- iii) Heat the mixture at 50°C for 5 minutes and at 95°C for 5 minutes, then chill on ice, and add 1 µl (8 U) of *Bst* DNA polymerase.
- iv) Incubate the mixture at 65°C for 60 minutes, and then terminate the reaction at 80°C for 10 minutes.
- v) To visualise, electrophorese 2 µl LAMP reaction products on 2% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 µg ml⁻¹. This reaction produces WSSV-specific LAMP products with multiple bands of various sizes from approximately 200 bp to the loading well.

Reliable LAMP commercial kits may be alternative for WSSV diagnosis.

4.3.1.2.5. Agent purification

The WSSV virion can be purified as described previously with slight modifications (Xie *et al.*, 2005). Briefly, collect five or six moribund crayfish or shrimp (20–25 g each) at 3 days to 1 week post-infection. Homogenise all tissues excluding the hepatopancreas for 2 minutes using a mechanical homogeniser in 1200 ml TNE buffer (50 mM Tris/HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) containing protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM benzamidine, and 1 mM Na₂S₂O₅). Centrifuge at 3500 *g* for 5 minutes. Save the supernatant and rehomogenise the pellet in 1200 ml TNE buffer. Filter the pooled supernatant through a nylon net (400 mesh) and centrifuge at 30,000 *g* for 30 minutes. Discard the supernatant and carefully rinse out the upper loose layer (pink) of the pellet using a Pasteur pipette. Resuspend the lower compact layer (grey) in 10 ml TM buffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.5). Pool the crude virus suspension and centrifuge at 3000 *g* for 5 minutes. Centrifuge the supernatant again at 30,000 *g* for 20 minutes. Remove the supernatant and pink loose layer and resuspend the white pellet in 1.2 ml TM buffer containing 0.1% NaN₃. Transfer to a 1.5-ml Eppendorf tube. Centrifuge the suspension three to five times at 650 *g* for 5 minutes each time to remove pink impurities. Finally, store the milk-like pure virus suspension at 4°C until use.

Annexe 28 (suite)

4.3.2. Serological methods

None developed.

5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of **infection with** WSSV are listed in Table 5.1. The designations used in the Table indicate: a = the method is the recommended method for reasons of availability, utility, and diagnostic specificity and sensitivity; b = the method is a standard method with good diagnostic sensitivity and specificity; c = the method has application in some situations, but cost, accuracy, or other factors severely limits its application; and d = the method is presently not recommended for this purpose. These are somewhat subjective as suitability involves issues of reliability, sensitivity, specificity and utility. Although not all of the tests listed as category A or B have undergone formal standardisation and validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

Table 5.1. Methods for targeted surveillance and diagnosis

Method	Targeted surveillance				Presumptive diagnosis	Confirmatory diagnosis
	Larvae	PLs	Juveniles	Adults		
Gross signs	d	d	c	c	c	d
Bioassay	d	d	d	d	c	b
Direct LM	d	d	c	c	c	c
Histopathology	d	c	c	c	a	c
Transmission EM	d	d	d	d	d	a
Antibody-based assays	d	d	c	c	a	b
<i>In-situ</i> DNA probes	d	d	c	c	a	a
PCR	d	b	a	a	a	a
LAMP	d	d	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy;
PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification.

6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from **infection with** white spot **syndrome virus** disease

Two step PCR and sequencing are the recommended methods for declaring freedom, only for juveniles and adults and possibly PLs. Two step PCR negative results are required. Where a two step PCR positive result cannot be confirmed as **infection with** WSSV by sequencing, this also counts as a negative result.

Real-time PCR is the recommended test for targeted surveillance to declare freedom from white spot disease.

7. Corroborative diagnostic criteria

7.1. Definition of suspect case

For juvenile and adult shrimp: gross signs of WSD (See Sections 4.1.1 and 4.1.2 above).

For shrimp at any life stage (larva to adult): mortality.

For shrimp and crab at any life stage (larva to adult): hypertrophied nuclei in squash preparations of gill and/or cuticular epithelium; unusual aggregates in haemolymph by dark field microscopy; inclusion bodies in histological sections in target tissues.

Infection with WSSV is suspected if at least one of the following criteria is met:

1. Histopathology consistent with WSSV
2. Positive conventional PCR result
3. Positive real-time PCR result

Positive LAMP result

7.2. Definition of confirmed case

Suspect cases should first be checked by PCR or LAMP. If in a previously WSSV free country/zone/compartiment, where PCR results are positive, they should be confirmed by sequencing. Histopathology, probes and electron microscopy also can be used to confirm the case.

Infection with WSSV is considered to be confirmed if one or more of the following criteria are met:

1. Histopathology consistent with WSSV and positive *in-situ* hybridisation test
2. Positive conventional PCR and conventional PCR targeting a different region of the WSSV genome
3. Positive real-time PCR and conventional PCR targeting a different region of the WSSV genome
4. Positive LAMP and conventional PCR targeting a different region of the WSSV genome

For confirmation of an index case in a previously free zone or country, sequence analysis of conventional PCR amplicons is required.

8. References

CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary ~~beta~~ β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.

CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by ~~in-situ~~ *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.

CHANG Y.S., LO C.F., PENG S.E., LIU K.F., WANG C.H. & KOU G.H. (2002). White spot syndrome virus (WSSV) PCR-positive *Artemia* cysts yield

PCR-negative nauplii that fail to transmit WSSV when fed to shrimp postlarvae. *Dis. Aquat. Org.*, **49**, 1–10.

Annexe 28 (suite)

- CHEN I.T, AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F., WANG H.C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.
- CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.
- CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.
- DURAND, S. V. & LIGHTNER, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.
- DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.
- FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.
- HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.
- HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 31–39.
- HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995a). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 40–50.
- KONO T., SAVAN R., SAKAI M., & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.
- LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W. WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 229–234.
- LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.
- LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, **crab crabs** and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.
- LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.
- LO C.F., LEU J.H., **Ho C.H.**, CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.

- MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. & KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii* *Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.
- NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.
- ROBALINO J., BARTLETT T., SHEPARD E., PRIOR S., JARAMILLO G., SCURA E., CHAPMAN R.W., GROSS P.S., BROWDY C.L. & WARR G.W. (2005). Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? *J. Virol.*, **79**, 13561–13571.
- SARATHI M., SIMON M.C., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Oral administration of bacterially expressed VP28dsRNA to protect *Penaeus monodon* from white spot syndrome virus. *J. Mar. Biotechnol.*, **10**, 242–249.
- SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA P. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.
- SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellowhead disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.
- STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, **319**, 302–306.
- TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999). Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 107–114.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., NISHIZAWA T. & MUROG K. (2000). Quasi-immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 83–89.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.

Annexe 28 (suite)

VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 364–372.

VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEKHAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.

WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.

WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.

WITTEVELDT J., CIFUENTES C.C., VLAK J.M. & VAN HULTEN M.C. (2004). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J. Virol.*, **78**, 2057–2061.

WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRATANA S., NASH G.L., AKARAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69–77.

XIE X., LI H., XU L. & YANG F. (2005). A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. *Virus Res.*, **108**, 63–67.

YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.

YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for **infection with white spot syndrome virus disease** (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on for **infection with white spot syndrome virus disease**

NB: FIRST ADOPTED IN 1997; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012

Document soumis aux États membres à titre informatif dans le rapport de la réunion de la Commission des animaux aquatiques de septembre 2016

Document amendé par la Commission des animaux aquatiques lors de sa réunion de février 2017

Version révisée de l'évaluation de l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans* au regard des critères d'inclusion dans la liste des maladies figurant dans le Code aquatique

Évaluation globale

La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE a évalué l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) au regard des critères d'inclusion dans la liste des maladies figurant à l'article 1.2.2. du Code aquatique. Elle a conclu que l'infection à *Bsal* répondait aux critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE, notamment à ceux des points « A. Conséquences : un impact négatif sur les populations d'amphibiens sauvages », « B. Propagation : étiologie infectieuse prouvée et probabilité élevée de propagation de la maladie à la faveur des échanges internationaux et dans les zones indemnes de l'agent pathogène » et « C. Diagnostic : disponibilité d'une épreuve de diagnostic pratique » (voir Tableau 1 ci-dessous).

Tableau 1. Récapitulatif de l'évaluation de l'infection à *Bsal* au regard des critères d'inclusion

	Critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE								Conclusion
	1	2	3	4	5	6	7	8	
<i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	NA	+	NA	+	NA	+	+	+	Inclusion dans la Liste de l'OIE

NA = non applicable.

Contexte

Il est désormais admis que les populations d'amphibiens sont menacées partout dans le monde en raison d'un grand nombre de facteurs, parmi lesquels figurent les maladies. *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), à l'origine d'une infection fongique, est devenu depuis quelques années un important agent pathogène des amphibiens. Il est responsable du déclin de plus de 200 populations d'amphibiens, de la diminution de plus de 40 % du nombre d'espèces en Amérique centrale ainsi que de mortalités en Europe, Australie et Amérique du Nord (Fisher *et al.*, 2012). L'infection à *Bd* a été incluse dans la Liste des maladies de l'OIE en 2008.

Un déclin rapide de la population de salamandres tachetées (*Salamandra salamandra*) présente aux Pays-Bas a été rapporté en 2013 par Spitzen-van der Sluijs *et al.* (2013). Les investigations initiales n'ont pas permis d'en identifier la cause réelle. En revanche des investigations ultérieures de mortalités chez des salamandres maintenues en captivité ont permis de mettre en évidence une nouvelle espèce de champignon, le chytride *Batrachochytrium salamandrivorans* (*Bsal*) (Martel *et al.*, 2013). Martel *et al.* (2014) concluent que l'agent pathogène a coexisté avec un clade de salamandres hôtes pendant des millions d'années en Asie. En raison de la mondialisation et des échanges commerciaux spécifiques de salamandres, ce champignon a été introduit en Europe où il a changé d'hôtes, ce qui a eu des conséquences graves pour la biodiversité. L'émergence d'autres maladies responsables de la régression notable de populations d'animaux aquatiques sauvages a été attribuée aux mouvements d'animaux aquatiques hors de leur habitat naturel (Peeler *et al.*, 2011).

Critères d'inclusion d'une maladie affectant des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE (article 1.2.2.)

A. Conséquences

Critère n°1. *Lorsqu'elle apparaît, il est prouvé que la maladie provoque des pertes significatives de production au niveau national ou multinational (zones ou régions).*

Conclusion : le critère n'est pas applicable.

OU

Annexe 29 (suite)

Critère n°2. On a montré la présence de la maladie ou on dispose de preuves scientifiques indiquant que la maladie est susceptible de provoquer une morbidité ou une mortalité importante au sein des populations d'animaux aquatiques sauvages.

Évaluation :

Les investigations effectuées par Martel *et al.* (2013) ont démontré que la présence de *Bsal* était nécessaire et suffisante à causer la maladie des salamandres tachetées aux Pays-Bas. *Bsal* a été isolé de la peau des salamandres tachetées appartenant aux populations affectées à Bunderos (Pays-Bas). Les analyses ont montré que *Bsal* était un nouveau champignon chytride, classé dans le même clade que *Bd*. Les animaux infectés présentent des signes cliniques sévères (érosions multifocales et ulcérations) et meurent en moins de 7 jours. Les observations sur le terrain et les études expérimentales indiquent que le taux de létalité avoisine les 100 %. Entre 2010 et 2013, la population de salamandres tachetées des Pays-Bas a été réduite de 96 %.

Les études expérimentales ont mis en évidence que 41 des 44 des espèces de salamandres du paléarctique occidental étaient sensibles à *Bsal* et que ce champignon était létal pour certaines des salamandres du Nouveau Monde (Martel *et al.*, 2014). Ainsi, la maladie pourrait avoir des répercussions négatives sur de nombreuses populations d'amphibiens. Yap *et al.* (2015) ont réalisé des travaux de modélisation destinés à apprécier l'impact vraisemblable qu'aurait *Bsal* en Amérique du Nord et en ont conclu qu'il y constituerait une sérieuse menace pour la biodiversité. Cette conclusion a été corroborée par la conclusion d'un rapport du « US Fish and Wildlife Service » soulignant que l'introduction de *Bsal* aux États-Unis d'Amérique pourrait affecter de façon néfaste et significative les niveaux de populations d'espèces indigènes⁷.

Suite à un examen des informations disponibles sur le sujet, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (AESAs) a conclu en 2017 que, malgré le faible nombre d'échantillons prélevés, les éléments de preuves suffisaient à démontrer que le déclin des populations de salamandres tachetées de Bunderos aux Pays-Bas était imputable à *Bsal*. L'AESA a également conclu qu'il était nécessaire de poursuivre les recherches afin de démontrer de façon incontestable que *Bsal* était également responsable du déclin d'autres populations sauvages.

Conclusion : le critère est satisfait.

OU

Critère n°3. L'agent infectieux représente une menace pour la santé publique.

Conclusion : le critère n'est pas applicable.

ET

B. Propagation

Critère n°4. Une étiologie infectieuse de la maladie est prouvée.

Évaluation :

Bsal a été isolé de la peau de salamandres affectées (Martel *et al.*, 2013). Malgré une recherche approfondie, aucun autre pathogène n'a pu être détecté. En microscopie, des nombres élevés de thalles coloniaux ont été observés. En microscopie électronique à transmission, l'examen des lésions cutanées a permis de mettre en évidence, chez les animaux présentant des signes cliniques, la présence de l'agent pathogène (structures intracellulaires caractéristiques des thalles coloniaux) (Martel *et al.*, 2013). L'étiologie infectieuse et le rôle de *Bsal* ont été mis en évidence par le prélèvement d'échantillons au sein des populations déclinantes et stables de salamandres tachetées (Martel *et al.*, 2013). Treize des 33 prélèvements effectués au moyen d'écouvillons chez les salamandres tachetées appartenant à des populations déclinantes se sont révélés positifs lors de la recherche de *Bsal* par test PCR. Par contraste, aucun des 51 prélèvements effectués, selon la même méthode, chez des salamandres tachetées appartenant à des populations stables, n'a réagi positivement au test PCR susmentionné.

⁷ <https://www.federalregister.gov/documents/2016/01/13/2016-00452/injurious-wildlife-species-listing-salamanders-due-to-risk-of-salamander-chytrid-fungus>.

Les études de transmission ont fourni des éléments de preuve supplémentaires de l'étiologie infectieuse de la maladie. Cinq salamandres ont été exposées aux zoospores de *Bsal* (Martel *et al.*, 2013) : tous les animaux sont morts. L'agent pathogène a été à nouveau isolé d'un des animaux, et son identité confirmée par PCR sur les cinq animaux.

Conclusion : le critère est satisfait.

OU

Critère n°5. Un agent infectieux est fortement associé à la maladie, mais l'étiologie est encore inconnue.

Conclusion : le critère n'est pas applicable.

ET

B. Propagation

Critère n°6. Probabilité de propagation internationale de la maladie, y compris via des animaux aquatiques vivants, leurs produits ou des matériels contaminés.

Évaluation :

Martel *et al.* (2014) ont émis comme hypothèse que *Bsal* était originaire d'Asie et que sa propagation en Europe était due aux échanges commerciaux internationaux de salamandres en tant qu'animaux de compagnie. Martel *et al.* (2015) ont identifié trois espèces de salamandres asiatiques faisant l'objet d'échanges commerciaux intenses et qui jouent le rôle de réservoirs de *Bsal* (*Cynops cyanurus*, *Cynops pyrrhogaster*, et *Paramesotriton deloustali*). L'identification de *Bsal* au sein d'une collection d'amphibiens importée au Royaume-Uni (Cunningham *et al.*, 2015) a permis de démontrer le rôle des mouvements d'animaux vivants dans sa propagation transfrontalière. Des échantillons cutanés de 1 765 amphibiens provenant d'animaleries, de l'aéroport de Heathrow et d'un exportateur localisé à Hong Kong ont été analysés : trois échantillons se sont révélés positifs, parmi lesquels deux prélevés sur des animaux importés en Europe en 2010 (Martel *et al.*, 2014). Une analyse du marché des salamandres commercialisées en tant qu'animaux de compagnie a permis à Yap *et al.* (2015) de conclure qu'il présentait un risque élevé d'introduction de *Bsal* en Amérique du Nord.

Conclusion : le critère est satisfait.

ET

Critère n°7. Plusieurs pays ou zones peuvent être déclarés indemnes de la maladie, conformément aux principes généraux de surveillance énoncés au chapitre 1.4.

Évaluation :

Bsal a été décrit pour la première fois en 2013. De ce fait, l'opportunité de conduire une surveillance, jusqu'à obtention du statut indemne, ou de mettre en place des mesures sanitaires, afin d'empêcher l'introduction de l'agent pathogène, a été limitée. Les activités de surveillance de *Bd* reposent sur un test de dépistage spécifique de *Bd* par méthode qPCR, qui ne peut pas être utilisé pour déterminer la distribution mondiale actuelle de *Bsal*. Toutefois, Martel *et al.* (2013) ont développé un test de dépistage spécifique de *Bsal* par méthode PCR, qui a été utilisé pour tester 500 amphibiens sauvages provenant de 4 continents (Martel *et al.*, 2014). Des résultats positifs ont été obtenus pour des animaux venant de l'Asie du Sud-Est, des Pays-Bas et de la Belgique (où un lien a été établi entre l'agent pathogène et la maladie). Deux études conduites en Amérique du Nord n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de *Bsal* chez les salamandres sauvages (Bales *et al.*, 2015 ; Muletz *et al.*, 2014). Si Yap *et al.* (2015) considèrent également que l'Amérique du Nord est indemne de la maladie, ils estiment toutefois qu'elle est exposée au risque d'introduction de *Bsal*. Une étude menée sur 30 espèces d'amphibiens (665 échantillons) provenant de 15 provinces en Chine n'a pas permis de démontrer la présence de *Bsal* (Zhu *et al.*, 2014). En raison de la sensibilité de la salamandre tachetée et de sa large distribution en Europe centrale et du Sud, il est raisonnable de conclure que l'aire géographique de distribution de l'agent pathogène est actuellement restreinte en Europe.

Si l'incertitude demeure quant à la distribution globale de *Bsal*, il est cependant hautement probable que plusieurs pays soient déclarés indemnes de la maladie au regard des informations disponibles et des principes généraux de surveillance énoncés au chapitre 1.4. Toutefois, il est peu probable qu'à ce stade, les pays aient mis en place des mesures permettant d'empêcher l'introduction de *Bsal*.

Conclusion : le critère est satisfait.

Annexe 29 (suite)

ET

C. Diagnostic

Critère n°8. Une méthode pratique et reproductible de détection ou de diagnostic existe.

Évaluation :

Les méthodes développées pour la culture de *Bd* ont été utilisées avec succès pour la culture de *Bsal*. Les essais de culture à différentes températures ont montré que l'incubation à 20 °C sur milieu de culture liquide TGH (tryptone-gélatin hydrolysate-lactose [TGH]) produisait les meilleurs résultats (Martel *et al.*, 2013).

Une méthode PCR a été développée afin d'amplifier le gène de *Bsal* codant pour l'ARN ribosomique 5.8S et les espaces intergéniques correspondants (ITS) (Martel *et al.*, 2013). Les résultats de la PCR ont montré que l'ADN de *Bsal* était présent chez les cinq animaux infectés de façon expérimentale et que sa présence était associée à celle de lésions histopathologiques (nombre très élevé de thalles coloniaux de *Bsal*) semblables à celles observées chez les animaux sauvages. Cela prouve la sensibilité élevée de ce test. Il a été démontré que la méthode PCR utilisée pour la recherche de *Bsal* ne fonctionnait pas pour celle de *Bd*, démontrant ainsi la spécificité analytique de ce test. Toutefois, en raison du faible nombre d'études de validation, il n'est pas possible d'évaluer les caractéristiques (robustesse et répétabilité) des méthodes de culture ou moléculaires (PCR) employées.

Blooi *et al.* (2013) ont par la suite développé une méthode de PCR en temps réel duplex afin de détecter la même cible, à savoir l'ARN ribosomal 5.8S. Les échantillons utilisés provenaient de populations d'amphibiens infectées de façon expérimentale ou sauvages (sur le déclin et en bonne santé). La précision, évaluée en testant la variabilité intra et inter-épreuves, s'est avérée élevée et reproductible. La spécificité a été évaluée en testant des extraits d'ADN provenant de dix isolats différents de chytridiomycètes. La PCR n'a donné de résultats positifs que pour les échantillons de *Bsal*, démontrant ainsi un haut niveau de spécificité analytique. Le seuil de détection a été établi à 0,1 équivalent génome (GÈ) de zoospores. Le faible nombre d'échantillons constitue un obstacle à la détermination précise des caractéristiques du test de diagnostic utilisé (méthode de RT-PCR duplex). Néanmoins, l'Autorité européenne de sécurité des aliments a conclu en 2017 que les données disponibles indiquaient clairement que ce test présentait un bon niveau de performance.

La méthode de PCR en temps réel duplex a été suffisamment validée de façon suffisante, en dépit du nombre limité d'échantillons disponibles, pour détecter de façon fiable la présence de *Bsal*. pour pouvoir conclure que le test conduit permet de détecter *Bsal* de façon précise, fiable et robuste. Ses caractéristiques (notamment le niveau de spécificité et le seuil de détection) en font un test adapté pour le dépistage et la confirmation de la présence de l'infection chez les individus affectés.

Avec la généralisation de l'emploi de cette méthode, il est attendu que des informations additionnelles contribuant à la validation du test soient générées.

Conclusion : le critère est satisfait.

Références

Bales BALES E.K., et al. HYMAN O.J., LOUDON A.H., HARRIS R.N., LIPPS G., CHAPMAN E., ROBLEE K., KLEOPFER J.D. & TERRELL K.A. (2015). Pathogenic Chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*, but not *B. salamandrivorans*, detected on eastern hellbenders. *PloS one ONE* 10(2): 10. e0116405. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4335058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

BLOOI, M., PASMANS, F., LONGCORE, J. E., SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A., VERCAMMEN, F., & MARTEL, A. (2013). Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *Journal of Clinical Microbiology J. Clin. Microbiol.*, 51 51 (12), 4173–4177. <http://doi.org/10.1128/JCM.02313-13>

CUNNINGHAM, A. A., BECKMANN, K., PERKINS, M., FITZPATRICK, L., CROMIE, R., REDBOND, J., O'BRIEN M.F., GHOSH P., SHELTON J. & FISHER, M. C. (2015). Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record Vet. Rec.*, 176 176 (18), 468. <http://doi.org/10.1136/vr.h2264>

EFSA (European Food Safety Authority) European Food Safety Authority (EFSA), BALAZ V., GORTAZAR SCHMIDT C., MURRAY K., CARNESECCHI E., GARCIA A., GERVELMEYER A., MARTINO L., MUNOZ GUAJARDO I., VERDONCK F., ZANCANARO G. and FABRIS C. (2017). Scientific and technical assistance concerning the survival, establishment and spread of *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) in the EU. *EFSA Journal* *EFSA Journal* 2017;15(2): 15, 4739, 77 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4739

FISHER, M. C., HENK, D. A., BRIGGS, C. J., BROWNSTEIN, J. S., MADOFF, L. C., MCCRAW, S. L., & GURR, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393) 484, 186–194. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature10947>

MARTEL, A., BLOOI, M., ADRIAENSEN, C., VAN ROOIJ, P., BEUKEMA, W., FISHER, M. C., FARRER R.A., SCHMIDT B.R., TOBLER U., GOKA K., LIPS K.R., MULETZ C., ZAMUDIO K.R., BOSCH J., LOTTTERS S., WOMBWELL E., GARNER T.W.J., CUNNINGHAM A.A., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SALVIDIO S., DUCATELLE R., NISHIKAWA K., NGUYEN T.T., KOLBY J.E., VAN BOCXLAER I., BOSSUYT F. & PASMANS, F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346 (6209) 346, 630–631. <http://doi.org/10.1126/science.1258268>

MARTEL, A., SPITZEN-VAN der SLUIJS, A., BLOOI, M., BERT, W., DUCATELLE, R., FISHER, M. C., WOELTJES A., BOSMAN W., CHIERS K., BOSSUYT F. & PASMANS, F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. Proceedings of the *National Academy of Sciences Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(38) 110, 15325–15329. <http://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>

MULETZ, CARLY C., et al. CARUSO N.M., FLEISCHER R.C., MCDIARMID R.W. & LIPS K.R. (2014). “Unexpected *Rarity* *rarity* of the *Pathogen* *pathogen* *Batrachochytrium dendrobatidis* *Batrachochytrium dendrobatidis* in Appalachian *Plethodon* *Plethodon* Salamanders *salamanders*:1957–2011.” *PLoS ONE*, 9(8): 9, e103728. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103728>.

PEELER, E. J., OIDTMANN, B. C., MIDTLYNG, P. J., MIOSSEC, L., & GOZLAN, R. E. (2011). Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biological Biol. Invasions*, 13(6) 13, 1291–1303. <http://doi.org/10.1007/s10530-010-9890-9>

SPITZEN-VAN DER SLUIJS, ANNEMARIEKE; FRANK SPIKMANS, WILBERT BOSMAN, M. de Z., & TOM VAN DER MEIJ, EDO GOVERSE, MARJA KIK, FRANK PASMANS, A. M. SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SPIKMANS F., BOSMAN W., DE ZEEUW M., VAN DER MEIJ T., GOVERSE E., KIK M., PASMANS F. & MARTEL A. (2013). Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra* *Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34 34, 233–239. Retrieved from http://www.ravon.nl/Portals/0/spitzen_et_al_2013_rapid_decline_fire_salamander_Netherlands.pdf

YAP, A., MICHELLE S. KOO, RICHARD F. AMBROSE, DAVID B. WAKE, and V. T. V. YAP T.A., KOO M.S., AMBROSE R.F., WAKE D.B. & VREDENBURG V.T. (2015). Averting a North American biodiversity crisis. *Science*, 349 349, 6247–6248 481–482.

ZHU, W., XU, F., BAI, C., LIU, X., WANG, S., GAO, X., LI, Y. ZHU W., XU F., BAI C., LIU X., WANG S., GAO X., YAN S., LI X., LIU Z. & LI, Y. (2014). A survey for *Batrachochytrium salamandrivorans* in Chinese amphibians. *Current Zoology Curr. Zool.*, 60(6) 60, 729–735. <http://doi.org/10.1093/czoolo/60.6.729>

FICHE TECHNIQUE

VIRUS DU TILAPIA LACUSTRE (TiLV) – UN NOUVEAU VIRUS PROCHE DES ORTHOMYXOVIRUS

INFORMATIONS SUR L'AGENT PATHOGÈNE

1. AGENT CAUSATIF

1.1. Type d'agent pathogène

Virus.

1.2. Nom de la maladie et synonymes

Maladie virale du tilapia lacustre (TiLV).

1.3. Noms vernaculaires de l'agent pathogène et synonymes

Virus du tilapia lacustre (TiLV).

1.4. Affiliation taxonomique

Bien que son affiliation taxonomique n'ait pas été déterminée avec certitude, le TiLV a été décrit comme un nouveau virus appartenant à la famille des Orthomyxoviridae (Eyngor *et al.*, 2014).

1.5. Autorité (première description scientifique, référence)

Le virus a été décrit pour la première fois par Eyngor *et al.* (2014).

1.6. Environnement de l'agent pathogène (eau douce, eau saumâtre ou eau de mer)

Eau douce et eau saumâtre.

2. MODES DE TRANSMISSION

2.1. Modes de transmission (horizontale, verticale, indirecte)

Des études de cohabitation entre animaux sains et malades ont démontré que la transmission horizontale directe était un mode important de transmission. Les caractéristiques biophysiques du virus n'étant pas encore suffisamment connues, il est difficile de déterminer l'importance de la transmission indirecte par les matériels contaminés.

2.2. Réservoir

Les seuls réservoirs établis de l'infection sont les populations de poissons, qu'ils soient d'élevages ou sauvages. La source originelle du TiLV n'est pas connue.

2.3. Les facteurs de risque (température, salinité, etc.)

La maladie a été observée suite aux transferts d'animaux entre bassins et, par conséquent, pourrait être associée au stress (Ferguson *et al.*, 2014). Aucun autre facteur de risque potentiel (température, salinité, etc.) n'a pu être identifié.

Annexe 30 (suite)**3. ESPÈCES HÔTES****3.1. Espèces sensibles**

Les mortalités attribuées au TiLV ont été observées chez le tilapia sauvage *Sarotherodon (Tilapia) galilaeus*, le tilapia d'élevage *Oreochromis niloticus* et l'hybride commercial de tilapia (issu du croisement *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) (Bacharach *et al.*, 2016; Ferguson *et al.*, 2014, Eyngor *et al.*, 2014). À ce jour, seuls les tilapiinés se sont montrés sensibles à la maladie. Il est toutefois possible que d'autres espèces le soient également.

3.2. Stades de développement de l'hôte affectés par la maladie

Dans les foyers décrits par Ferguson *et al.* (2014), la maladie a surtout été observée chez les alevins. Les autres publications sur la maladie ne comporte aucune description des différents niveaux de mortalité observés pour chacun des stades de développement des poissons (Eyngor *et al.*, 2014).

3.3. Commentaires additionnels

Il y a des éléments indiquant que certaines souches de tilapia sont résistantes. Ferguson *et al.* (2014) ont noté qu'une souche de tilapia (sexe génétique des tilapias : mâle) avait subi des niveaux de mortalité significativement plus bas (10 – 20 % de mortalité) que ceux observés chez d'autres souches (~ 80 % de mortalité).

4. DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

La présence du TiLV a été signalée en Colombie, en Equateur, en Israël (Bacharach *et al.*, 2016 ; Ferguson *et al.*, 2014 ; Tsofack *et al.*, 2016) et, plus récemment, en Égypte (Fathi *et al.*, 2017). Toutefois, en raison d'investigations peu poussées de l'ensemble des épisodes de mortalités, il est possible que la distribution géographique du TiLV soit plus large que celle estimée à l'heure actuelle. Par exemple, des épisodes de mortalités de tilapia signalés au Ghana et en Zambie en 2016 n'ont pas été attribués au virus mais les informations disponibles n'indiquent pas si la présence du virus a été recherchée.

5. SIGNES CLINIQUES ET DESCRIPTION DE CAS**5.1. Tissus et organes infectés chez l'hôte**

Les yeux, le cerveau et le foie sont les principaux organes affectés par la maladie (Eyngor *et al.*, 2014).

5.2. Observations et lésions macroscopiques

Les lésions macroscopiques incluent des modifications de l'œil, notamment l'opacité du cristallin et, dans les cas les plus avancés, la rupture capsulaire du cristallin. Parmi les autres lésions observées figurent des érosions cutanées, des hémorragies des leptoméniges et une congestion de la rate (Eyngor *et al.*, 2014).

5.3. Lésions microscopiques et anomalies tissulaires

À l'examen histologique, des lésions ont été observées dans le cerveau, les yeux et le foie (Eyngor *et al.*, 2014). Les lésions cérébrales incluaient de l'œdème, des hémorragies focales dans les leptoméniges, une congestion des vaisseaux capillaires présents dans la substance grise et la substance blanche ainsi qu'une dégénérescence neurale. Des foyers de gliose et une infiltration lymphocytaire en manchons périvasculaires ont été décrits. Les lésions oculaires incluaient une rupture capsulaire du cristallin et des modifications engendrées par la cataracte. Des foyers d'hépatomégalie ont été observés. Une hyperplasie splénique associée à une prolifération des lymphocytes a été identifiée. En outre, le nombre et la taille des centres mélanomacrophages (CMM) étaient augmentés dans le foie et la rate. La présence d'un virus proche des orthomyxovirus dans les hépatocytes anormaux a été confirmée par microscopie électronique à transmission, corroborant ainsi les descriptions d'hépatite syncytiale figurant dans les premiers signalements de la maladie (Del-Pozo *et al.*, 2016).

5.4. Statut de la maladie au regard de la Liste de l'OIE

L'infection par le TiLV est en cours d'évaluation en vue de sa possible inclusion dans la liste des maladies de l'OIE. Toutefois, à ce jour, cette maladie ne satisfait pas à l'ensemble des critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE figurant au chapitre 1.2. du *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (OIE, édition 2016).

6. IMPORTANCE ÉCONOMIQUE ET SOCIALE

Les tilapiinés, qui comprennent plus de 100 espèces, sont le second groupe le plus important de poissons d'élevage au monde après celui des carpes. La production mondiale est estimée à 4,5 millions de tonnes pour une valeur de 7,5 milliards de dollars US (FAO, 2014). Dans certaines régions, ces espèces jouent un rôle écologique important (maîtrise de la prolifération des algues et des moustiques et entretien de l'habitat des crevettes d'élevage). Elles sont également des espèces de premier plan pour la pêche. Il a été montré que l'apparition du virus avait causé des mortalités importantes (jusqu'à 80 %), ce qui a eu pour conséquences des pertes économiques sévères pour les aquaculteurs et les pêcheurs (Eyngor *et al.*, 2014).

7. IMPORTANCE ZONOTIQUE

Aucune

8. MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

8.1. Définition d'un cas suspect

Des niveaux de mortalité très élevés chez les espèces de tilapiinés, associés à la présence d'atteintes oculaires (opacité du cristallin ou tableau clinique plus sévère) doivent amener à suspecter un cas d'infection par le TiLV. La présence d'érosions cutanées, d'hémorragies des leptoméninges et d'une congestion splénique et rénale peut être observée lors de l'examen post-mortem.

8.2. Tests de présomption

Le TiLV peut être mis en culture sur une lignée cellulaire primaire de cerveau de tilapia ou sur une lignée cellulaire E-11 ; elle y induit un effet cytopathique en 5 à 10 jours (Eyngor *et al.*, 2014). Tsofack *et al.* (2016) décrivent les conditions optimales nécessaires à la culture du TiLV.

8.3. Tests de confirmation

Un ensemble d'amorces PCR a été conçu et une méthode de RT-PCR a été développée (Eyngor *et al.*, 2014). Toutefois, ce test n'a pas encore été totalement validé. Une méthode de RT-PCR emboîtée, beaucoup plus sensible, a fait l'objet d'une publication et s'avère adaptée pour la détection du TiLV chez des cas cliniques (Tsofack *et al.*, 2016).

9. MÉTHODES DE CONTRÔLE

La mise en place de restrictions des mouvements de tilapiinés vivants, provenant d'élevages ou des pêches, dans les aires où il est reconnu que le virus est présent, limitera la propagation de la maladie. Des mesures générales de sécurité biologique (par exemple, le nettoyage et la désinfection) afin de réduire la propagation de la maladie par les matériels contaminés tels que l'équipement, les véhicules ou le personnel, doivent également être mises en œuvre.

À ce jour, aucune méthode efficace pour limiter l'impact d'un foyer de la maladie dans une ferme aquacole n'a été publiée. Il a été suggéré que la sélection de poissons résistants ou la mise au point d'un vaccin pourrait offrir de nouvelles perspectives à long terme pour la gestion de la maladie (Ferguson *et al.*, 2014). Un programme de reproduction devrait permettre de sélectionner et tester un large nombre de souches de tilapia, pour ne conserver que les plus résistants à la maladie.

10. RISQUE DE TRANSMISSION

Comme le TiLV a été transmis de façon horizontale lors d'études de cohabitation, il est probable que la transmission de la maladie se produise lors des mouvements d'animaux aquatiques vivants. Les informations sur les propriétés biophysiques du TiLV et sur les risques que présentent les produits issus d'animaux aquatiques sont limitées. Cependant, il peut être supposé que le TiLV possède les caractéristiques des autres orthomyxovirus aquatiques, tel que le virus de l'anémie infectieuse du saumon. Les données actuelles suggèrent que les yeux, le cerveau et le foie sont les organes contenant probablement les concentrations les plus élevées en TiLV. Par conséquent, il est probable que les déchets animaux solides et liquides soient contaminés. Toutefois, il n'est pas exclu que l'agent pathogène puisse également être détecté dans la musculature des poissons infectés.

11. RÉFÉRENCES

Bacharach, E., Mishra, N., Briese, T., Zody, M. C., Kembou Tsofack, J. E., Zamostiano, R., ... Lipkin, W. I. (2016). Characterization of a Novel Orthomyxo-like Virus Causing Mass Die-Offs of Tilapia. *mBio*, 7(2), e00431-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00431-16>

del-Pozo, J., Mishra, N., Kabuusu, R., Cheetham, S., Eldar, A., Bacharach, E., Lipkin, W.I., & Ferguson, H. W. (2016). Syncytial Hepatitis of Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) is Associated With Orthomyxovirus-Like Virions in Hepatocytes. *Veterinary Pathology* . <https://doi.org/10.1177/0300985816658100>

Eyngor, M., Zamostiano, R., Tsofack, J. E. K., Berkowitz, A., Bercovier, H., Tinman, S., Lev, M., Huryitz, A., Galeotti, M., 7 Eldar, A. (2014). Identification of a novel RNA virus lethal to tilapia. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4137–4146. <https://doi.org/10.1128/JCM.00827-14>

FAO. (2014). The state of world fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Vol. 2014). <https://doi.org/92-5-105177-1>

Ferguson, H. W., Kabuusu, R., Beltran, S., Reyes, E., Lince, J. A., & del Pozo, J. (2014). Syncytial hepatitis of farmed tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.): A case report. *Journal of Fish Diseases*, 37(6), 583–589. <https://doi.org/10.1111/jfd.12142>

Fathi, M., Dickson, C., Dickson, M., Leschen, W., Baily, J., Muir, F., Ulrich, K., & Weidmann, M. (2017). Identification of Tilapia Lake Virus in Egypt in Nile tilapia affected by 'summer mortality' syndrome. *Aquaculture* Vol. 472, 430-432

OIE. (2016). Aquatic Animal Health Code (19th ed.). Paris: OIE. Retrieved from <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-code/access-online/>

Tsofack, J. E. K., Zamostiano, R. Watted, S., Berkowitz, E., Mishra, N., Briese, T., Lipkin, W.I., Kabuusu, R.M., Ferguson, H., del Pozo, J., Eldar, A., and Bacharach, E. (2016) Detection of Tilapia Lake Virus (TiLV) in Clinical Samples by Culturing and Nested RT-PCR. *J. Clin. Microbiol.* JCM.01808-16; Accepted manuscript posted online 14 December 2016, doi:10.1128/JCM.01808-16

**PLAN DE TRAVAIL COUVRANT LA PÉRIODE 2017 – 2018
DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES**

Tâche	Septembre 2016	Février 2017	Mai 2017 (Session générale)	Septembre 2017
CODE AQUATIQUE				
Glossaire	Proposer des amendements de certaines définitions aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Critères d'inclusion des maladies dans la liste de l'OIE (chapitre 1.2.)	Examiner les observations des États membres et faire recirculer le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)	Examiner les observations des États membres et faire recirculer le chapitre pour commentaire. Examiner l'évaluation du virus du tilapia lacustre en vue de son inclusion dans la liste des maladies de l'OIE	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique (chapitre 1.5.)	Élaborer un nouvel article 1.5.9. afin de prendre en compte les maladies pour lesquelles l'agent pathogène affecte un nombre important d'hôtes	Examiner les observations des États membres et faire recirculer le chapitre pour commentaire		Examiner les commentaires des États membres
Désinfection des établissements d'aquaculture et de leur équipement (chapitre 4.3.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Obligations générales liées à la certification (chapitre 5.1.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Peste de l'écrevisse (<i>Aphanomyces astaci</i>) (chapitre 9.1.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	

Annexe 31 (suite)

Tâche	Septembre 2016	Février 2017	Mai 2017 (Session générale)	Septembre 2017
CODE AQUATIQUE (suite)				
Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Syndrome de Taura (chapitre 9.6.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Maladie des points blancs (chapitre 9.7.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Maladie des queues blanches (chapitre 9.8.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (chapitre 9.X.)	Examiner les commentaires des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Version révisée de l'article X.X.8.	Examiner les observations des États membres et faire recirculer le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Procéder à la révision des listes d'espèces sensibles de chacun des chapitres traitant des maladies des poissons	Organiser une réunion du groupe ad hoc afin d'initier les travaux d'évaluation des espèces de poisson sensibles aux maladies listées par l'OIE	Examiner le rapport du groupe ad hoc en janvier 2017. Demander au groupe ad hoc de poursuivre ses travaux.		Examiner le rapport du groupe ad hoc en avril 2017 et amender en conséquence les chapitres correspondants du <i>Code aquatique</i> .
Développer des principes permettant de déterminer les périodes de surveillance figurant dans les chapitres des maladies spécifiques concernées et conseiller des amendements à apporter au chapitre 1.4.	Réunir le groupe ad hoc en janvier 2017. Prévoir ensuite une réunion avant septembre 2017	Examiner le rapport du groupe ad hoc. Demander au groupe ad hoc de se réunir avant septembre 2017 afin de faire avancer ses travaux.		Examiner le rapport du groupe ad hoc
Nouveau chapitre sur la sécurité biologique (chapitre 4.X.)	Rédiger le mandat d'un nouveau groupe ad hoc en charge d'élaborer un projet de chapitre à ce sujet	Convoquer un groupe ad hoc avant septembre 2017		Examiner le rapport du groupe ad hoc

Annexe 31 (suite)

Tâche	Septembre 2016	Février 2017	Mai 2017 (Session générale)	Septembre 2017
CODE AQUATIQUE (suite)				
Révision des chapitres 4.2. à 4.4.				Donner la priorité à ces travaux une fois le projet de nouveau chapitre sur la sécurité biologique initié
Nouveau chapitre sur la préparation aux situations d'urgence sanitaire				Donner la priorité à ces travaux une fois le projet de nouveau chapitre sur la sécurité biologique initié
Alignement du texte du chapitre 5.3. du <i>Code aquatique</i> sur le texte du chapitre correspondant du <i>Code terrestre</i>				Mise à jour consistant à inclure dans ce chapitre les amendements adoptés dans le chapitre correspondant du <i>Code terrestre</i>
Révision du chapitre 5.4.		Réviser ce chapitre afin qu'il soit en adéquation avec le texte figurant aux chapitres traitant des maladies spécifiques et le faire circuler pour commentaire		Examiner les observations des États membres et faire recirculer le chapitre pour commentaire
Remplacer certains termes figurant dans le <i>Code aquatique</i> par le terme « agent pathogène »		Opérer les amendements progressivement dans le cadre de la révision des chapitres		
MANUEL AQUATIQUE				
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (nouveau chapitre 2.2.X.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Peste de l'écrevisse (<i>Aphanomyces astaci</i>) (chapitre 2.2.1.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 2.2.3.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Myonécrose infectieuse (chapitre 2.2.4.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 2.2.5.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Syndrome de Taura (chapitre 2.2.6.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	

Annexe 31 (suite)

Tâche	Septembre 2016	Février 2017	Mai 2017 (Session générale)	Septembre 2017
MANUEL AQUATIQUE (suite)				
Maladie des queues blanches (chapitre 2.2.8.)	Examiner les observations des États membres et faire circuler le chapitre pour commentaire	Examiner les commentaires des États membres	Proposer le texte à l'adoption	
Maladie des points blancs (chapitre 2.2.7.)	Examiner les modifications proposées pour le titre et le champ d'application	Amender la définition de cas. La faire circuler pour commentaire		Examiner les commentaires des États membres
Procéder à la révision des listes d'espèces sensibles de chacun des chapitres dédiés aux maladies des poissons	Organiser la réunion du groupe ad hoc afin d'initier les travaux d'évaluation des espèces sensibles aux maladies des poissons listées par l'OIE	Examiner le rapport du groupe ad hoc (janvier 2017). Demander au groupe ad hoc de poursuivre ses travaux		Examiner le rapport du groupe ad hoc et amender en conséquence les parties correspondantes du <i>Manuel aquatique</i>
Groupe ad hoc sur le <i>Manuel aquatique</i>	Examiner le rapport du groupe ad hoc. Proposer que soit organisée une seconde réunion	Examiner le rapport du groupe ad hoc. Proposer des amendements de la version provisoire		Examiner la version finale ainsi que tous les chapitres ayant fait l'objet d'une révision sur ce modèle
LABORATOIRE DE RÉFÉRENCE (en collaboration avec la Commission des normes biologiques)				
Procédures opérationnelles normalisées soumises pour validation et maintien du statut de laboratoire de référence	Élaborer et réviser les projets de procédures opérationnelles normalisées	Parachever les procédures opérationnelles normalisées	Proposition de la Commission des normes biologiques que le texte soit adopté	
Centres collaborateurs		Élaborer un classement des écarts potentiels		Examen
AUTRES TRAVAUX				
Document d'orientation pour conduire les évaluations visant à lister de nouvelles maladies		Élaborer un document d'orientations et le faire circuler avant septembre 2017		Examen

© **Organisation mondiale de la santé animale (OIE), 2017**

Le présent document a été préparé par des spécialistes réunis par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). En attendant son adoption par l'Assemblée mondiale des Délégués, les points de vue qui y sont exprimés traduisent exclusivement l'opinion de ces spécialistes.

Toutes les publications de l'OIE sont protégées par la législation internationale sur les droits d'auteur. Des extraits peuvent être copiés, reproduits, traduits, adaptés ou publiés dans des périodiques, documents, ouvrages, supports électroniques ou tout autre média destiné au public, dans un but informatif, éducatif ou commercial, sous réserve de l'autorisation écrite préalable de l'OIE.

Les désignations et dénominations employées ainsi que la présentation des données de cette publication ne reflètent aucune prise de position de l'OIE quant au statut de quelque pays, territoire, ville ou zone que ce soit, à leurs autorités, aux délimitations de leur territoire ou au tracé de leurs frontières.

Les points de vue exprimés dans les articles signés relèvent de la seule responsabilité de leurs auteurs. La mention de sociétés commerciales ou de produits fabriqués, brevetés ou non, n'implique pas que ces sociétés ou produits soient approuvés ou recommandés par l'OIE de préférence à d'autres, de nature similaire et non cités.