



Organisation  
Mondiale  
de la Santé  
Animale

World  
Organisation  
for Animal  
Health

Organización  
Mundial  
de Sanidad  
Animal

Original : anglais  
Février 2016

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

Paris, 15 - 19 février 2016

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 15 au 19 février 2016. 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 diffusés suite à sa réunion d'octobre 2015 : l'Argentine, l'Australie, le Canada, le Chili, la Chine (Rép. pop. de), le Taipei chinois, le Japon, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, le Panama, la Suisse, 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 avant le 15 janvier 2016 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 d'octobre 2015.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération tous les commentaires formulés par les États membres. 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 attire également l'attention des États membres sur les rapports des groupes *ad hoc*, qui comportent des informations importantes. Elle encourage les États membres à examiner ces rapports ainsi que ceux de la Commission, chaque fois que nécessaire.

Le tableau ci-après fournit un récapitulatif des textes présentés dans les annexes. Les États membres doivent prendre acte que les annexes 3 à 9 seront proposées pour adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016 ; les annexes 10 à 28 sont destinées à faire l'objet de commentaires par les États membres ; les annexes 29 à 31 sont présentées à titre informatif.

La Commission encourage fortement les États membres à participer à l'élaboration des normes internationales de l'OIE, en lui soumettant des commentaires sur le 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.

Les commentaires formulés sur les annexes 10 à 28 du présent rapport devront être adressés au siège de l'OIE avant le **5 août 2016** afin que la Commission des animaux aquatiques puisse les examiner lors de sa réunion de septembre 2016.

L'ensemble des commentaires devra être adressé au Service du commerce international de l'OIE, à l'adresse suivante : [trade.dept@oie.int](mailto:trade.dept@oie.int).

<b>Textes proposés à l'adoption</b>	<b>Numéro d'annexe</b>
<b>Code aquatique :</b>	
Glossaire Partie A	Annexe 3
Révision des articles 1.4.8., 1.5.2., 2.1.4., 4.2.3. et 4.6.3.	Annexe 4
Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques (chapitre 1.1.)	Annexe 5
Recommandations générales sur la désinfection (chapitre 4.3.)	Annexe 6
Obligations générales liées à la certification (chapitre 5.1.)	Annexe 7
Infection par le virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)	Annexe 8
<b>Manuel aquatique :</b>	
Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune (chapitre 2.2.8.)	Annexe 9
<b>Textes soumis aux États membres pour qu'ils forment leurs commentaires</b>	<b>Numéro d'annexe</b>
<b>Code aquatique :</b>	
Glossaire Partie B	Annexe 10
Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la liste de l'OIE (chapitre 1.2.)	Annexes 11 A and B
Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)	Annexe 12
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (nouveau chapitre 9.X.)	Annexe 13
Version révisée de l'article X.X.8. (textes avec ou sans suivi des modifications)	Annexe 14 A and B
Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)	Annexe 15
Peste de l'écrevisse ( <i>Aphanomyces astaci</i> ) (chapitre 9.1.)	Annexe 16
Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.)	Annexe 17
Myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.)	Annexe 18
Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.)	Annexe 19
Syndrome de Taura (chapitre 9.6.)	Annexe 20
Maladie des queues blanches (chapitre 9.8.)	Annexe 21
<b>Manuel aquatique :</b>	
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (nouveau projet de chapitre 2.2.X.)	Annexe 22
Peste de l'écrevisse ( <i>Aphanomyces astaci</i> ) (chapitre 2.2.1.)	Annexe 23
Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 2.2.2.)	Annexe 24
Myonécrose infectieuse (chapitre 2.2.3.)	Annexe 25
Hépatopancréatite nécrosante (chapitres 9.5. et 2.2.4.)	Annexe 26
Syndrome de Taura (chapitre 2.2.5.)	Annexe 27
Maladie des queues blanches (chapitres 9.8. et 2.2.7.)	Annexe 28
<b>Annexes présentées aux États membres à titre informatif :</b>	
Évaluation de l'infection à <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> au regard des critères d'inclusion dans la liste de l'OIE	Annexe 29
Rapport du Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE (octobre 2015)	Annexe 30
Plan de travail de la Commission des animaux aquatiques pour la période 2016/2017	Annexe 31

## A. RÉUNION AVEC LA DIRECTICE GÉNÉRALE

La Commission des animaux aquatiques a rencontré le Docteur Monique Éloit, Directrice générale, le 17 février 2016. Le Docteur Éloit a accueilli les membres de la Commission et les a remerciés pour leur appui et leur engagement à atteindre les objectifs de l'OIE.

Entre autres sujets, le Docteur Éloit a rappelé les principaux objectifs du Sixième plan stratégique et leur possible impact sur les travaux de la Commission.

Le Docteur Éloit a souligné l'importance des procédures de l'OIE dans l'élaboration des normes. Concernant la Commission des animaux aquatiques et les autres Commissions spécialisées, elle a expliqué qu'il était prévu de mettre prochainement en place les actions suivantes :

- 1) la création d'un service unique destiné à devenir le Secrétariat des quatre Commissions spécialisées, qui aura pour tâche de faciliter la collaboration entre ces Commissions et d'alléger le travail de partage des documents par l'intermédiaire de services d'appui communs ;
- 2) l'élaboration d'un programme de formation en interne du personnel de ce secrétariat scientifique, afin de renforcer ses compétences ;
- 3) la modernisation du site Internet de l'OIE, afin de faciliter l'accès aux divers rapports techniques de réunion et, de façon plus générale, d'améliorer la transparence des travaux de l'OIE pour permettre une plus grande participation des États membres à l'élaboration des normes.

Le Docteur Éloit a également donné des explications sur le plan d'amélioration du déroulement des élections des membres des Commission spécialisées. L'objectif de ce plan est de mieux informer les Délégués amenés à voter sur l'expertise scientifique et les qualifications des candidats se présentant à l'élection. Dans un contexte de renforcement de l'excellence scientifique, le Docteur Éloit a également souligné la nécessité de renforcer les liens avec les communautés scientifiques concernées, notamment en tenant compte des nouveaux domaines de la science, et avec la prochaine génération de scientifiques.

Le Docteur Ingo Ernst, Président de la Commission des animaux aquatiques, a remercié le Docteur Éloit pour son soutien. Il a expliqué que la Commission des animaux aquatiques élaborait un plan de travail qui prenait en compte les commentaires des États membres et fixait des objectifs réalisables pendant la durée de son mandat de trois ans.

## B. ADOPTION DE L'ORDRE DU JOUR

Le projet d'ordre du jour adressé aux membres préalablement à la réunion a été discuté. Plusieurs nouveaux points y ont été ajoutés. 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

Le Président de la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres (ou Commission du Code) a rencontré, à plusieurs reprises pendant la semaine où les deux Commissions tenaient leur réunion respective, le Président de la Commission des animaux aquatiques, afin d'aborder les sujets d'intérêt commun, notamment :

- la proposition de nouvelles définitions destinées au glossaire, à savoir « norme de l'OIE » et « ligne directrice de l'OIE » ;
- la proposition de révision des chapitres 1.1. des *Codes aquatique et terrestre* ;
- la proposition de révision des chapitres 1.2. des *Codes aquatique et terrestre* ;
- la proposition de restructuration du Titre 4 des *Codes aquatique et terrestre* ;
- la proposition d'élaboration d'un document d'orientation sur l'application des critères d'inclusion dans la Liste des maladies de l'OIE, destiné aux groupes ad hoc.

La Commission des animaux aquatiques a reconnu que la tenue simultanée des réunions de la Commission des animaux aquatiques et de la Commission du Code, permettant aux Présidents respectifs de se rencontrer, était une bonne initiative qu'il convenait de faire perdurer, afin de faciliter le travail d'harmonisation des chapitres concernés, lorsque ceux-ci faisaient l'objet d'une révision par leur Commission respective.

## D. CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES - EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES ET DES TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS

### Point 1 Commentaires d'ordre général

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par le Chili et la Suisse.

En réponse à un commentaire d'État membre concernant le transit de marchandises non listées à l'article X.X.3. des chapitres traitant des maladies spécifiques (importation ou transit d'animaux aquatiques et de produits issus d'animaux aquatiques, indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés), la Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que ce cas de figure était traité aux points 2 et 3 de l'article X.X.3.

La Commission des animaux aquatiques a retenu les propositions de certains États membres visant à modifier les noms vernaculaires de plusieurs espèces de crevettes pénéides. La Commission a convenu de revenir plus en détail sur ce point et d'en discuter lors de sa prochaine réunion.

Dans le droit fil de la recommandation faite par la Commission du Code, la Commission des animaux aquatiques a jugé nécessaire que les Délégués soient informés de la mise en ligne de la nouvelle édition du *Code aquatique* sur le site Internet de l'OIE. Elle a recommandé que le siège de l'OIE adresse un courrier aux Délégués pour leur notifier la disponibilité du document. La Commission du Code a également suggéré que soit fournie aux Délégués la liste des chapitres ayant fait l'objet d'amendements.

Dans le droit fil de la recommandation faite par la Commission du Code, la Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition d'un État membre d'appliquer la convention typographique (proposition de suppression par la fonction « barré » et proposition d'ajout par la fonction « double soulignement »), utilisée pour les amendements des textes dans les projets de chapitres révisés, aux mots entiers et non aux syllabes, afin de faciliter leur examen par les États membres.

### Point 2 Glossaire

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par la Chine (Rép. pop. de), l'EU, le Japon, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, la Thaïlande et les États-Unis d'Amérique.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération les commentaires des États membres ainsi que les propositions d'amendements de la Commission du Code des définitions concernées figurant dans le glossaire du *Code terrestre*. En outre, le Président de la Commission des animaux aquatiques a rencontré le Président de la Commission du Code à deux reprises, lors des réunions respectives des deux Commissions, afin de faire le point sur l'harmonisation des définitions « Norme de l'OIE » et « Ligne directrice de l'OIE » entre les deux *Codes*.

#### Norme de l'OIE

En réponse à un commentaire d'État membre, la Commission des animaux aquatiques a réaffirmé qu'une « norme de l'OIE » et « une ligne directrice de l'OIE » pouvaient toutes deux inclure des recommandations et que ce qui distinguait une « norme de l'OIE » était son adoption par le processus mis en œuvre lors de la Session générale de l'OIE.

Le Président des animaux aquatiques et le Président de la Commission du Code ont discuté des modifications proposées par chacune des Commissions. Les Commissions se sont accordées sur plusieurs modifications garantissant l'harmonisation des définitions proposées respectivement pour le *Code aquatique* et le *Code terrestre*.

La Commission des animaux aquatiques a estimé que toute définition figurant dans le glossaire du *Code aquatique* devait être adaptée aux fins dudit *Code* et devait permettre une parfaite compréhension des articles dans lesquels elle figurait. Pour cette raison, la Commission des animaux aquatiques a convenu que la définition ferait référence au *Code aquatique* ou au *Manuel aquatique*, qui sont tous deux des termes définis.

Le Président de la Commission des animaux aquatiques a rencontré le Président de la Commission du Code afin de discuter de l'opportunité de faire référence, dans les définitions « Norme de l'OIE » et « Ligne directrice de l'OIE » communes aux deux *Codes*, aux « *Codes* et *Manuels* ». Une approche alternative consisterait à faire référence, dans les définitions respectives des *Codes*, aux termes définis correspondants, c'est-à-dire « *Code aquatique* ou *Manuel aquatique* » et « *Code terrestre* ou *Manuel terrestre* ». La pertinence de la définition de ces termes, utilisés en dehors du champ d'application des *Codes*, a également été discutée. Ces questions doivent être adressées au Conseil de l'OIE. En attendant, des versions légèrement modifiées des définitions sont présentées dans les rapports respectifs de la Commission des animaux aquatiques et la Commission du Code.

La Commission des animaux aquatiques a remercié les États membres pour leurs commentaires, qui ont mis en exergue la nécessité d'examiner l'utilisation faite du terme « Norme de l'OIE » dans le *Code aquatique* et de procéder à des modifications en ligne avec la nouvelle définition, une fois celle-ci adoptée.

#### Ligne directrice de l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a de nouveau modifié cette définition afin qu'elle soit structurée de façon similaire à la définition de « Norme de l'OIE ». Elle a effectué plusieurs amendements en réponse aux commentaires des États membres et de la Commission du Code afin d'en améliorer la clarté.

La Commission des animaux aquatiques a remercié les États membres pour leurs commentaires, qui ont mis en exergue la nécessité d'examiner l'utilisation faite de ce terme dans le *Code aquatique* et de procéder à des modifications en ligne avec la nouvelle définition, une fois celle-ci adoptée.

#### Vecteur

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération les commentaires des États membres et remplacé le terme « organisme » par le terme « agent pathogène », qui est défini.

#### Vide sanitaire

La Commission des animaux aquatiques a proposé que le terme « porteur » soit remplacé par le terme « vecteur » afin de prendre en compte la nouvelle définition proposée pour le terme « vecteur ».

#### Animaux aquatiques

La Commission des animaux aquatiques a reconnu que l'utilisation qui était faite des termes « animaux aquatiques » et « animaux aquatiques vivants » dans le *Code aquatique* était incohérente et que la définition actuelle du terme « animaux aquatiques » n'incluait que les animaux aquatiques vivants. La Commission a proposé une version révisée de la définition de « animaux aquatiques » afin d'explicitier ce point et également de supprimer le texte concernant l'utilisation à laquelle les animaux aquatiques sont destinés, considérant qu'elle était sans rapport avec la définition.

La Commission des animaux aquatiques a expliqué que l'adoption de cet amendement se traduirait par le retrait du mot « vivant » du terme « animaux aquatiques vivants » dans l'ensemble du *Code aquatique*.

La partie B du Glossaire (comportant une version révisée du terme « animaux aquatiques » et deux nouvelles définitions, celles des termes « Norme de l'OIE » et « Ligne directrice de l'OIE ») est présentée aux États membres en annexe 10 afin qu'ils la commentent.

La partie A du Glossaire (comportant une nouvelle définition, celle du terme « vecteur », et une version révisée du terme « vide sanitaire ») est présentée en annexe 3 et sera proposée à l'adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

### **Point 3 Projet d'amendements des articles 1.4.8., 1.5.2., 2.1.4., 4.2.3. et 4.6.3 comme conséquence de la définition proposée pour le terme « vecteur »**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'UE, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, la Norvège et les États-Unis d'Amérique.

Les États membres se sont prononcés en faveur des amendements proposés aux articles 1.5.2. et 4.2.3.

En plus des amendements proposés aux articles 1.5.2. et 4.2.3., la Commission des animaux aquatiques a expliqué que le terme « porteur » devait être remplacé par le terme « vecteur » aux articles 1.4.8., 2.1.4. et 4.6.3., afin de prendre en compte la nouvelle définition proposée pour le terme « vecteur ».

La Commission des animaux aquatiques n'a pas répondu aux commentaires des États membres concernant le texte non proposé pour amendement.

La version révisée des articles 1.4.8., 1.5.2., 2.1.4., 4.2.3. et 4.6.3 est présentée en [annexe 4](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

#### **Point 4 Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques (chapitre 1.1.)**

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que, étant donné l'ampleur du travail d'harmonisation réalisé entre ce chapitre et le chapitre correspondant du *Code terrestre*, les amendements proposés par la Commission des animaux aquatiques lors de sa réunion d'octobre 2015 avaient été transmis à la Commission du Code pour avis lors de sa réunion de février 2016.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les amendements proposés par la Commission du Code pour le chapitre correspondant du *Code terrestre* et les a pris en considération lorsqu'elle a procédé aux amendements du chapitre 1.1. du *Code aquatique*.

La Commission des animaux aquatiques a accepté de procéder à des amendements mineurs afin d'harmoniser les textes respectifs des deux *Codes*, hormis dans les cas où il était nécessaire de conserver une terminologie spécifique en raison de différences existant dans les définitions des glossaires respectifs des deux *Codes*.

La version révisée du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques » est présentée en [annexe 5](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

#### **Point 5 Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la liste de l'OIE (chapitre 1.2.)**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'Australie, le Canada, l'UE, le Japon, la Malaisie, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, la Thaïlande et les États-Unis d'Amérique.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération les commentaires des États membres ainsi que les amendements proposés par la Commission du Code pour le chapitre correspondant du *Code terrestre* afin d'effectuer les amendements en conséquence. En outre, les Présidents de la Commission des animaux aquatiques et de la Commission du Code se sont rencontrés afin de discuter des paragraphes dans lesquels le texte différait. Ils ont convenu d'harmoniser le texte dans la mesure du possible, en notant toutefois que certaines différences subsisteraient nécessairement en raison des spécificités environnementales associées respectivement aux maladies des animaux aquatiques et des animaux terrestres.

La Commission des animaux aquatiques a noté que, pour permettre d'atteindre l'objectif de l'évaluation au regard des critères d'inclusion dans la liste des maladies de l'OIE, les critères figurant dans le *Code aquatique* devaient être suffisamment flexibles et adaptés aux spécificités environnementales associées aux maladies des animaux aquatiques, notamment la croissance rapide et l'expansion de l'aquaculture, les volumes importants commercialisés, la diversité des espèces, l'émergence fréquente de maladies affectant les animaux aquatiques et la difficulté à les éradiquer. Durant les 20 dernières années, 19 nouvelles maladies affectant les animaux aquatiques ont été incluses dans la liste de l'OIE. Par ailleurs, 16 maladies affectant les animaux aquatiques ont été retirées de cette Liste depuis 2005.

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition des États membres visant à amender, dans l'article 1.2.1., la référence au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique* relatif aux principes et méthodes de validation des épreuves de diagnostic, considérant que la forme rédactionnelle du texte reflétait le thème traité dans ce chapitre du *Manuel* et qu'il n'était donc pas nécessaire d'indiquer le titre dans son intégralité.

La Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition des États membres d'inclure le terme « vecteurs » au point 1 de l'article 1.2.2.

La Commission des animaux aquatiques a refusé la proposition d'un État membre d'harmoniser le texte du critère 1 figurant à l'article 1.2.2. avec le texte utilisé dans le *Code terrestre*, c'est-à-dire d'intégrer « a été prouvée » plutôt que « est probable ». La Commission a rappelé que l'objectif de l'inclusion dans la liste de l'OIE était de « *prévenir 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 souligné qu'il serait contraire à l'objectif de l'inclusion dans la liste de l'OIE d'attendre que « la propagation internationale d'un agent pathogène » soit prouvée lorsque des preuves scientifiques et le fonctionnement des échanges commerciaux internationaux indiquent que la propagation est probable. Cela est tout particulièrement important dans le cas des maladies des animaux aquatiques en raison des caractéristiques susmentionnées, en particulier le défi que constitue l'éradication de ces maladies une fois qu'elles se sont propagées.

La Commission des animaux aquatiques a refusé la proposition d'un État membre de remplacer le terme « précise » par le terme « exacte » au point 3 de l'article 1.1.2., considérant que ce terme était plutôt réservé à des mesures et que dans le cas présent, le terme « précise » était plus approprié.

#### Critères 4b et 4c proposés

La Commission des animaux aquatiques a refusé la proposition d'un État membre d'inclure, dans ces points, une référence à la « sévérité des signes cliniques » comme mesure de l'impact de la maladie, car les signes cliniques ne sont pas toujours des indicateurs utiles des conséquences d'une maladie chez les animaux aquatiques.

Certains États membres ont estimé nécessaire l'illustration de ces critères par des exemples. La Commission des animaux aquatiques a souligné que les exemples donnés n'étaient pas exhaustifs et qu'ils offraient une aide utile à la compréhension des types de conséquences à anticiper dans le cadre de l'évaluation d'une maladie au regard de ces critères d'inclusion dans la liste de l'OIE. En outre, la Commission a estimé que cette approche était cohérente avec l'approche utilisée dans les articles correspondants du *Code terrestre*.

La Commission des animaux aquatiques a refusé la proposition des États membres d'inclure le terme « directes » pour qualifier les pertes de production et les pertes économiques car les pertes indirectes peuvent également être importantes lorsqu'on considère les conséquences globales d'une maladie.

En réponse aux commentaires de certains États membres, la Commission des animaux aquatiques a estimé qu'il était important que les impacts sur les animaux aquatiques sauvages et d'élevage fassent l'objet de critères distincts (c'est-à-dire 4b et 4c), car la production d'animaux aquatiques mondiale est constituée pour moitié d'animaux aquatiques sauvages. En outre, la Commission a convenu d'inclure le terme « productivité » dans le critère 4c car c'est un élément de mesure important des impacts des maladies des animaux aquatiques sur les ressources halieutiques.

La Commission des animaux aquatiques a noté que les critères d'inclusion dans la liste de l'OIE figurant dans les chapitres 1.2. respectifs des éditions actuelles du *Code aquatique* et du *Code terrestre* différaient de façon substantielle. La proposition d'amendements des critères figurant au chapitre 1.2. du *Code aquatique* devrait permettre une harmonisation plus poussée entre les critères d'inclusion figurant dans les deux Codes. Les différences mineures qui ont été conservées sont considérées nécessaires à l'atteinte de l'objectif de l'inclusion dans la liste de l'OIE tel que décrit à l'article 1.2.1. du *Code aquatique*. La Commission encourage les membres à examiner les explications proposées dans le rapport d'octobre 2015 pour justifier les modifications des critères.

Les États membres ont accueilli favorablement la suggestion de la Commission des animaux aquatiques d'utiliser les « Notes explicatives », dont le retrait du chapitre 1.2. est proposé, afin d'élaborer un document d'orientation sur l'application des critères d'inclusion, destiné aux groupes *ad hoc*. La Commission des animaux aquatiques a convenu de travailler avec la Commission du Code sur l'élaboration de ce document.

La proposition de chapitre 1.2. « Critères d'inclusion des maladies dans la liste de l'OIE » est présentée aux États membres en [annexe 11A](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires. Sur l'[annexe 11A](#) figurent les modifications apportées à la version exempte de suivi des modifications qui a été présentée aux États membres dans le rapport de la Commission d'octobre 2015. Sur l'[annexe 11B](#) figure les modifications apportées à la version comportant le suivi des modifications qui a été présentée aux États membres dans le rapport de la Commission d'octobre 2015.

## Point 6 Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'Australie, l'UE, la Chine (Rép. pop. de), le Mexique et la Norvège.

La Commission des animaux aquatiques a examiné tous les noms utilisés pour désigner les maladies des crustacés figurant à l'article 1.3.3. et a procédé à des modifications en accord avec la convention couramment utilisée, c'est-à-dire « Infection par l'agent pathogène X ». Ils ont rappelé que, lorsque la convention de dénomination est appliquée à des maladies communément désignées par un nom ne mentionnant pas l'identité de l'agent pathogène, ce nom devra figurer entre parenthèses à la suite du titre du chapitre, par exemple « Infection à *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) ». Il est proposé d'inclure les noms suivants dans l'article 1.3.3. :

- Infection à *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) ;
- Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune ;
- Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ;
- Infection par le virus de la myonécrose infectieuse ;
- Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) ;
- Infection par le virus du syndrome de Taura ;
- Infection par le virus du syndrome des points blancs ;
- Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (maladie des queues blanches).

La Commission des animaux aquatiques a expliqué que cette convention serait également appliquée aux chapitres traitant spécifiquement des maladies des crustacés figurant dans les *Code et Manuel aquatiques* (à l'exception du chapitre 9.7. « Maladie des points blancs », pour lequel cette convention sera appliquée une fois que la liste des espèces sensibles aura été révisée) (voir point 13).

Certains États membres ont demandé que le nom « Infection par des variants délétés dans la RHP du virus de l'anémie infectieuse du saumon ou par des variants RHP0 de ce virus » du chapitre 1.3. soit remplacé par « Infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon ». La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que le nom employé pour désigner cette maladie avait été choisi aux fins de la notification et permettait de souligner que seule l'infection par les formes délétées dans la RHP et HPR0 du virus de l'anémie infectieuse du saumon était à déclaration obligatoire à l'OIE. La Commission des animaux aquatiques a expliqué que le nom de la maladie listée était pertinent au regard du champ d'application du chapitre 10.4.

Un État membre a demandé que la Commission des animaux aquatiques réexamine l'évaluation de l'iridovirose de la daurade japonaise afin de s'assurer que cette maladie satisfaisait toujours aux critères d'inclusion dans la liste de l'OIE. La Commission n'a pas eu connaissance de nouvelles informations susceptibles de modifier les résultats de l'évaluation de cette maladie au regard des critères d'inclusion dans la liste de l'OIE. La Commission a indiqué qu'elle recueillerait avec intérêt de telles informations. La Commission a reconnu que certains problèmes concernant les méthodes de diagnostic figurant dans le *Manuel aquatique* pour cette maladie avaient été soulevés ; elle a indiqué qu'ils seraient traités par un nouveau groupe *ad hoc* qui travaillera sur plusieurs aspects du *Manuel aquatique*.

Un État membre a demandé que soit retirée de la liste de l'OIE la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, considérant que le critère n°7 actuel n'était pas satisfait. La Commission des animaux aquatiques a indiqué qu'elle n'était pas d'accord et a souligné que plusieurs pays pouvaient être déclarés indemnes de cette maladie.

La Commission des animaux aquatiques a proposé que la proposition de noms modifiés de ces maladies de crustacés soit communiquée aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires.

### Point 6.1. Évaluation de l'infection à *Marteilia cochilia* au regard des critères d'inclusion dans la liste de l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a examiné l'évaluation de l'infection à *Marteilia cochilia*, réalisée conformément aux dispositions de l'article 1.2.2.

La Commission des animaux aquatiques a conclu que les preuves actuellement disponibles étaient insuffisantes pour satisfaire aux critères 6 et 7 (de l'article 1.2.2. du *Code aquatique*, édition 2015) et donc pour permettre l'inclusion de la maladie dans la liste de l'OIE.

**Point 6.2. Évaluation de l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans* au regard des critères d'inclusion la liste de l'OIE**

La Commission des animaux aquatiques a examiné l'évaluation de l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans*, réalisée conformément aux dispositions de l'article 1.2.2.

La Commission des animaux aquatiques a conclu que l'infection à *B. salamandrivorans* satisfaisait aux critères d'inclusion dans la liste de l'OIE figurant au chapitre 1.3. et que, par conséquent, son inclusion était proposée dans l'article 1.3.4.

L'évaluation de l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans* au regard des critères d'inclusion dans la liste de l'OIE est présentée aux États membres en annexe 29 à titre informatif.

**Point 6.3. Infection à *Ranavirus***

La Commission des animaux aquatiques a noté que la typographie du terme « ranavirus » figurant aux chapitres 1.3. et 8.2. était incorrecte. Elle a donc proposé de procéder à une modification afin que le nom listé soit « infection à *Ranavirus* ». La Commission a proposé d'effectuer les modifications correspondantes dans le chapitre 8.2. de la prochaine édition du *Code aquatique* dès lors que le changement de typographie aura été adopté.

La version révisée du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OIE » est présentée aux États membres en annexe 12 afin qu'ils la commentent.

**Point 7 Recommandations générales sur la désinfection (chapitre 4.3.)**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'Argentine, l'Australie, le Chili, la Chine (Rép. pop. de), l'UE, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, la Norvège et la Thaïlande.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et effectué les amendements en conséquence.

La Commission des animaux aquatiques a pris note du fort intérêt des États membres pour ce projet de chapitre et a indiqué que la majorité des commentaires formulés n'était pas d'ordre technique mais visait plutôt à améliorer la lisibilité du texte. Nombre de ces suggestions ont été acceptées par la Commission.

La Commission des animaux aquatiques a noté que certains États membres estimaient que le projet de chapitre avait été abordé sous l'angle des piscicultures ; toutefois, aucune proposition de texte spécifique visant à traiter ce point n'a été proposée. La Commission a refusé les commentaires d'États membres qui relevaient plus du domaine de la sécurité biologique que de celui de la désinfection ; elle a expliqué que le thème de la sécurité biologique serait traité dans un nouveau projet de chapitre, tel que proposé par la Commission aux fins de restructuration du Titre 4 du *Code aquatique* (voir point 8).

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 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

**Point 8 Proposition de restructuration du Titre 4 – Prévention et contrôle des maladies**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'Australie, la Chine (Rép. pop. de), l'UE, la Norvège et la Thaïlande.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération les commentaires des États membres et a apprécié leur important soutien concernant sa proposition de restructuration. La Commission a donné la priorité à la révision et à l'élaboration de chapitres destinés au Titre 4, inscrites dans son plan de travail triennal. En ligne avec les commentaires des États membres, la Commission a convenu que sa priorité première serait la finalisation et l'adoption du chapitre 4.3. « Désinfection des établissements d'aquaculture et de leur équipement ». Les autres chapitres qui seront traités sont, par ordre de priorité : le nouveau chapitre sur la sécurité biologique (élaboration), les chapitres 4.1. et 4.2. sur le zonage et la compartimentation (révision) et le nouveau chapitre sur la préparation aux situations d'urgence sanitaire (élaboration).

La Commission des animaux aquatiques a relevé que certains États membres suggéraient que soit élaboré un texte complémentaire sur la désinfection des œufs d'autres espèces d'animaux aquatiques. La Commission a demandé que les États membres lui fassent parvenir des suggestions d'espèces pour lesquelles la désinfection des œufs apparaît comme indispensable à la prévention de la transmission des maladies, au regard des pratiques de l'industrie et des échanges commerciaux. La Commission des animaux aquatiques a pressé les États membres de lui faire parvenir des informations scientifiques pertinentes, y compris tout protocole validé pour la désinfection des œufs. La Commission envisagera l'élaboration d'un nouveau texte sous réserve des réponses apportées par les États membres.

#### **Point 9 Obligations générales liées à la certification (chapitre 5.1.)**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'Australie, le Canada, l'UE, la Nouvelle-Zélande, la Norvège et la Thaïlande.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et a effectué les amendements en conséquence.

La Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition d'un État membre de réintroduire un texte au point 2 de l'article 5.1.4. Ce texte répond aux besoins de l'Autorité compétente d'un pays exportateur d'informer le pays importateur du résultat de l'enquête initiée suite à la détection d'une maladie en lien avec l'importation de marchandises issues d'animaux aquatiques.

La version révisée du chapitre 5.1. « Obligations générales liées à la certification » est présentée en annexe 7 et sera proposée à l'adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

#### **Point 10 Infection par le virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l'UE, le Canada, la Chine (Rép. pop. de), la Malaisie, la Nouvelle-Zélande, la Norvège et la Thaïlande.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires des États membres et a effectué des amendements en conséquence.

En raison d'une publication récemment parue, un État membre a suggéré que soit incluse dans l'article 9.2.2., comme espèce sensible à l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'écrevisse *Cherax quadricarinatus*. La Commission des animaux aquatiques a consulté le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE. Le groupe ad hoc a conclu que cette espèce ne satisfaisait pas aux critères d'évaluation de la sensibilité (tels que décrits à l'article 1.5.7.) en raison de l'insuffisance de preuves de l'infection. Le groupe ad hoc a recommandé que cette espèce soit incluse au paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.8. du *Manuel aquatique* relatif aux espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont insuffisantes.

La Commission des animaux aquatiques a amendé le titre de plusieurs articles afin qu'il soit en ligne avec le titre modifié du chapitre 9.2., qui inclut uniquement le génotype 1.

La Commission des animaux aquatiques a refusé la proposition d'un État membre de fusionner les articles 9.2.4. et 9.2.5., considérant que les conditions décrites différaient légèrement.

En réponse à la suggestion d'un État membre d'élargir le champ d'application du chapitre afin d'y inclure tous les génotypes du virus de la tête jaune, la Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que le champ d'application de ce chapitre n'avait pas changé et qu'il incluait uniquement le génotype 1 du virus de la tête jaune, agent pathogène responsable de la maladie de la tête jaune. Les révisions proposées sont destinées à rendre explicite le champ d'application et à assurer la cohérence de l'ensemble du chapitre.

La Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition des États membres d'amender le titre de l'article 9.2.3. afin qu'il en reflète le contenu, qui concerne l'importation ou le transit d'animaux aquatiques et de produits issus d'animaux aquatiques, indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut 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. La Commission des animaux aquatiques a proposé, une fois cet amendement adopté, de l'inclure dans l'article X.X.3. de l'ensemble des chapitres traitant des maladies spécifiques du *Code aquatique*.

La version révisée du chapitre 9.2. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune » est présentée en annexe 8 et sera proposée pour adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

### Point 11 Nouveau chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (chapitre 9.X.)

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par l’Australie, le Canada, la Chine (Rép. pop. de), l’UE, le Japon, le Mexique, la Nouvelle-Zélande, la Norvège, la Thaïlande et les États-Unis d’Amérique.

En réponse à des commentaires d’États membres, la Commission des animaux aquatiques a amendé et harmonisé le texte du champ d’application figurant dans les projets de chapitres respectifs du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe.

En réponse à plusieurs commentaires d’États membres sur les listes de marchandises figurant aux articles 9.X.3. et 9.X.11., la Commission des animaux aquatiques leur a rappelé que ces paragraphes avaient été mis « à l’étude » (comme indiqué par la présence de crochets [...]) en attendant le résultat des évaluations conduites sur une variété de marchandises faisant communément l’objet d’échanges commerciaux internationaux, au regard des critères figurant au chapitre 1.5. La Commission a demandé que ces évaluations soient réalisées par le groupe ad hoc sur les espèces sensibles, qui doit se réunir en cours d’année, puis transmises à la Commission, lors de sa réunion en septembre 2016, afin qu’elle puisse actualiser les articles concernés.

Les États membres ont demandé que *Penaeus Chinensis* (crevette charnue) soit listée comme espèce sensible dans l’article 9.X.2., car un certain nombre de publications, par exemple de l’Organisation des Nations-Unies pour l’alimentation et l’agriculture (FAO) et du Réseau de centres d’aquaculture dans la région Asie-Pacifique (NACA), rapportent que cette espèce est sensible à la maladie. La Commission des animaux aquatiques a pris note que le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l’infection par des maladies listées par l’OIE considérait comme insuffisantes les preuves permettant de satisfaire aux critères d’inclusion dans la liste des espèces sensibles à la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, conformément au chapitre 1.5. (voir détails en annexe 30).

La Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition d’un État membre de remplacer le terme « risque » et a effectué les amendements au texte dès lors que la signification voulue de ce terme ne concordait pas avec la définition du « risque » figurant dans le glossaire.

La Commission des animaux aquatiques a également apporté certains amendements mineurs au texte, qui figurent ci-après, afin d’en améliorer la lisibilité. En raison de la présence de paragraphes similaires dans tous les chapitres traitant des maladies spécifiques, la Commission a proposé, une fois que cet amendement aura été adopté, de l’intégrer dans l’ensemble des chapitres concernés du *Code aquatique* :

- 1) aux points 4b) des articles 9.X.4. et 9.X.5. : remplacement du terme « *risque* » par « probabilité » ;
- 2) à l’article 9.X.5. : l’*Autorité compétente de ce du pays concerné* ou par l’ensemble des *Autorités compétentes concernées* ;
- 3) au point 3 de l’article 9.X.3. : suppression des mots « en termes de propagation » après le terme « *risque* ».

La Commission des animaux aquatiques a proposé de modifier l’article 9.X.8., dont la structure est identique à celle qui figure actuellement dans les autres chapitres traitant des maladies spécifiques du *Code aquatique*, dès lors que la proposition d’amendement de l’article X.X.8. (voir point 12) aura été adoptée. L’article 9.X.8. sera l’objet d’une révision au fur et à mesure que d’autres amendements seront adoptés dans ce même article.

La Commission des animaux aquatiques a demandé que la fiche technique sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe soit retirée du site Internet de l’OIE, étant donné que de nouveaux chapitres sur cette maladie, destinés au *Code aquatique* et au *Manuel aquatique*, sont en cours de préparation.

Le nouveau projet de chapitre 9.X. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe » est présenté en [annexe 13](#) et sera proposé à l’adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

### Point 12 Version révisée de l’article X.X.8.

La Commission des animaux aquatiques a examiné la référence faite au Code de conduite pour les introductions et les transferts d’organismes marins du Conseil international pour l’exploration de la mer (CIEM) aux points 2 et 3 de l’article X.X.8. figurant dans l’ensemble des chapitres traitant des maladies spécifiques (ou de l’article 10.14.12. dans le cas de l’infection par le virus de l’anémie infectieuse du saumon) ; elle a estimé que sa présence dans le *Code aquatique* n’était pas appropriée et qu’il était nécessaire d’explicitement les exigences spécifiques à satisfaire. La Commission a élaboré une version révisée du texte de cet article, décrivant de façon plus adéquate les exigences à satisfaire pour l’importation des animaux aquatiques à des fins d’aquaculture à partir d’un pays, d’une zone ou d’un compartiment non déclaré indemne de la maladie X.

La Commission des animaux aquatiques a proposé d'intégrer, dans l'ensemble des chapitres traitant des maladies spécifiques du *Code aquatique*, tous les amendements proposés, dès lors qu'ils seront adoptés.

Sont présentées aux États membres, afin qu'ils les commentent, la version révisée de l'article X.X.8. exempte du suivi des modifications (annexe 14A) et la version révisée comportant le suivi des modifications (annexe 14B).

### **Point 13 Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE**

La Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE et a félicité ses membres pour le travail substantiel accompli.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les modifications de la liste d'espèces sensibles figurant à l'article X.X.2. du *Code aquatique* proposées par le groupe ad hoc, pour la peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*), la nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse, la myonécrose infectieuse, l'hépatopancréatite nécrosante, le syndrome de Taura, la maladie des queues blanches et la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau projet de chapitre).

La Commission des animaux aquatiques a noté que, de l'application des nouveaux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à un agent pathogène spécifique (tels que décrits au chapitre 1.5.), avait résulté une liste amendée d'espèces sensibles à l'article X.X.2. de chacun des chapitres traitant des maladies spécifiques (voir détails dans le rapport du groupe ad hoc présenté en annexe 30).

La Commission des animaux aquatiques a noté que l'application des critères à des maladies affectant une grande variété d'hôtes pouvait modifier de façon substantielle la composition de la liste d'espèces sensibles figurant à l'article X.X.2. des chapitres traitant des maladies spécifiques concernées. Par exemple, sur la base des critères appliqués par le groupe ad hoc, la nouvelle liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre sur la peste de l'écrevisse ne comportera plus que 10 espèces alors que la liste actuelle inclut plusieurs centaines d'espèces appartenant aux familles des Cambaridae, Astacidae et Parastacidae. La Commission a souligné que cela aurait des implications pour l'application des mesures visant à assurer la sécurité au plan sanitaire des échanges commerciaux, notamment lorsque la sensibilité des espèces commercialisées est probable quoique non démontrée par l'exposition naturelle ou expérimentale à l'infection. En outre, dans certains cas, il peut être impossible de démontrer que les espèces testées au sein d'un même groupe taxonomique (par exemple, le genre ou la famille) sont résistantes à l'infection. La Commission a souligné que ce point aurait des implications pour d'autres maladies affectant un large spectre d'hôtes, telles que la maladie des points blancs et le syndrome ulcéral épizootique et a invité les États membres à lui faire parvenir des propositions pour résoudre ce problème.

La Commission des animaux aquatiques a convenu de communiquer aux États membres les amendements proposés pour les listes d'espèces sensibles figurant respectivement aux articles 9.1.2., 9.3.2., 9.4.2., 9.5.2, 9.6.2, 9.8.2. et 9.X.2. (maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

En outre, la Commission des animaux aquatiques a proposé d'amender les chapitres traitant des maladies spécifiques des crustacés concernés afin qu'il soit tenu compte de la convention de dénomination proposée pour les noms des maladies, c'est-à-dire « Infection par l'agent pathogène X » (voir point 6).

La Commission des animaux aquatiques a également recommandé que le groupe ad hoc poursuive son travail et révise la liste d'espèces sensibles à la maladie des points blancs.

La Commission des animaux aquatiques a enfin recommandé la création d'un nouveau groupe ad hoc afin de réviser la liste des espèces de poissons sensibles aux maladies listées par l'OIE.

Le rapport du groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE est présenté aux États membres en annexe 30 à titre informatif.

Les versions révisées des chapitres 9.1. « Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) », 9.3. « Nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse », 9.4. « Myonécrose infectieuse », 9.5. « Hépatopancréatite nécrosante », 9.6 « Syndrome de Taura » et 9.8. « Maladie des queues blanches » sont présentées en annexes 16 à 21 aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires.

Des amendements similaires ont été apportés au projet de chapitre 9.X. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe » présenté en annexe 13 (voir point 11).

**Point 14 Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)**

Les commentaires adressés à la Commission ont été formulés par le Chili, la Norvège et les États-Unis d'Amérique.

Plusieurs États membres ont adressé des commentaires détaillés incluant un argumentaire en faveur d'amendements à apporter au texte du chapitre 4.4. « Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés ». La Commission des animaux aquatiques a examiné ces commentaires et amendé le texte, le cas échéant.

La version révisée du chapitre 4.4. « Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés » est présentée aux États membres en annexe 15 afin qu'ils formulent leurs commentaires.

**E. AUTRES POINTS CONCERNANT LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES**

**Point 15 Document répertoriant les évaluations réalisées en matière de sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques**

La Commission des animaux aquatiques a été informée de la prochaine mise en ligne sur le site Internet de l'OIE d'un document répertoriant l'ensemble des évaluations réalisées en matière de sécurité sanitaire des produits issus d'animaux aquatiques, au moyen des critères décrits au chapitre 5.4. « Critères d'évaluation de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques » et applicables aux produits issus d'animaux aquatiques figurant à l'article X.X.3. « produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés » et à l'article X.X.11. « produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine » (ou à l'article 10.4.15 pour le chapitre sur l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon) des chapitres traitant des maladies spécifiques :

<http://www.oie.int/fr/normes-internationales/commissions-specialisees-et-groupes/commission-animaux-aquatiques-et-rapports/header-template/>

La Commission des animaux aquatiques a souligné que ce document, qui comporte les justifications scientifiques permettant de déterminer les produits issus d'animaux aquatiques considérés comme étant dénués de risques, constitue une ressource précieuse pour les Autorités vétérinaires et les autres Autorités compétentes responsables de la certification des produits issus d'animaux aquatiques faisant l'objet d'échanges commerciaux internationaux.

**F. MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES  
– EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES  
ET DES TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS**

**Point 16 Infection par le virus de la tête jaune (chapitre 2.2.8.)**

Les commentaires adressés à la Commission des animaux aquatiques ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. pop. de), le Taipei chinois, l'UE, le Japon, la Norvège, la Malaisie, le Mexique, la Suisse, la Thaïlande et les États-Unis d'Amérique.

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

La Commission des animaux aquatiques a amendé le nom de la maladie figurant dans plusieurs articles afin qu'il soit en ligne avec le titre du chapitre, qui inclut le « génotype 1 ».

En réponse à la suggestion d'un État membre d'élargir le champ d'application du chapitre afin d'y inclure tous les génotypes du virus de la tête jaune, la Commission des animaux aquatiques a rappelé aux États membres que le champ d'application de ce chapitre n'avait pas changé et qu'il incluait uniquement le génotype 1 du virus de la tête jaune, agent pathogène responsable de la maladie de la tête jaune. Les révisions proposées sont destinées à rendre explicite le champ d'application et à assurer la cohérence de l'ensemble du chapitre.

En raison d'une publication récemment parue, un État membre a suggéré que soit incluse, comme espèce sensible à l'infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune, l'écrevisse *Cherax quadricarinatus*. La Commission des animaux aquatiques a consulté le groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE. Le groupe ad hoc a conclu que cette espèce ne satisfaisait pas aux critères d'évaluation de la sensibilité (tels que décrits à l'article 1.5.7.) en raison de l'insuffisance de preuves de l'infection chez cette espèce. Le groupe ad hoc a recommandé que cette espèce soit incluse au paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.8. du *Manuel aquatique* relatif aux espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont insuffisantes.

La Commission des animaux aquatiques a consulté l'expert de l'infection par le virus de la tête jaune sur un certain nombre de commentaires d'ordre technique et amendé le texte en conséquence.

En réponse à un État membre proposant d'améliorer la définition de cas, la Commission des animaux aquatiques a demandé que le nouveau groupe ad hoc sur le *Manuel aquatique*, dont la réunion se tiendra en avril 2016, traite ce point.

La version révisée du chapitre 2.2.8. est présentée en annexe 9 et sera proposée à l'adoption lors de la 84<sup>e</sup> Session générale en mai 2016.

**Point 17 Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau projet de chapitre 2.2.X.)**

La Commission des animaux aquatiques a examiné le nouveau projet de chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau projet de chapitre 2.2.X.), amendé par un groupe ad hoc ayant travaillé par voie électronique, qui a pris en compte le nombre important de commentaires adressés par les États membres. La Commission a remercié les membres de ce groupe ad hoc pour le travail substantiel fourni pour ce chapitre.

En raison du nombre très important d'amendements apportés à ce chapitre depuis sa communication aux États membres en mars 2015, seule une version exempte du suivi des modifications a été fournie dans le présent rapport.

La version révisée du chapitre 2.2.X. sur la « Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe » est présentée en annexe 22 aux États membres à titre informatif.

**Point 18 Rapport du groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE**

La Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe ad hoc et pris note que l'application des nouveaux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à l'infection par un agent pathogène spécifique (tels que décrits au chapitre 1.5.) avait eu pour conséquence la modification du paragraphe 2.2. sur les facteurs propres à l'hôte des chapitres du *Manuel aquatique* traitant des maladies suivantes :

- la peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) (chapitre 2.2.1.) ;
- la nécrose hypodermique et hématoïétique infectieuse (chapitre 2.2.2.) ;
- la myonécrose infectieuse (chapitre 2.2.3.) ;
- l'hépatopancréatite nécrosante (chapitre 2.2.4.) ;
- le syndrome de Taura ;
- l'infection par le virus du syndrome des points blancs (chapitre 2.2.7.), et
- la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (nouveau projet de chapitre X.X.X.) (voir également point 17).

La Commission des animaux aquatiques a rappelé que les amendements proposés pour les chapitres du *Manuel aquatique* avaient été soumis aux experts des Laboratoires de référence respectivement concernés par ces chapitres afin qu'ils révisent le paragraphe 2.2. au regard des recommandations figurant dans le rapport du groupe ad hoc.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les recommandations du groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par les maladies listées par l'OIE ainsi que les commentaires des experts des Laboratoire de référence concernés et amendé en conséquence les chapitres traitant des maladies des crustacés correspondants.

La Commission a modifié l'article 2.2.2. du chapitre sur la peste de l'écrevisse afin d'indiquer qu'il était probable que d'autres espèces, n'ayant pas encore été testées ou naturellement exposées à *A. astaci*, puissent satisfaire à certains voire à tous les critères d'évaluation de la sensibilité.

En outre, la Commission des animaux aquatiques :

- a amendé le paragraphe 1 sur le champ d'application afin que son contenu soit en ligne avec celui du chapitre correspondant du *Code aquatique* ;
- a amendé le titre et le texte du chapitre en conformité avec la convention de dénomination « Infection par l'agent pathogène X ».
- a supprimé les références dans les paragraphes 2.2.1. et 2.2.2.

Le rapport du groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE est présentée en annexe 30 aux États membres à titre informatif.

Les versions révisées du chapitre 2.2.1. « Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) », du chapitre 2.2.2. « Nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse », du chapitre 2.2.3. « Myonécrose infectieuse », du chapitre 2.2.4. « Hépatopancréatite nécrosante », du chapitre 2.2.5. « Syndrome de Taura » et du chapitre 2.2.7. « Maladie des queues blanches » sont présentées en annexes 23 à 28 aux États membres afin qu'ils les commentent.

## G. CENTRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE

### Point 19 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 pour le statut de Centre de référence de l'OIE :

Centre de référence de l'OIE pour l'infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante)

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; E-mail: fengjyu@u.arizona.edu Website: <http://acbs.cals.arizona.edu/aqua>

Expert référent désigné: Dr Kathy Tang-Nelson.

### Point 20 Retrait du statut de Laboratoire de référence de l'OIE

La Commission a pris en compte la demande du Laboratoire de référence de l'OIE pour l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau, situé dans l'Université nationale de Taiwan, dans le Taipei chinois, d'être retiré de la liste des Laboratoires de référence de l'OIE, suite au départ à la retraite de l'expert désigné, le Docteur Pen Heng Chang. La Commission a remercié le Docteur Chang pour sa précieuse contribution au travail de l'OIE pendant les huit dernières années.

### Point 21 Rapports d'activité annuels des Centres de référence pour l'année 2015 et autres points les concernant

Le Docteur Min-Kyung Park, du Service scientifique et technique de l'OIE, a participé à la réunion pour ce point de l'ordre du jour. Le Docteur Park a présenté une analyse des activités réalisées à partir des rapports annuels soumis à l'OIE par les Centres de référence pour les animaux aquatiques. Le 16 février 2016, 40 des 41 Laboratoires de référence et un des deux Centres collaborateurs avaient soumis leur rapport annuel à l'OIE.

La Commission des animaux aquatiques a vivement remercié les Centres de référence de l'OIE pour leur soutien et leur expertise. La Commission s'est réjouie de l'augmentation du nombre de Laboratoires de référence de l'OIE ayant un système de gestion de la qualité reconnu internationalement. En référence à la recommandation formulée lors de la troisième Conférence mondiale des Centres de référence de l'OIE, à savoir que « *Les Centres de référence de l'OIE obtiennent ou conservent leur accréditation selon la norme ISO 17025 ou tout autre système de gestion de la qualité équivalent pour leur laboratoires de diagnostic* », la Commission a souligné que la date d'échéance pour la mise en place de ces systèmes approchait rapidement (fin décembre 2017). La Commission a convenu qu'il était nécessaire d'élaborer une procédure de vérification et de gestion des Laboratoires de référence ne respectant pas cette exigence à la date d'échéance.

La Commission des animaux aquatiques a également été informée de certaines discussions et résultats de la récente réunion de la Commission des normes biologiques. La Commission des animaux aquatiques a approuvé la recommandation de la Commission des normes biologiques selon laquelle les candidatures pour devenir Laboratoire de référence de l'OIE devaient être soumises au moins 45 jours avant une réunion de la Commission des animaux aquatiques pour pouvoir être étudiées lors de cette réunion. Ce délai est nécessaire au personnel du Siège pour présélectionner, traduire si nécessaire et traiter les dossiers ainsi qu'à la Commission concernée pour pouvoir examiner en détail les candidatures préalablement à la tenue de la réunion.

La Commission des animaux aquatiques a également approuvé que soient pris en considération, préalablement à l'évaluation de la performance des laboratoires, les deux points critiques suivants: i) le rapport annuel du laboratoire et ii) les progrès accomplis pour l'obtention de l'accréditation selon l'ISO 17025 ou tout système de gestion de la qualité équivalent. La Commission a convenu de recommander le retrait de la liste des Laboratoires de référence de l'OIE de tout laboratoire ne respectant pas les exigences spécifiées dans les Termes de référence pour ces deux points.

La Commission des animaux aquatiques a souligné l'importance de sa collaboration avec la Commission des normes biologiques sur certaines questions d'intérêt commun et a fait part de son intention de renforcer les relations de travail entre les deux Commissions. La Commission des animaux aquatiques a demandé que le Siège de l'OIE organise une téléconférence afin que les Présidents des deux Commissions puissent discuter des points d'intérêt à l'ordre du jour, avant la tenue de la réunion de leur Commission respective.

#### **Point 22 Point sur les activités de l'OIE dans le domaine de la résistance aux agents antimicrobiens**

Le Docteur Elisabeth Erlacher-Vindel, adjointe au Chef du Service scientifique et technique, a informé la Commission des animaux aquatiques des activités de l'OIE dans le domaine de la résistance aux agents antimicrobiens, notamment le travail en cours du groupe ad hoc de l'OIE sur la résistance aux agents antimicrobiens. La Commission des animaux aquatiques a convenu de suivre les travaux de l'OIE sur ce sujet important et d'actualiser les *Code et Manuel aquatiques*, le cas échéant.

### **H. PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES POUR 2016 - 2017**

La Commission des animaux aquatiques a passé en revue et actualisé son plan de travail, en tenant compte des commentaires des États membres, des commentaires du Siège et du travail accompli. Le plan de travail inclut de nouvelles activités d'importance telles que la restructuration du Titre 4, considérée comme prioritaire.

Le plan de travail est présenté en annexe 31 aux États membres à titre informatif.

#### **I. ACTIVITÉS DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES**

La Commission des animaux aquatiques a estimé qu'il était important qu'elle informe les États membres des activités exercées par les membres de la Commission en tant que membre de la Commission.

Depuis octobre 2015, les membres de la Commission ont participé aux activités suivantes:

Le Docteur Ingo Ernst a été invité à participer à la 14<sup>e</sup> réunion du Comité consultatif sur la santé des animaux aquatiques qui a été organisée par le Réseau de centres d'aquaculture dans la région Asie-Pacifique à Bangkok, du 23 au 25 novembre 2015. Les détails de la réunion sont présentés au point 24 ci-après.

Le Docteur Edmund Peeler a été invité à participer à la réunion du groupe de travail d'experts de la Commission européenne à Bruxelles (8 décembre 2015) afin de coordonner la réponse de l'UE sur le rapport de la Commission des animaux aquatiques d'octobre 2015. Le Docteur Peeler a fourni des informations générales sur le rapport et a répondu aux questions. Il a également détaillé le futur plan de travail de la Commission.

Le Docteur Alicia Gallardo et le Docteur Joanne Constantine ont été invitées à participer à la réunion de la Commission régionale pour les Amériques (en décembre 2015) afin de discuter du rapport d'octobre 2015 de la Commission des animaux aquatiques. Elles ont présenté une synthèse du rapport, discuté des possibles amendements au texte ayant été communiqué pour avis ainsi que présenté le plan de travail de la Commission.

#### **J. COLLABORATION**

#### **Point 23 Collaboration avec l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture**

Melba Reantaso, représentante de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), a participé à la réunion de la Commission des animaux aquatiques par téléconférence. Elle a fait un point sur les programmes de coopération techniques de la FAO présentant un intérêt pour la Commission, notamment ceux concernant la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, en Asie et en Amérique Latine, et le syndrome ulcératif épizootique, en Afrique.

Les membres de la Commission ont accueilli avec satisfaction ce point et ont souligné l'importance de la collaboration avec la FAO.

**Point 24 Collaboration avec le Réseau de centres d'aquaculture dans la région Asie-Pacifique**

Le Docteur Ernst a communiqué aux membres de la Commission un rapport sur la 14<sup>e</sup> réunion du Comité consultatif de la région Asie du Réseau de centres d'aquaculture dans la région Asie-Pacifique (NACA) sur la santé des animaux aquatiques, qui s'est tenue à Bangkok du 23 au 25 novembre 2015.

Le comité consultatif a été créé par NACA afin de conseiller les membres de NACA sur la gestion de la santé des animaux aquatiques. Plus particulièrement, le Comité apprécie l'évolution des maladies ainsi que les menaces émergentes, suit le développement de normes internationales en matière de lutte contre les maladies des animaux aquatiques importantes pour la région, examine le programme régional de déclaration des maladies des animaux aquatiques, fournit des orientations et joue un rôle majeur dans les stratégies régionales d'amélioration de la gestion de la santé des animaux aquatiques. Parmi les membres du Comité consultatif figurent des experts des maladies aquatiques ainsi que des représentants de l'OIE, de la FAO et des organisations régionales collaboratrices.

Le Docteur Ernst a présenté au Comité consultatif les normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE adoptées lors de la 83<sup>e</sup> Session générale de l'OIE en mai 2015 ainsi que les résultats de la réunion d'octobre 2015 de la Commission des animaux aquatiques. Les rapports de réunion du Comité consultatif sont disponibles sur le site Internet de NACA ([www.enaca.org](http://www.enaca.org)).

**K. PROCHAINES RÉUNIONS**

Les prochaines réunions de la Commission des animaux aquatiques se tiendront du 12 au 16 septembre (inclus) 2016 inclus et du 20 au 24 février (inclus) 2017.

---

.../Annexes



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

**Paris, 15 - 19 février 2016**

**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  
18 Marcus Clarke Street  
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@cefas.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

**SIÈGE DE L'OIE**

---

**Dr Derek Belton**

Chef de Service  
Service du commerce international de l'OIE  
Mèl. : d.belton@oie.int

**Ms Sara Linnane**

Secrétaire de rédaction scientifique  
Service scientifique et technique de l'OIE  
Mèl. : s.linnane@oie.int

**Dr Gillian Mylrea**

Adjointe au Chef de service  
Service du commerce international de  
l'OIE  
Mèl. : g.mylrea@oie.int



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

**Paris, 15 - 19 février 2016**

—————  
**Ordre du jour adopté**

- A) RÉUNION AVEC LA DIRECTRICE GÉNÉRALE**
- B) ADOPTION DE L'ORDRE DU JOUR**
- C) RÉUNION AVEC LE PRÉSIDENT DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX TERRESTRES**
- D) EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES ET DES TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS**
  - 1) Commentaires d'ordre général
  - 2) Glossaire
  - 3) Projet d'amendements des articles 1.4.8., 1.5.2., 2.1.4., 4.2.3. et 4.6.3. comme conséquence de la définition proposée pour le terme « vecteur »
  - 4) Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques (chapitre 1.1.)
  - 5) Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE (chapitre 1.2.)
  - 6) Maladies listées par l'OIE (chapitre 1.3.)
    - 6.1. Évaluation de l'infection à *Marteilia cochilia* au regard des critères d'inclusion dans la liste de l'OIE
    - 6.2. Évaluation de l'infection à *Batrachochytrium salamandrivorans* au regard des critères d'inclusion dans la liste de l'OIE
    - 6.3. Infection à *Ranavirus*
  - 7) Recommandations générales sur la désinfection (chapitre 4.3.)
  - 8) Proposition de restructuration du Titre 4 – Prévention et contrôle des maladies
  - 9) Obligations générales liées à la certification (chapitre 5.1.)
  - 10) Infection par le virus de la tête jaune (chapitre 9.2.)
  - 11) Nouveau chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe (chapitre 9.X.)
  - 12) Version révisée de l'article X.X.8.
  - 13) Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE
  - 14) Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés (chapitre 4.4.)

Annexe 2 (suite)**E) AUTRES POINTS CONCERNANT AVEC LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES**

15) Document répertoriant les évaluations réalisées en matière de sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques

**F) MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES – EXAMEN DES COMMENTAIRES DES ÉTATS MEMBRES ET DES TRAVAUX DES GROUPES AD HOC CONCERNÉS**

16) Examen des commentaires des États membres sur le chapitre 2.2.8. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune »

17) Révision du projet de chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe

18) Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies listées par l'OIE

**G) CENTRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE**

19) Candidatures au statut de Centre de référence de l'OIE ou changements d'expert

20) Retrait du statut de Laboratoire de référence de l'OIE

21) Rapports d'activité annuels des Centres de référence pour l'année 2015 et autres points les concernant

22) Le point sur les activités de l'OIE dans le domaine de la résistance aux agents antimicrobiens

**H) PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES POUR 2016 – 2017****I) ACTIVITÉS DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES****J) COLLABORATION**

23) Collaboration avec l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)

24) Collaboration avec le Réseau de centres d'aquaculture dans la région Asie-Pacifique (NACA)

**K) PROCHAINES RÉUNIONS**

## GLOSSAIRE (PARTIE A)

Aux fins du présent *Code aquatique* :

### VECTEUR

désigne tout organisme vivant porteur d'un agent infectieux pathogène qu'il transmet à un individu animal aquatique sensible, aux aliments qu'il consomme ou à son environnement immédiat. Cet agent infectieux pathogène peut ou non passer par un cycle de développement au sein du vecteur.

### VIDE SANITAIRE

désigne l'opération de prophylaxie zoosanitaire consistant à vider un *établissement d'aquaculture* des *animaux aquatiques* sensibles à une *maladie* déterminée ou des *animaux aquatiques* dont on sait qu'ils sont capables de transférer l'*agent pathogène* en cause, et, chaque fois que cela est réalisable, à vidanger l'eau. Dans le cas des *animaux aquatiques* de sensibilité inconnue et de ceux dont on sait qu'ils sont capables de jouer le rôle de ~~porteurs~~ vecteurs d'une *maladie* déterminée, les décisions relatives à la mise en place d'un *vide sanitaire* doivent être fondées sur une *appréciation du risque* encouru.

---

-----

— Texte supprimé.



**PROPOSITION DE RÉVISION DES ARTICLES 1.4.8., 1.5.2., 2.1.4., 4.2.3. ET 4.6.3. AFIN DE PRENDRE EN COMPTE LA MODIFICATION DE LA DÉFINITION DU TERME « VECTEUR ».**

CHAPITRE 1.4.

**SURVEILLANCE DE LA SANTÉ  
DES ANIMAUX AQUATIQUES**

[..]

Article 1.4.8.

Aussi, l'unité épidémiologique doit-elle être choisie en prenant en compte des facteurs tels que ~~les porteurs~~, les réservoirs, les vecteurs, le statut immunitaire et les résistances génétiques, mais aussi l'âge, le sexe et autres caractéristiques de l'hôte.

[..]

-----  
— Texte supprimé.

CHAPITRE 1.5.

**CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA LISTE  
DES ESPÈCES SENSIBLES À UNE INFECTION  
PAR UN AGENT PATHOGÈNE SPÉCIFIQUE**

[...]

Article 1.5.2.

**Champ d'application**

La sensibilité à une *infection* ne se traduit pas nécessairement par des manifestations cliniques. Toutefois, les ~~vecteurs mécaniques~~ (c'est-à-dire les espèces pouvant être porteuses de l'*agent pathogène* sans que ce dernier ne se multiplie) ne doivent pas être considérés comme appartenant aux *espèces sensibles*.

[...]

-----  
— Texte supprimé.

## CHAPITRE 2.1.

## ANALYSE DES RISQUES À L'IMPORTATION

[..]

Article 2.1.4.

[..]

2. Appréciation de l'exposition

## b) Facteurs liés au pays

- Présence de vecteurs ou d'hôtes intermédiaires potentiels ;
- Facteurs démographiques propres aux *animaux aquatiques* (présence d'*espèces sensibles* ou *réservoirs connus reconnues comme sensibles* et distribution) ;

[..]

-----

— Texte supprimé.

## CHAPITRE 4.2.

## APPLICATION DE LA COMPARTIMENTATION

[...]

Article 4.2.3.

[...]

2. Facteurs liés aux infrastructures

Les facteurs liés aux infrastructures de l'*établissement* ou des *établissements* composant un *compartiment* contribuent à l'efficacité de leur *sécurité biologique*. Il convient de prendre en compte les éléments ci-après :

- a) approvisionnement en eau ;
- b) moyens efficaces de séparer physiquement les *animaux aquatiques* ;
- c) installations pour l'entrée des personnes, y compris le contrôle d'accès ;
- d) accès aux *véhicules* et aux navires, y compris opérations de nettoyage et de *désinfection* ;
- e) installations réservées aux opérations de déchargement et de chargement ;
- f) installations d'isolement pour les *animaux aquatiques* introduits ;
- g) procédures d'introduction du matériel et de l'équipement ;
- h) infrastructures réservées à l'entreposage des *aliments pour animaux* et des produits à usage vétérinaire ;
- i) élimination des déchets d'*animaux aquatiques* ;
- j) mesures destinées à prévenir l'exposition à des objets inanimés contaminés ou à des vecteurs ~~mécaniques~~ *ou biologiques* ;
- k) approvisionnement en *aliments pour animaux* / source d'approvisionnement.

-----

— Texte supprimé.

CHAPITRE 4.6.

**VIDE SANITAIRE EN AQUACULTURE**

[..]

Article 4.6.3.

**Paramètres techniques pour la mise en œuvre d'un plan réglementaire de vide sanitaire**

La mise en place d'un *vide sanitaire* dans une exploitation doit commencer immédiatement après :

- 1) le retrait de toutes les espèces d'*animaux aquatiques sensibles* à la *maladie* considérée, et
- 2) le retrait de toutes les espèces capables de jouer le rôle de ~~porteurs~~ vecteurs de la *maladie* considérée, et

[..]

---

-----

— Texte supprimé.



## CHAPITRE 1.1.

## NOTIFICATION DES MALADIES ET COMMUNICATION DES INFORMATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

## Article 1.1.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique* et conformément aux dispositions des articles 5, 9 et 10 des Statuts organiques de l'OIE, ~~tout État membre reconnaît au~~ les États membres reconnaissent au *Siège* le droit de communiquer directement avec l'*Autorité compétente* de son ou de ses *territoires*.

Toute *notification* ou toute information envoyée par l'OIE à l'*Autorité compétente* est considérée comme ayant été envoyée à l'État dont elle relève et toute *notification* ou toute information envoyée à l'OIE par l'*Autorité compétente* est considérée comme ayant été envoyée par l'État dont elle relève.

## Article 1.1.2.

- 1) Les États membres mettront à la disposition des autres États membres, par l'intermédiaire de l'OIE, toute information nécessaire pour enrayer la propagation des *maladies* importantes des *animaux aquatiques* et de leurs *agents pathogènes*, et permettre un meilleur contrôle de ces *maladies* au plan mondial.
- 2) À cet effet, les États membres appliqueront les obligations de *notification* prévues aux articles 1.1.3. et 1.1.4.
- 3) Aux fins du présent chapitre, un « événement » désigne un foyer unique ou un groupe de foyers épidémiologiquement liés de la maladie faisant l'objet de la notification. Un événement est spécifique d'un agent pathogène et d'une souche, lorsque cela est approprié, et inclut tous les foyers liés déclarés depuis la première notification jusqu'à l'édition du rapport final. Les rapports sur l'événement incluent les espèces sensibles, le nombre et la distribution des animaux aquatiques et des unités épidémiologiques affectés.
- 34) Pour la clarté et la concision de l'information transmise à l'OIE, les États membres devront se conformer aussi exactement que possible au modèle ~~officiel~~ de déclaration des *maladies* à l'OIE.
- 4-5) La détection d'un *agent pathogène* responsable d'une *maladie listée* chez un *animal aquatique* doit être notifiée sans nécessairement qu'il y ait manifestation clinique de la *maladie*. Considérant que les connaissances scientifiques sur la relation entre *agents pathogènes* et *maladies* cliniques sont en constant développement et que la présence d'un agent infectieux n'implique pas nécessairement la présence clinique d'une *maladie*, les États membres feront en sorte, dans leurs rapports, de se conformer à l'esprit et à l'objet du point 1 ci-dessus.
- 5 6) Outre les *notifications* adressées en application des articles 1.1.3. et 1.1.4., les États membres fourniront également des informations sur les mesures prises pour prévenir la propagation des *maladies*. Ces informations comporteront des mesures de *quarantaine* et de restrictions appliquées à la circulation des *animaux aquatiques*, des *produits issus d'animaux aquatiques*, des *produits biologiques* et objets divers qui, par leur nature, pourraient être responsables de la transmission de *maladies*. S'agissant des *maladies* transmises par des vecteurs, les mesures prises contre ces derniers seront également précisées.

## Article 1.1.3.

Sous la responsabilité du Délégué, l'*Autorité compétente* doit adresser au *Siège* :

Annexe 5 (suite)

- 1) en application des dispositions pertinentes des chapitres traitant spécifiquement de *maladies* et dans un délai de 24 heures, une *notification* à travers le Système mondial d'information zoonitaire (WAHIS) ou par télécopie ou courrier électronique dans le cas de la survenue d'un des événements ci-après dessous :
  - a) la première apparition d'une *maladie listée* dans un pays, une *zone* ou un *compartiment* ;
  - b) la réapparition, dans un pays, une *zone* ou un *compartiment*, d'une *maladie listée* postérieurement au rapport final faisant état de l'extinction du *foyer* de ladite *maladie* ;
  - c) la première apparition, dans un pays, une *zone* ou un *compartiment*, d'une nouvelle souche d'un *agent pathogène* responsable d'une *maladie listée* ;
  - d) de façon soudaine et inattendue, un changement dans la distribution ou une augmentation de l'incidence, de la virulence, de la morbidité ou de la mortalité liée à l'*agent pathogène* responsable d'une *maladie listée* dans un pays, une *zone* ou un *compartiment* ;
  - e) l'apparition d'une *maladie listée* chez une nouvelle espèce hôte.

~~pour décider si des observations justifient une notification immédiate (dans un délai de 24 heures), les États membres doivent être guidés par le souci de se conformer aux obligations définies dans les chapitres 5.1. et 5.2. (en particulier l'article 5.1.1.) concernant les développements sanitaires risquant d'avoir des répercussions sur les échanges internationaux ;~~

- 2) des rapports hebdomadaires en réponse à une *notification* effectuée en application du point 1 ci-dessus, donnant des informations complémentaires sur l'évolution de l'événement ayant justifié la *notification* ; l'envoi de rapports hebdomadaires se poursuivra jusqu'à ce que la *maladie* soit éradiquée ou que la situation se soit suffisamment stabilisée pour que l'État membre puisse satisfaire à ses obligations en faisant parvenir à l'OIE des rapports semestriels en application des dispositions du point 3 ci-dessous ; pour tout événement notifié, un rapport final ~~relatif à l'événement~~ sera fourni ;
- 3) des rapports semestriels sur l'absence ou la présence et l'évolution des *maladies listées* et sur les éléments d'information qui ont une signification épidémiologique pour les autres États membres ;
- 4) des rapports annuels concernant toute autre information importante pour les autres États membres.

Article 1.1.4.

Sous la responsabilité du Délégué, les *Autorités compétentes* doivent adresser au *Siège* :

- 1) une *notification* à travers l'application WAHIS, ou par télécopie ou courrier électronique, lorsqu'un événement d'une maladie émergente est détectée apparaît dans un pays, une *zone* ou un *compartiment* ;
- 2) ~~l'envoi~~ des rapports périodiques faisant suite à la *notification* d'une *maladie émergente* ~~adressée en application du point 1 ci-dessus ; l'envoi de ces rapports doit se poursuivre jusqu'à :~~
  - a) pendant le temps nécessaire à établir, avec une certitude raisonnable, que :
    - bi) ee que la *maladie* ait été éradiquée, ou
    - eii) que sa situation ~~soit suffisamment stabilisée est stable, ou~~

OU

- b) jusqu'à ce que des informations scientifiques suffisantes permettent de déterminer si elle répond aux critères d'inclusion dans la liste de l'OIE tels que décrits au chapitre 1.2.
- 3) un rapport final une fois les exigences énoncées au point 2) a) ou b) satisfaites.

## Article 1.1.5.

- 1) L'*Autorité compétente* d'un pays comptant une *zone* ou un *compartiment* infecté avise le *Siège* dès que ce pays, cette zone ou ce compartiment est libéré de la maladie aura recouvré le statut indemne de maladie.
- 2) ~~Un *compartiment* infecté ou une *zone* infectée d'une *maladie* déterminée ne sera considéré comme indemne qu'au terme d'un délai supérieur à la période d'infectiosité indiquée dans le *Code aquatique*, après le dernier cas de *maladie* déclaré, et une fois que toutes les mesures de contrôle et les mesures zoosanitaires appropriées auront été prises pour prévenir sa réapparition ou sa propagation. Ces mesures sont décrites en détail dans les différents chapitres du *Code aquatique* traitant spécifiquement de *maladies*.~~
- 2) 3) Un *État membre pays, une zone ou un compartiment* peut être considéré comme ayant recouvré le statut indemne d'une *maladie* déterminée s'il remplit toutes les conditions requises dans le *Code aquatique*.
- 3) 4) L'*Autorité compétente* d'un *État membre* qui a établi une ou plusieurs *zones indemnes* ou un ou plusieurs *compartiments indemnes*, en informera le *Siège* en donnant les détails nécessaires, parmi lesquels doivent notamment figurer les critères sur lesquels repose le statut de territoire indemne et les conditions pour le maintien de ce statut, en indiquant clairement l'emplacement desdites *zones* et desdits *compartiments* sur une carte du territoire de l'*État membre*.

## Article 1.1.6.

- 1) Bien qu'ils soient tenus de notifier seulement les *maladies listées* et les *maladies émergentes*, les *États membres* sont encouragés à informer communiquer à l'OIE toute autre information importante relative à la santé des animaux aquatiques. tout autre événement zoosanitaire important.
- 2) Le *Siège* transmettra aux *Autorités compétentes* toutes les *notifications* reçues par courrier électronique ou à travers l'interface du système mondial d'information sanitaire la base mondiale d'information zoosanitaire (WAHID WAHIS) conformément aux articles 1.1.2. à 1.1.5., ainsi que d'autres informations jugées pertinentes.

[..]

---

-----

— 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 de ~~prévenir~~ empêcher l'introduction 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 ~~utilisé~~ dans le cadre des opérations courantes en matière de sécurité biologique et de réponse aux urgences sanitaires. Des orientations sur les principes généraux, la planification et la mise en place des opérations de *désinfection* sont fournies.

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 ~~communément~~ 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 prévenir 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 ~~le risque d'introduction~~ leur transmission plutôt qu'en tentant de gérer leur présence au moyen de la *désinfection*. Par exemple, ~~lorsque~~ les pièces d'équipement ~~présentent un risque élevé et sont~~ difficiles à désinfecter (par exemple, les gants, l'équipement de plongée et de récupération, les cordes et les filets), ~~il est nécessaire de réserver leur utilisation~~ doivent être dédiées à un site spécifique plutôt que ~~de les désinfecter et les déplacer~~ 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 de détruire ou d'inactiver les *agents pathogènes* visés. 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* ~~ou leur contrôle~~. 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 aux 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.

## Annexe 6 (suite)

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 doit systématiquement précéder l'application des *désinfectants*. 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. ~~Les déchets générés lors de cette étape doivent être détruits selon une méthode sûre, car ils peuvent contenir des agents pathogènes viables et susceptibles de propager l'infection s'ils ne sont pas maîtrisés.~~ À l'issue de la procédure de nettoyage, l'excédent d'eau doit être drainé avant toute application d'un *désinfectant*.

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-visé*.

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, ~~tels que (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 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 l'addition des 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 utilisateurs 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 risques liés aux voies d'introduction, 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 et 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. 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 du risque relatif 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 inclure il doit être procédé à une évaluation des matériaux de fabrication utilisés, de la porosité des leurs surfaces, de l'accès aux zones et de la 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 repose 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'eau, d'*animaux aquatiques* 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.

## Annexe 6 (suite)

Dans le cadre d'une réponse à une situation d'urgence sanitaire, il peut être préférable d'éviter les risques liés aux voies d'introduction d'empêcher la transmission plutôt que de s'appuyer sur la *désinfection*. L'équipement ne doit pas sortir d'un local établissement d'aquaculture infecté sauf si une *désinfection* efficace y a été effectuée. Dans certaines circonstances, la destruction de l'équipement ou du matériel présentant un risque élevé sera requise, difficile à désinfecter ou présentant une forte probabilité de contamination pourra être détruit, dans des conditions de sécurité biologique adéquates, plutôt que désinfecté, de façon à inactiver l'agent pathogène (par exemple, l'incinération).

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.

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 (alcalis et acides)

Les modificateurs de pH sont des composés alcalins ou acides utilisés afin de modifier le pH de l'environnement. Ils présentent comme avantage de ne pas être inactivés par la matière organique et donc de pouvoir 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 formol-formaldéhyde peut également être utilisé sous forme de pulvérisation (solution liquide) ou de fumigation (gaz) afin de produire une fumigation de formaldéhyde gazeux.

#### 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 comme désinfectants pour les personnes 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

~~L'efficacité d'un traitement thermique dépend du couple temps-température choisi.~~ 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 ~~du séchage~~ 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.

## Annexe 6 (suite)

## 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'établissement 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 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. La mise en culture Le raclement, le labourage ou le dallage des fonds des bassins sans revêtement facilitera également l'incorporation de la chaux et l'assèchement.

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. Préalablement à la désinfection, l'eau des cuves doit être vidangée. 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 brossage 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.

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 qu'elle soit efficace, la désinfection du système de tuyauterie nécessite l'élimination du biofilm, puis l'évacuation des particules en suspension générées et, enfin, 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. En raison de la difficulté technique à désinfecter des filets de grande taille et de leur contact étroit avec les populations de poissons, ils sont considérés comme étant des pièces d'équipement à risque élevé, dont l'utilisation doit être réservée à un unique établissement d'aquaculture ou zone. 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.

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. 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 épuisettes 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

Le risque associé à l'utilisation 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 présentant un risque élevé, telles que la surface interne des *conteneurs*, des tuyaux, de l'eau de transport et des déchets. L'utilisation 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*.

#### 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 *conteneur* désigne aussi bien les simples bacs en plastique, utilisés pour le transport des *produits issus des 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) 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 fomites potentielles, 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 pompe, 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.

## Annexe 6 (suite)

### 8. Bateaux

Tous les bateaux doivent être fréquemment désinfectés afin d'éviter 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 un risque élevé 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 à risque élevé 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. ~~Lorsqu'il existe un risque de propagation de l'agent pathogène, les~~ Les effluents contaminés des bateaux à vivier doivent être désinfectés préalablement à leur rejet (voir article 4.3.10.).

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 mécanique et de fomites ou d'hôtes intermédiaires, 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. 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. ~~Tous les filtres doivent être retirés et désinfectés séparément.~~

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. Équipement de l'élevage

Dans les *établissements d'aquaculture* sont usuellement présents des pièces d'équipement qui sont en contact étroit avec les *animaux aquatiques* et qui agissent potentiellement comme des fomites (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. 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 risque de contamination associé 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 ~~résistante~~ non inactivée par à la matière organique ainsi que son renouvellement régulier.

Les équipements hautement contaminés ~~présentant un risque élevé~~, tels que les équipements de plongée, nécessitent une attention particulière, ~~car ils peuvent être exposés à des niveaux extrêmement importants de matériel contaminé~~ et ils sont souvent sensibles ~~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 de l'eau du flux d'eau entrant et des effluents* ~~comme mesure générale de sécurité biologique appliquée au flux d'eau entrant, afin de prévenir l'introduction des agents pathogènes visés, ou pour les éliminer~~ les agents pathogènes des effluents. 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 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* importés dans des délais acceptables après leur importation, l'*Autorité compétente* du *pays exportateur* doit être avertie pour lui permettre 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 importateur* doit être informée du résultat de l'enquête, car l'origine de l'*infection* peut ne pas être dans le *pays exportateur*.~~
- 3) 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* 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*.
- 4) 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 9.2.

## 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. Ce virus est classé parmi les espèces 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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre 1.5. : la crevette géante tigrée géante (*Penaeus monodon*), la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*), la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), la crevette *Palaemonetes pugio* et la crevette Jinga (*Metapenaeus affinis*) à la crevette tigrée géante (*Penaeus monodon*), à la crevette tigrée brune (*P. esculentus*) et à la crevette Kuruma (*P. japonicus*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

## Article 9.2.3.

**Importation 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 d'infection par le virus de la tête jaune et du statut 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* 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant au moins 15 minutes 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 au moins dix minutes 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 ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.2.2. autres que ceux énumérés au point 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 8 (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 9.2.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un *risque en termes de propagation de l'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* (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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la mais les conditions ci-après 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 le génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été détectée ;

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* mais les conditions ci-après sont réunies :

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible le *risque la probabilité* de nouvelle 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 la *maladie*, 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 le génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été détectée.

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

## Article 9.2.5.

**Compartment 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* de ce du pays concerné ou par l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées 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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 le génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été détectée ;

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 d'une telle *infection* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible le risque la probabilité de nouvelle 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 la *maladie*, 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 le génotype 1 du virus de la tête jaune n'ait été détectée.

## Annexe 8 (suite)

## Article 9.2.6.

**Maintien du statut indemne d'infection par le 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 sous les points 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*, 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 sous le point 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 propices à l'expression clinique des *infections* 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 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 9.2.7.

**Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.2.2. 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*, et attestant 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 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.

Ce *certificat* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 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 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* :
  - 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 le génotype 1 du virus de la tête jaune.
- 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 du génotype 1 du virus de la tête jaune et celle de parasites et d'évaluer l'état de santé et le statut sanitaire de la population ;
  - d) importer une population de géniteurs et la mettre en *quarantaine* dans une installation sécurisée (F-0) ;
  - 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'infection par le 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 **d'infection par le 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 d'*infection* par le génotype 1 du virus de la tête jaune ou indemne de l'agent pathogène spécifique de cette *infection* ;
  - 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 9.2.3.

#### Article 9.2.9.

#### **Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des 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 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.2.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.2.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.2.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.2.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et

Annexe 8 (suite)

- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver le génotype 1 du virus de la tête jaune.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 1 de l'article 9.2.3.

## Article 9.2.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 d'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* 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* susvisé 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 espèces visées à l'article 9.2.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 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 *marchandise* susvisé et appliquer des mesures appropriées visant à réduire ce *risque*.

---

-----

— Texte supprimé.

## CHAPTER 2.2.8.

## INFECTION WITH YELLOW HEAD VIRUS GENOTYPE 1

---

### 1. Scope

For the purpose of this chapter, Infection with yellow head virus genotype 1 disease (YHD) means is considered to be infection with yellow head virus genotype 1 (YHV1) of YHV is classified as a species in the genus *Okavirus*, Family *Roniviridae* and Order *Nidovirales*.

### 2. Disease information

#### 2.1. Agent factors

##### 2.1.1. Aetiological agent, agent strains

Yellow head virus genotype 1 (YHV1) is one of ~~six~~ eight known genotypes in the yellow head complex of viruses and is the only known agent causing YHD. YHV1 and other genotypes in the yellow head complex are formally classified by the International Committee on Taxonomy of Viruses as a single species (*Gill-associated virus*) in the genus *Okavirus*, Family *Roniviridae*, Order *Nidovirales* (Cowley *et al.*, 2012). Yellow head virus genotype 2 is commonly known as gill-associated virus (GAV) is designated as genotype 2. GAV and Four other ~~known~~ genotypes in the complex (genotypes 3–6) occur commonly in healthy *Penaeus monodon* in East Africa, Asia and Australia and are rarely or never associated with disease (Walker *et al.*, 2001, Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). Recently, two new YHV-complex genotypes have been reported, one designated YHV7 was detected in diseased *P. monodon* in Australia (Mohr *et al.*, 2015) and an eighth genotype was detected in *Penaeus Fenneropenaeus Chinensis* suspected of suffering from acute hepatopancreatic necrosis disease (Liu *et al.*, 2014). There is evidence of genetic recombination between genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

YHV1 forms enveloped, rod-shaped particles 40–50 nm × 150–180 nm (Chantanachookin *et al.*, 1993; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Envelopes are studded with prominent peplomers projecting approximately 11 nm from the surface. Nucleocapsids appear as rods (diameter 20–30 nm) and possess a helical symmetry with a periodicity of 5–7 nm. Virions comprise three structural proteins (nucleoprotein p20 and envelope glycoproteins gp64 and gp116) and a ~26 kb positive-sense single-stranded RNA genome.

##### 2.1.2. Survival outside the host

YHV1 remains viable in aerated seawater for up to 72 hours (Flegel *et al.*, 1995b).

##### 2.1.3. Stability of the agent (effective inactivation methods)

YHV1 can be inactivated by heating at 60°C for 15 minutes (Flegel *et al.*, 1995b). Little information is available on other inactivation methods but the virus appears to be susceptible to treatment with chlorine at 30 parts per million (0.03 mg ml<sup>-1</sup>) (Flegel *et al.*, 1997).

##### 2.1.4. Life cycle

High multiplicity YHV1 infections in cell culture have not been reported. Infection at a multiplicity of infection of 0.001 in primary cultures of lymphoid organ cells has indicated that maximum viral titres are obtained 4 days post-infection (Assavalapsakul *et al.*, 2003). Clinical signs of infection with YHV1 YHD occur in *P. monodon* within 7–10 days of exposure. YHV1 replicates in the cytoplasm of infected cells in which long filamentous pre-nucleocapsids are abundant and virions bud into cytoplasmic vesicles in densely packed paracrystalline arrays for egress at the cytoplasmic membrane (Chantanachookin *et al.*, 1993).

## 2.2. Host factors

### 2.2.1. Susceptible host species

YHD outbreaks have been reported in the Species that fulfil the criteria for listing a species as susceptible to infection with YHV1 according to Chapter 1.5 of Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include black giant tiger prawn (*P. monodon*), and the white leg Pacific shrimp (*P. vannamei*) (Chantanachookin *et al.*, 1993; Senapin *et al.*, 2010). The Pacific blue shrimp prawn (*P. stylirostris*), the daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), and the Jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*), also fulfil the criteria required for listing a species susceptible to infection with YHV1 according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code*. Natural infections have also been detected in the kuruma prawn (*P. japonicus*), white banana prawn (*P. merguensis*), Pacific blue prawn (*P. stylirostris*), white prawn (*P. setiferus*), red endeavour prawn (*Metapenaeus ensis*), mysid shrimp (*Palaemon styliiferus*) and krill (*Acetes* sp.). Other species of penaeid and palaemonid shrimp and prawns and krill that have been reported to be susceptible to experimental infection include: brown tiger prawn (*P. esculentus*), brown prawn (*P. aztecus*); pink prawn, hopper and brown-spotted prawn (*P. duorarum*), greentail prawn (*Metapenaeus bonnettae*), Sunda river prawn (*Macrobrachium sintangense*), barred estuarine shrimp (*Palaemon serrifer*), the paste prawn (*Acetes* sp.) and the daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) (Ma *et al.*, 2009). There are variations in the susceptibility of different species to disease. Laboratory trials have shown that YHV can cause high mortality in *P. monodon*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*, *P. aztecus*, *P. duorarum*, *M. sintangense*, *P. styliiferus* and *P. serrifer* (Lightner *et al.*, 1998; Longyant *et al.*, 2005; 2006; Ma *et al.*, 2009). A survey of 16 crab species collected from the vicinity of shrimp farms in Thailand detected no evidence of either natural infection or experimental susceptibility (Longyant *et al.*, 2006). A critical review of susceptibility of crustaceans to yellow head disease and implications of inclusion in European legislation has been conducted (Stentiford *et al.*, 2009). GAV has been detected in *P. monodon* and *P. esculentus* (Walker *et al.*, 2001). To date, infections by other genotypes in the YHV complex have been detected only in *P. monodon* (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). *Metapenaeus brevicornis* and *P. aztecus* also fulfil some of the criteria required for listing as susceptible but evidence was lacking to either confirm the identity of the pathogen under study as YHV1, to

### 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 YHV1 according to Chapter 1.5 of the Aquatic Code include: Sunda river prawn (*Macrobrachium sintangense*), yellow shrimp (*Metapenaeus brevicornis*), Carpenter prawn (*Palaemon serrifer*), Pacific blue prawn (*Palaemon styliiferus*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), banana prawn (*Penaeus merguensis*) and northern white shrimp (*Penaeus setiferus*). Evidence is lacking for these species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is YHV1, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.

### 2.2.3.2. Susceptible stages of the host

*Penaeus monodon* are susceptible to YHV1 infection beyond PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Experimental infections with GAV indicate that larger (~20 g) *P. japonicus* are less susceptible to disease than smaller (~6-13 g) shrimp of the same species (Spann *et al.*, 2000).

### 2.2.4.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

YHV1 (genotype 4) infections are usually detected only when disease is evident and whilst they do not occur commonly in healthy *P. monodon*, infections have been detected in healthy wild populations of *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). During YHD outbreaks in aquaculture ponds, the YHV1 infection prevalence can be assumed to be high. Natural YHV1 infections have been detected in *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, and *P. styliiferus* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b), but there is little information available on the natural prevalence. Viruses in yellow head complex genotypes 2-6 are only known to occur commonly (prevalence up to 100%) in *P. monodon*, which appears to be the natural host (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a; 2009).

### 2.2.5.4. Target organs and infected tissue

YHV1 targets tissues of ectodermal and mesodermal origin including lymphoid organ, haemocytes, haematopoietic tissue, gill lamellae and spongy connective tissue of the subcutis, gut, antennal gland, gonads, nerve tracts and ganglia (Chantanachookin *et al.*, 1993; Lightner, 1996).

#### 2.2.6.5. Persistent infection with lifelong carriers

GAV persists as a chronic infection for at least 50 days in *P. monocultus* that survive experimental challenge (Spann *et al.*, 2003). The high prevalence of subclinical or chronic infection often found in healthy *P. monodon* infected with GAV (genotype 2) and genotypes 3–6 from postlarval stages onwards suggests that these infections can persist for life (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). There is also evidence that YHV (genotype 1) can persist in survivors of experimental infection (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

YHV1 was detected by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in clinically normal wild *P. stylirostris* collected for surveillance purposes in the Gulf of California in 2003 (Castro-Longoria *et al.*, 2008). The infectious nature of the YHV1 detected was confirmed by experimental infections. There is also evidence that YHV1 can persist in survivors of experimental infection (Longyant *et al.*, 2005; 2006).

#### 2.2.7.6. Vectors

There are no known vectors of YHV1.

#### 2.2.8.7. Known or suspected wild aquatic animal carriers

There are no known documented or suspected wild aquatic animal carriers of YHV1. Infection susceptibility and long-term persistence indicate the potential for a wide range of wild penaeid and palaemonid shrimp to act as carriers.

### 2.3. Disease pattern

#### 2.3.1. Transmission mechanisms

YHV1 infection can be transmitted horizontally by injection, ingestion of infected tissue, immersion in sea water containing tissue extracts filtered to be free of bacteria, or by co-habitation of naive shrimp with infected shrimp (Flegel *et al.*, 1995b; Lightner, 1996). Infection of shrimp has also been established by injection of extracts of paste prawns (*Acetes* sp.) collected from infected ponds (Flegel *et al.*, 1995a). For GAV, vertical transmission of infection to progeny has been shown to occur from both male and female parents, possibly by surface contamination or infection of tissue surrounding fertilised eggs (Cowley *et al.*, 2002). The dynamics of how YHV1 infection spreads within aquaculture ponds have not been studied. However, the rapid accumulation of mortalities during disease outbreaks suggests that horizontal transmission occurs very effectively.

#### 2.3.2. Prevalence

The infection prevalence of yellow head complex viruses in healthy *P. monodon* (as detected by reverse transcription-nested PCR [RT-nPCR]) can be high (50–100%) in farmed and wild populations in Australia, Asia and East Africa as well as in *L. vannamei* farmed in Mexico (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Cowley *et al.*, 2004; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). The prevalence of individual genotypes varies according to the geographical origin of the shrimp. The use of detection methods less sensitive than nested PCR (e.g. histology, immunoblot, dot-blot, *in-situ* hybridisation), is likely in most cases to result in the real infection prevalence amongst populations of shrimp being underestimated.

#### 2.3.3. Geographical distribution

YHV1 has been reported in Chinese Taipei, Indonesia, Malaysia, the Philippines, Sri Lanka, Thailand and Vietnam (Walker *et al.*, 2001). GAV and other genotypes in the yellow head complex have been detected in healthy *P. monodon* from Australia, Chinese Taipei, India, Indonesia, Malaysia, Mozambique, the Philippines, Thailand and Vietnam (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). YHV1 has also been detected in *P. vannamei* cultured in Mexico (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009).

#### 2.3.4. Mortality and morbidity

With *P. monodon* being farmed in ponds, disease caused by YHV1 (genotype 1) can cause up to 100% mortality within 3–5 days of the first appearance of clinical signs (Chantanachookin *et al.*, 1993). Whilst mortalities can easily be induced by experimental exposure of *P. monodon* to YHV1 or GAV, bioassays have identified YHV1 to be far more virulent (~10<sup>6</sup>-fold by lethal dose [LD<sub>50</sub>] 50% end-point analysis) (Oanh *et al.*, 2011). Genotypes 3, 4, 5 and 6 have not yet been associated with disease (Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

## Annexe 9 (suite)

### 2.3.5. Environmental factors

Elevated virus infection levels accompanied by disease can be precipitated by physiological stress induced by sudden changes in pH or dissolved oxygen levels, or other environmental factors (Flegel *et al.*, 1997). ~~The much higher virulence of YHV compared with GAV and other genotypes appears to ensure that the infection threshold required to cause disease is reached far more easily.~~

## 2.4. Control and prevention

### 2.4.1. Vaccination

No effective vaccination methods have been developed.

### 2.4.2. Chemotherapy

No effective commercial anti-viral product is yet available.

### 2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

### 2.4.4. Resistance breeding

Not reported.

### 2.4.5. Restocking with resistant species

All marine shrimp species farmed commercially appear to be susceptible to YHV<sub>1</sub>.

### 2.4.6. Blocking agents

Injection of shrimp with double-stranded (ds) RNA homologous to ORF1a/1b gene regions of YHV<sub>1</sub> or GAV (thus targeting the genome length viral RNA) can inhibit viral replication and prevent mortalities following experimental challenge. The antiviral action of the dsRNA appears to involve the RNA interference (RNAi) pathway (Tirasophon *et al.*, 2007).

### 2.4.7. Disinfection of eggs and larvae

Not reported.

### 2.4.8. General husbandry practices

Specific pathogen free (SPF) or PCR-negative seedstock and biosecure water and culture systems may be used to reduce the risk of disease.

## 3. Sampling

### 3.1. Selection of individual specimens

For diagnosis during a disease outbreak, moribund shrimp collected from pond edges are the preferred source of material for examination. Apparently normal shrimp should also be collected from the same ponds. For surveillance for evidence of infection in populations of apparently healthy shrimp, life stages from mysis onwards (mysis, postlarvae [PL], juveniles or adults) can provide tissue sources useful for testing.

### 3.2. Preservation of samples for submission

Moribund shrimp (or tissue from moribund shrimp) should be snap-frozen on-site in a dry ice and alcohol slurry and preserved frozen in dry ice, liquid nitrogen or in a –80°C freezer. Freezing at or above –20°C is unsuitable.

Tissue samples for PCR screening should be preserved in a minimum 3-fold excess of 80–90% analytical/reagent-grade (absolute) ethanol. At least 10 times the volume of ethanol to tissue should be used. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. Commercial RNA preservatives (e.g. RNAlater) may also be used.

Tissue samples for histology should be sampled from fresh shrimp and preserved in Davidson's fixative. Formalin (10%) in seawater may be a useful alternative. At least 10 times the volume of fixative to tissue should be used.

Tissues for electron microscopy should be sampled from live shrimp.

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

### 3.3. Pooling of samples

For detecting YHV<sub>1</sub> infection in large populations of shrimp, pooling of tissue samples is acceptable for screening or surveillance of batches of mysis to PL from a hatchery tank or batches of juvenile shrimp in a pond. ~~For PCR analysis, pool size should be determined by tissue mass that can be processed without compromise in a single test.~~ The total numbers of shrimp sampled, either as a single pool or as multiple smaller pools, are selected based on the infection prevalence expected and the required confidence limits of detection. Typically in populations comprising more than a 100,000 shrimp, if the prevalence of infection exceeds 5%, a total of 60 individuals tested in appropriate pool sizes will be required to detect YHV<sub>1</sub> at a 95% confidence limit. However, definitive detection may be compromised if the YHV<sub>1</sub> loads in the infected shrimp are very low or if tests less sensitive than two-step ~~RT-~~PCR or real-time ~~RT-~~PCR are employed. See also Chapter 2.2.0.

### 3.4. Best organs or tissues

In moribund shrimp suspected to be infected with YHV<sub>1</sub>, lymphoid organ and gill are the most suitable sample tissues. For screening or surveillance of juvenile or adult shrimp that appear grossly normal, lymphoid organ is preferred. Gills or haemolymph can be used for non-sacrificial sampling.

### 3.5. Samples or tissues that are not suitable

Not determined.

## 4. Diagnostic methods

### 4.1. Field diagnostic methods

#### 4.1.1. Clinical signs

Shrimp from late ~~postlarvae~~ PL stages onwards can be infected experimentally with YHV<sub>1</sub>. In cultured shrimp, infection can result in mass mortality occurring, usually in early to late juvenile stages. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax caused by the underlying yellow hepatopancreas, which may be exceptionally soft when compared with the brown hepatopancreas of a healthy shrimp. In many cases, the total loss of a pond crop occurs within a few days of the first appearance of shrimp showing gross signs of YHV<sub>1</sub>D (Chantanachookin *et al.*, 1993). ~~Cessation of feeding and congregation of moribund shrimp at pond edges are always seen in YHD outbreaks.~~ However, these disease features are not particularly distinctive ~~for YHD~~, and in the absence of other more pathognomonic gross signs are not reliable even for preliminary diagnosis of YHV<sub>1</sub>D. ~~Gross signs of GAV disease include swimming near the surface and at the pond edges, cessation of feeding, a reddening of body and appendages, and pink to yellow discoloration of the gills (Spann *et al.*, 1997). However, these signs can occur commonly in response to various stressors and thus are not considered pathognomonic for GAV disease. Shrimp chronically infected with YHV or GAV display normal appearance and behaviour.~~

#### 4.1.2. Behavioural changes

Exceptionally high feeding activity followed by an abrupt cessation of feeding may occur within 2–4 days of the appearance of gross clinical signs of disease and mortality. Moribund shrimp may congregate at pond edges near the surface (Chantanachookin *et al.*, 1993).

## Annexe 9 (suite)

**4.2. Clinical methods****4.2.1. Gross pathology**

See Section 4.1.

**4.2.2. Clinical chemistry**

None described.

**4.2.3. Microscopic pathology**

Fix the cephalothorax tissues of moribund shrimp suspected to be affected by YHV<sub>1</sub> in Davidson's fixative, prepare tissue sections and stain with Meyer's haematoxylin and eosin (H&E) using standard histological procedures (Lightner, 1996). Examine tissues of ectodermal and mesodermal origin by light microscopy for the presence of moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions approximately 2 µm in diameter or smaller (Chantanachookin *et al.*, 1993). Tissues of the lymphoid organ, stomach subcuticulum and gills are particularly informative.

**4.2.4. Wet mounts**

Fix whole shrimp or gill filaments overnight in Davidson's fixative (Lightner, 1996). After fixation, wash some gill filaments thoroughly with tap water to remove the fixative and stain with H&E (Lightner, 1996). After staining and dehydration, when the tissue is in xylene, place a gill filament on a microscope slide in a drop of xylene and, using a fine pair of needles (a stereo microscope is helpful), break off several secondary filaments. Replace the main filament in xylene where it can be stored indefinitely in a sealed vial as a permanent reference. Being careful not to let the xylene dry, tease apart the secondary filaments and remove any large fragments or particles that would thicken the mount unnecessarily. Add a drop of mounting fluid and a cover-slip and use light pressure to flatten the mount as much as possible. This procedure may also be used with thin layers of subcuticular tissue. Examine under a light microscope using a ×40 objective lens. For samples from YHV<sub>1</sub>-affected shrimp, moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions (approximately 2 µm in diameter or smaller) will be observed (Flegel *et al.*, 1997). Evidence of such pathology should be used to support results from haemolymph smears (see below) in making a presumptive diagnosis of YHV<sub>1</sub>. As for the fixed tissues and gill filaments preserved in xylene, these whole-mount slides can be preserved as a permanent record.

If rapid results are required, the fixation step can be shortened to only 2 hours by replacing the acetic acid component of Davidson's fixative with a 50% dilution of concentrated HCl. For good fixation, this fixative should not be stored for more than a few days before use. After fixation, wash thoroughly to remove the fixative and check that the pH has returned to near neutral before staining. Do not fix for longer periods or above 25°C as this may result in excessive tissue damage that will make it difficult or impossible to identify specific pathology.

**4.2.5. Electron microscopy/cytopathology**

For transmission electron microscopy (TEM), the most suitable tissues of shrimp suspected to be infected with YHV<sub>1</sub> infection are lymphoid organ and gills. For screening or surveillance of grossly normal shrimp, the most suitable tissue is lymphoid organ.

Stun live shrimp by immersion in iced water until just immobilised or kill by injection of fixative. Quickly dissect and remove small portions of target tissue (no larger than a few mm in diameter) and fix in a volume of 6% glutaraldehyde at least 10 times greater than the volume of tissue, held at 4°C and buffered with sodium cacodylate (Na[CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O) solution (8.6 g Na cacodylate, 10 g NaCl, distilled water to make 100 ml, adjusted to pH 7 with 0.2 N HCl) or phosphate solution (0.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 1.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NaCl, 0.5 g sucrose, distilled water to make 100 ml, adjusted to pH 7 with 0.2 N HCl). Fix for at least 24 h prior to processing. For long-term storage in fixative at 4°C, reduce glutaraldehyde to 0.5–1.0%. Processing involves post-fixation with 1% osmium tetroxide, dehydration, embedding, sectioning and staining with uranyl acetate and lead citrate according to standard TEM reagents and methods (Lightner, 1996).

In the cytoplasm of cells infected with YHV<sub>1</sub>, both nucleocapsid precursors and complete enveloped virions are observed. Nucleocapsid precursors appear as long filaments approximately 15 nm in diameter that can vary markedly in length (80–450 nm) and that can sometimes be packed densely in paracrystalline arrays. Virions appear as rod-shaped, enveloped particles 40–50 nm × 150–180 nm with rounded ends and prominent projections (8–11 nm) extending from the surface. In the cell cytoplasm, virions are commonly seen to be localised or packed densely within intracellular vesicles. Virions may also be seen budding at the cytoplasmic membrane and in interstitial spaces. GAV virions and nucleocapsids are indistinguishable from YHV<sub>1</sub> by TEM.

Lymphoid organ spheroids are commonly observed in healthy *P. monodon* chronically infected with YHV1 or GAV and lymphoid organ necrosis often accompanies disease (Spann *et al.*, 1997). However, spheroid formation and structural degeneration of lymphoid organ tissue also result from infection by other shrimp viruses (Lightner, 1996).

### 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

Although primary shrimp cell culture methods are available, they are not recommended to isolate and identify YHV1 as a routine diagnostic method because of the high risk of them becoming contaminated with adventitious agents. No continuous cell lines suitable for YHV1 culture are yet available.

###### 4.3.1.2.2. Antibody-based antigen detection methods

Reagents and protocols for detecting YHV1 proteins with antibodies have been published (Loh *et al.* 1998; Lu *et al.* 1994). Virions purified from haemolymph of experimentally infected shrimp have been used to produce antiserum in New Zealand white rabbits. From this antiserum, immunoglobulin (IgG) was purified using protein-G-linked columns and cross-reacting normal shrimp antigens were removed by adsorption to acetone-dried, ground shrimp muscle tissue and haemolymph. To detect YHV1 proteins by Western blotting, dilute 0.1 ml haemolymph collected from a live shrimp in an equal volume of citrate buffer and either run immediately or store at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Clarify 200  $\mu\text{l}$  of the sample at 8000 **g** for 5 minutes and then pellet virions from the clarified supernatant by ultracentrifugation at 140,000 **g** for 5 minutes. Resuspend pellets in 100  $\mu\text{l}$  2  $\times$  loading buffer (2.5 ml 0.5 mM Tris/HCl pH 6.8, 4 ml 10% sodium dodecyl sulphate [SDS], 2 ml glycerol, 1  $\mu\text{l}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 0.5 ml deionised distilled water) and heat at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes. Load 10  $\mu\text{l}$  sample ~~onto a 5% SDS polyacrylamide gel~~ and electrophorese at 200 V. Blot the gel onto a 0.1 mm pore size nitrocellulose membrane in blotting buffer (3.03 g Tris-base, 14.4 g glycine, 200 ml methanol per litre) at 100 V for 1 hour. Rinse the membrane with phosphate buffered saline (PBS pH 7.4), block in 5% skim milk (in PBS) for 1 hour, and rinse with PBS for 5 minutes. Soak the membrane in a 1/1000 dilution of the anti-YHV1 antibody (IgG) for 1 hour, rinse three times with PBS for 5 minutes, and then soak for 1 hour in a 1/2500 dilution of goat anti-rabbit IgG-horseradish-peroxidase (HRP) conjugate. Rinse membrane three times with PBS for 5 minutes and then soak in HRP substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, until blue-purple colour develops. Stop the reaction by soaking the membrane in distilled water. All incubations should be carried out at  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Use a purified viral preparation as a positive control to identify positions of the YHV1 116 kDa, 64 kDa and 20 kDa structural proteins. The Western blot YHV1 detection sensitivity is approximately 0.4 ng YHV1 protein ( $\approx 10^6$  virions).

## Annexe 9 (suite)

## 4.3.1.2.3. Molecular techniques

## 4.3.1.2.3.1 Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Three RT-PCR protocols are described. The first is a 1-step RT-PCR adapted from Wongteerasupaya *et al.* (1997) that can be used to detect YHV1 in affected shrimp affected by YHD. This protocol will detect YHV1 (highly virulent genotype first detected in Thailand in association with YHD) but not GAV or any of the other three genotypes currently recognised. The second is a more sensitive multiplex nested RT-PCR protocol adapted from Cowley *et al.* (2004). It can be used to differentiate YHV1 from GAV in diseased shrimp or for screening healthy carriers. ~~This test will not detect all six known genotypes and genotype 3 may generate a PCR product indistinguishable in size from that generated with GAV (genotype 2). The first stage or step of the multiplex nested RT-PCR (primary RT-PCR) detected YHV7 (Mohr *et al.*, 2015). Both the RT-PCR and the nested PCR (second stage or step) detected the novel YHV genotype from China (Liu *et al.*, 2014).~~ The test is available in a suitably modified form from a commercial source (YHV/GAV IQ2000, GeneReach Biotechnology Corp., Chinese Taipei). However, this kit is not currently listed as having completed the OIE's formal process for validating and certifying commercial tests (a list of certified test kits and manufacturers is available on the OIE website: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>). The third is a sensitive multiplex nested RT-PCR protocol described by Wijegoonawardane *et al.* (2008b). This test can be used for screening healthy-shrimp for any of the six genotypes of the yellow head complex of viruses (including YHV and GAV), but will not discriminate between genotypes. Assignment of genotype can be achieved by nucleotide sequence analysis of the RT-PCR product.

*Sample preparation:* For juvenile or adult shrimp, lymphoid organ, gill tissue or haemolymph may be used to prepare total RNA. Fresh tissue is preferred. Lymphoid organ and gill tissue preserved in 80% to 95% analytical-grade ethanol or RNAlater (various manufacturers), or stored frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  are also suitable for total RNA preparation. Disrupt 10–20 mg lymphoid organ or gill tissue or 50  $\mu\text{l}$  haemolymph in 500  $\mu\text{l}$  Trizol<sup>TM</sup> reagent and extract total RNA according to the product manual. Resuspend RNA in 25  $\mu\text{l}$  water treated with DEPC (diethyl-pyrocabonate)-, heat at  $55^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes, cool on ice and use immediately or store at  $-70^{\circ}\text{C}$  until required. Ideally, a 1/200 dilution (i.e. 2.5  $\mu\text{l}$  RNA in 500  $\mu\text{l}$  DEPC-treated water) should be prepared, and UV absorbances at  $A_{260}$  nm and  $A_{280}$  nm (a UV spectrophotometer is required) should be determined to quantify and check the quality of the RNA (ratio approximately 2:1). RNA yield will vary depending on the type and freshness of tissues, quality of the preservative used, and the length of time tissue has been preserved. However, RNA yields from fresh tissues would be expected to vary from 0.2 to 2.0  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  and about half these amounts from alcohol-preserved tissues. Tissues can also be homogenised by bead beating and extracted using commercially available kits (e.g. QIAmp Viral RNA Mini Kit) (Mohr *et al.*, 2015).

From a nursery tank or hatchery tank containing 100,000 PL or more, sample approximately 1000 PL from each of 5 different points. Pool the samples in a basin, gently swirl the water and then select samples of live PL that collect at the centre of the basin. Choose numbers of PL to be pooled and tested according to the assumed or infection prevalence. Homogenise tissue samples in an appropriate volume of Trizol<sup>TM</sup> reagent and extract RNA according to the product manual. Based on the standard Trizol<sup>TM</sup> extraction procedure, tissue masses equivalent to 25–30  $\times$  PL5, 15  $\times$  PL10 and 5  $\times$  PL15 are accommodated and produce high quality total RNA free of protein contamination.

For each set of RNA samples to be tested, DEPC-treated water and extracts known to contain YHV1 RNA and/or GAV RNA (as appropriate to the test) should be included as negative and positive controls, respectively.

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*.

*Protocol 1: RT-PCR for specific detection of YHV<sub>1</sub> in diseased shrimp*

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Mohr *et al.* (2015) is as follows: Template (2 µl) is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl 2x reaction mix, 1 µl Superscript III RT/Platinum Taq mix (Invitrogen), 180 nM of each primer and molecular grade water. To synthesise cDNA, mix 2 µl RNA in 20 µl PCR buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl) containing 2.5 U of M-MLV (Moloney murine leukaemia virus) reverse transcriptase, 1.0 U ribonuclease inhibitor, 0.75 µM antisense primer 144R, 1 mM each of dATP, dTTP, dCTP, and dGTP, and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and incubate at 42°C for 15 minutes. Incubate the mixture at 100°C for 5 minutes to inactivate the reverse transcriptase and allow the mixture to cool to 5°C. Add the PCR master mix containing 10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 U Taq DNA polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.75 µM of sense primer 10F to give a final volume of 100 µl. Unless the instrument is fitted with a heated lid, overlay the tubes with 100 µl of mineral oil and Conduct After 1 cycle of 50°C for 30 minutes and 94°C for 2 minutes, PCR amplification consists of 40 cycles at of 94°C for 30 seconds, 58°C for 30-45 seconds, 72-68 C for 30-45 seconds, and finishing followed by at 72-68 C for 40-7 minutes. Alongside a suitable DNA ladder, apply a 20 µl aliquot of the PCR to a 2-1.5% agarose/TAE (Tris-acetate-EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid]) gel containing 0.5 µg ml<sup>-1</sup> ethidium bromide SYBR-safe and following electrophoresis, detect the 135 bp DNA band expected for YHV using a UV-blue-light transilluminator.

The sensitivity of the PCR is approximately 0.01 pg of purified YHV<sub>1</sub> RNA ( $\approx 10^3$  genomes).

PCR primer sequences:

10F: 5'-CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG-3'

144R: 5'-AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT-3'

*Protocol 2: Nested RT-PCR for differential detection of YHV<sub>1</sub> and GAV in healthy or diseased shrimp*

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Mohr *et al.* (2015) is as follows: For the primary PCR, 2 µl template is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl 2x reaction mix, 1 µl Superscript III RT/Platinum Taq mix (Invitrogen), 180 nM of each GY1 and GY4 primer and molecular grade water. For cDNA synthesis, 2 µl RNA (ideally 1.0 µg total RNA, if quantified), 0.7 µl 50 pmol µl<sup>-1</sup> primer GY5 and DEPC-treated water are added to 6 µl total, the mixture, incubated at 70°C for 10 minutes and chilled on ice. Add 2 µl Superscript II buffer x 5 (250 mM Tris/HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl 100 mM DTT and 0.5 µl 10 mM dNTP stock mixture (i.e. 10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP) and mix gently. Preheat to 42°C for 2 minutes, add 0.5 µl 200 U µl<sup>-1</sup> reverse transcriptase and incubate at 42°C for 1 hour. Heat the reaction at 70°C for 10 minutes, chill on ice and spin briefly in a microcentrifuge to collect the contents of the tube. For the first PCR step, prepare a 50 µl reaction mixture containing 1 x Taq buffer (10 mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 35 pmol of each primer GY1 and GY4, 200 µM each of dATP, dTTP, dCTP and dGTP and 2.5 U Taq polymerase in a 0.5 ml thin walled tube. Overlay the reaction mixture with 50 µl liquid paraffin, Heat at 85°C for 2-3 minutes and then add 1 µl cDNA. After 1 cycle of 50°C for 30 minutes and 94°C for 2 minutes, Conduct PCR amplification using consists of 35 cycles at of 95°C for 30 seconds, 66°C for 30 seconds, and 72-68° C for 45 seconds, followed by final extension at 72-68°C for 7 minutes. For the second, nested PCR step, prepare a 50-25 µl reaction mixture containing 2 µl of the first step PCR product, 1 x Taq buffer (above), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 12.5 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 360 nM 35 pmol of each primer GY2, Y3 and G6, 200 µM each of dATP, dTTP, dCTP and dGTP and 2.5 U Taq polymerase in a 0.5 ml thin walled tube and overlay with liquid paraffin and molecular grade water. Conduct PCR using amplification consists of 1 cycle of 95°C for 15 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 66°C for 30 seconds, and 72°C for 45 seconds, followed by final extension at 72°C for 7 minutes conditions as described above. Alongside a suitable DNA ladder, apply a 20 µl aliquot of the PCR to a 1.5% agarose/TAE (Tris-acetate-EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid]) gel containing SYBR-safe and following electrophoresis, detect amplicons using a blue-light transilluminator. Apply a 10 µl aliquot of the PCR to 2% agarose/TAE gels containing 0.5 µg ml<sup>-1</sup> ethidium bromide alongside a suitable DNA ladder and detect using a UV transilluminator.

## Annexe 9 (suite)

If the viral load is sufficiently high, a 794 bp DNA will be amplified from either GAV or YHV1 in the first PCR step. In the second PCR step, a 277 bp product indicates detection of YHV and a 406 bp product indicates detection of GAV. The presence of both 406 bp and 277 bp products indicates a dual infection with GAV and YHV1. The detection sensitivity of the second-step PCR is ~1000-fold greater than the first-step PCR and GAV or YHV1 RNA can be detected to a limit of 10 fg lymphoid organ total RNA. The nested PCR can be run as two separate assays specific for YHV1 or GAV by omitting either the G6 or Y3 primer, respectively. The primer contains a mismatch for GAV but is specific for YHV1. For GAV, the 7th base from left (T) is substituted for C so that the primer sequence for GAV should be 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', according to the sequence data of the GAV genome (database accession numbers, NC\_010306.1 and AF227196.2).

The sequences of RT-PCR primers generic for GAV and YHV (GY) or specific for GAV (G) or YHV (Y) are as follows:

GY1: 5'-GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG-3'  
 GY2: 5'-CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3'  
 GY4: 5'-GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG-3'  
 GY5: 5'-GAG-CTG-GAA-TTC-AGT-GAG-AGA-ACA-3'  
 Y3: 5'-ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT-3'  
 G6: 5'-GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT-3'

**NB:** Due to reported problems with primer specificity for some emerging strains, all PCR products generated using protocol 2 should be sequenced to confirm the virus genotype.

*Protocol 3:* Nested RT-PCR for detection of all currently known-characterised genotypes in the yellow head complex (including YHV1 and ti YHV7-GAV)

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Mohr *et al.* (2015) is as follows: For the primary PCR, 2 µl template is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl 2x reaction mix, 1 µl Superscript III RT/Platinum Taq mix (Invitrogen), 180 nM of each YC-F1ab and YC-R1ab primer pools and molecular grade water. For cDNA synthesis, mix 2 µl RNA (ideally 1.0 µg total RNA, if quantified), 50 ng random hexamer primers and 1.0 µl 10 mM dNTP and make up to a total volume of 14 µl in sterile DEPC-treated water, incubate at 65°C for 5 minutes and chill on ice. Add 4.0 µl Superscript III buffer x 5, 1.0 µl 100 mM DTT, 1.0 µl 40 U µl<sup>-1</sup> RNaseOUT™ (Invitrogen) and 1.0 µl 200 U µl<sup>-1</sup> reverse transcriptase and mix gently. Incubate at 25°C for 5 minutes and then at 42°C for 55 minutes, stop the reaction by heating at 70°C for 15 minutes, chill on ice and spin briefly in a microcentrifuge to collect the contents of the tube. For the first PCR step, add 1 µl cDNA to a total 25 µl reaction mixture containing 1x Taq buffer (10 mM Tris/HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.35 µl primer mix containing 25 pmol µl<sup>-1</sup> of each primer pool (see below) YC-F1ab and YC-R1ab, 0.5 µl 10 mM dNTP mix and 0.25 µl 5 U µl<sup>-1</sup> Taq DNA polymerase. After 1 cycle of 50°C for 30 minutes and 94°C for 2 minutes, conduct PCR amplification consists of 1 cycle of 95°C for 15 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, and 68°C for 45 seconds, followed by final extension at 68°C for 7 minutes. For the second, nested PCR step, prepare a 25 µl reaction mixture containing 2 µl of the first step PCR product, 12.5 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen), 180 nM of each YV-F2ab and YC-R2ab primer pool, and molecular grade water. PCR amplification consists of 1 cycle of 95°C for 15 minutes followed by 35 cycles of 94°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds, followed by final extension at 72°C for 7 minutes. Alongside a suitable DNA ladder, apply a 20 µl aliquot of the PCR to a 1.5% agarose/TAE (Tris-acetate-EDTA [ethylene diamine tetra-acetic acid]) gel containing SYBR-safe and following electrophoresis, detect amplicons using a blue-light transilluminator, using denaturation at 95°C for 1 minute followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 40 seconds, followed by a final extension at 72°C for 7 minutes. For the second PCR step, use 1 µl of the first PCR product in the reaction mixture as prepared above but substituting primer pools YC-F2ab and YC-R2ab. Conduct PCR amplification using denaturation at 95°C for 1 minute followed by 35 cycles at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds, followed by a final extension at 72°C for 7 minutes. Apply an 8 µl aliquot of the PCR to 2% agarose/TAE gels containing 0.5 µg ml<sup>-1</sup> ethidium bromide alongside a suitable DNA ladder and detect using a UV transilluminator.

If the viral load is sufficiently high, a 358 bp DNA is amplified in the first PCR step. The second (nested) PCR step amplifies a 146 bp product. The detection of these products indicates detection of one of the six seven genotypes in the yellow head complex. Further assignment of genotype (if required) is possible by nucleotide sequence analysis of either PCR product followed by comparison with sequences of the known genotypes by multiple sequence alignment and phylogenetic analysis. The detection sensitivity limits of the first PCR step and nested PCR step are 2,500 and 2.5 RNA templates, respectively.

PCR primer sequences (each primer comprises a pool of equal quantities of two related oligonucleotide sequences):

YC-F1ab pool:	5'-ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC-3'
	5'-ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC-3'
YC-R1ab pool:	5'-TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC-3'
	5'-TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC-3'
YC-F2ab pool:	5'-CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA-3'
	5'-CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA-3'
YC-R2ab pool:	5'-RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT-3'
	5'-GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT-3'
Mixed base codes:	R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).

#### 4.3.1.2.4. *In-situ* hybridisation

The protocol of Tang *et al.* (2002) described is suitable for detecting YHV<sub>1</sub> or GAV (Tang & Lightner, 1999). To preserve viral RNA accessibility, fix tissues sampled from live shrimp in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RF-fixative) (Hasson *et al.*, 1997). To achieve good tissue preservation whilst also preserving RNA accessibility, normal Davidson's fixative can be used as long as the fixation time is limited to 24 hours (maximum of 48 hours). Process the fixed tissue using standard histological methods and prepare 4 µm thick sections on Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA). Prior to hybridisation, incubate sections at 65°C for 45 minutes, remove paraffin with Hemo-De (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA), and rehydrate through a reducing ethanol concentration series to water. Digest sections with proteinase K (100 µg ml<sup>-1</sup>, in 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) for 15 minutes at 37°C, followed by post-fixation in 0.4% formaldehyde for 5 minutes. Rinse in 2 × SSC (standard saline citrate), then pre-hybridise with 500 µl pre-hybridisation solution (4 × SSC, 50% formamide, 1 × Denhardt's, 0.25 mg ml<sup>-1</sup> yeast RNA, 0.5 mg ml<sup>-1</sup> sheared salmon sperm DNA, 5% dextran sulphate) at 42°C for 30 minutes. For hybridisation, overlay the sections with 250 µl hybridisation solution containing a digoxigenin-labelled DNA probe (20–40 ng ml<sup>-1</sup>) at 42°C overnight. The next day, wash the sections as follows: 2 × SSC once for 30 minutes at room temperature; 1 × SSC twice for 5 minutes at 37°C; 0.5 × SSC twice for 5 minutes at 37°C. Incubate the sections with sheep anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate (Roche) at 37°C for 30 minutes. Wash with 0.1 M Tris/HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl twice for 10 minutes at room temperature and rinse with 0.1 M Tris/HCl pH 9.5, 0.1 M NaCl. Incubate with nitroblue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate in the dark for 1–2 h for colour development. Counterstain with Bismarck Brown Y (0.5%), dehydrate through a series of ethanol and Hemo-De, add Permount (Fisher Scientific, Pennsylvania, USA) and cover with a cover-slip. YHV-infected cells give a blue to purple-black colour against the brown counter stain. Include positive controls of YHV-infected tissue and negative controls of uninfected shrimp tissue. The digoxigenin-labelled DNA probe can be prepared by PCR labelling using the following primers:

YHV1051F:	5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'
YHV1051R:	5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

## Annexe 9 (suite)

## 4.3.1.2.5 Agent purification

A YHV1 purification method based on density gradient ultracentrifugation is described (Wongteersupaya *et al.* 1995). Approximately 250 healthy juvenile *P. monodon* (or *P. vannamei*) shrimp (approximately 10 g) should ideally be used as a source of virus for purification. After acclimatising for several days in 1500 litre tanks (approximately 80 shrimp/tank) at a salinity of 3.5 parts per thousand ( $\text{mg ml}^{-1}$ ), inoculate each shrimp intramuscularly with 100  $\mu\text{l}$  of a 1/100 gill extract suspension prepared from YHV-infected shrimp. At 2 days post-infection, harvest moribund shrimp showing typical signs of YHV1D. Use a syringe to draw haemolymph from the sinuses at the base of the walking legs and mix carefully on ice with the same volume of lobster haemolymph medium (LHM) (486 mM NaCl, 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 8.1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 36 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0.05% dextrose in Minimal Eagle's Medium, adjusted pH 7.6 with 1 N NaOH). Centrifuge the mixture at 480 **g** for 30 minutes at 4°C to remove cellular debris. Ultracentrifuge the supernatant at 100,000 **g** for 1 hour at 4°C. Discard the supernatant and gently resuspend the pellet overnight at 4°C in 1 ml LHM. Layer this suspension over a continuous gradient of 20–40% Urografin and ultracentrifuge at 100,000 **g** for 1 hour at 4°C. After centrifugation, collect the viral band by using a Pasteur pipette and dilute with NTE buffer (0.02 M EDTA, 0.2 M NaCl, 0.2 M Tris/HCl [pH 7.4]) to a final volume of 12 ml. Ultracentrifuge the suspension at 100,000 **g** for 1 hour at 4°C and resuspend the pellet (purified virus) in 100  $\mu\text{l}$  TE buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA [pH 7.4]) and store in 20  $\mu\text{l}$  aliquots at –80°C until required.

## 4.3.1.2.6 Bioassay

The bioassay procedure is based on that described by Spann *et al.* (1997), but similar procedures have been described by several other authors (Lu *et al.*, 1994). The bioassay should be conducted in susceptible shrimp (see Section 2.2 above) ideally that have been certified as SPF and have been obtained from a biosecure breeding facility. Alternatively, susceptible wild or farmed shrimp to be used for bioassay should be screened by nested RT-PCR using RNA extracted from tissue or haemolymph to confirm the absence of pre-existing chronic infections with YHV1, GAV-YHV complex or related viruses. Throughout the procedure, shrimp should be maintained under optimal conditions for survival of the species in laboratory tank systems.

Collect moribund shrimp from a YHV1D-affected ponds or shrimp suspected of being carriers of infection and maintain at 4°C or on ice. Remove and discard the tail and appendages. If necessary, the whole shrimp or the retained cephalothorax may be snap-frozen and stored at –80°C or in liquid nitrogen until required. Thaw stored samples rapidly in a 37°C water bath within two snap-seal plastic bags and then maintain at 4°C or on ice during all procedures. Remove the carapace and calciferous mouth-parts. Suspend the remaining tissues in six volumes of TN buffer (0.02 M Tris/HCl, pH 7.4, 0.4 M NaCl) and homogenise in a tissue grinder to form a smooth suspension. Clarify the homogenate at 1300 **g** for 20 minutes at 4°C. Remove the supernatant fluid below the lipid layer and pass through a 0.45  $\mu\text{m}$  filter. Maintain the filtrate at 4°C for immediate use or snap-freeze and store in aliquots at –80°C or in liquid nitrogen. Thaw the filtrate rapidly at 37°C and maintain on ice prior to use.

Inject at least 12 juvenile (1–5 g) shrimp of a known susceptible species (*P. monodon*, *P. esculentus*, *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. vannamei*, *P. stylirostris*), with 5  $\mu\text{l}$  of filtrate per gram body weight into the second abdominal segment using a 26-gauge needle. Inject two equivalent groups of at least 12 shrimp with TN buffer and a filtered tissue extract prepared from uninfected shrimp. One additional group of at least 12 shrimp should be injected last with a known and calibrated positive control inoculum from shrimp infected with YHV1 or GAV (as required). Maintain each group of shrimp in a separate covered tank with a separate water supply for the duration of the bioassay. Ensure no inadvertent transfer of water between tanks by good laboratory practice. Observe the shrimp and record mortalities for at least 21 days or until the test and positive control groups reach 100% mortality. Collect at least one moribund shrimp from each of the four groups for examination by histology, TEM, *in situ* nucleic acid hybridisation, and PCR or Western-blot analysis to confirm the presence of YHV1 or GAV (as required) in the sample (refer to the Sections above for test procedures).

NOTE: shrimp to be tested that are suspected of being carriers of low level chronic infections may produce an inoculum containing a very low dose of virus. In bioassay, such an inoculum may not necessarily cause mortalities, gross signs of disease or histology characteristic of a lethal infection. In this event, molecular tests (PCR or ISH) or TEM must be applied to the bioassay shrimp.

#### 4.3.2. Serological methods

Not applicable.

### 5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for targeted surveillance and diagnosis of YHV1D 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	d	d	a	d
Histopathology	d	d	c	c	a	d
Transmission EM	d	d	c	c	d	b
Antibody-based assays	d	d	c	c	a	b
<i>In-situ</i> DNA probes	d	d	c	c	b	a
PCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	a	a	a	a	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 yellow head virus genotype 1

Nested RT-PCR (Section 4.3.1.2.3.1; Protocol 3) followed by confirmatory sequencing of the amplified PCR product is the prescribed method for declaring freedom. Two-step PCR negative results are required. ~~The very rare case when a two-step PCR positive result cannot be confirmed by sequencing is also considered to be a negative result.~~

### 7. Corroborative diagnostic criteria

#### 7.1. Definition of suspect case

A suspect case of infection with YHV1-genotype 1 is defined as a disease outbreak in marine shrimp with rapidly accumulating mortalities (up to 100%) in the early to late juvenile stages, which may be preceded by cessation of feeding and congregation of shrimp at pond edges. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax caused by the underlying yellow hepatopancreas. Histological examination of fixed lymphoid organ tissues should reveal moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions (approximately 2 µm in diameter or smaller).

## Annexe 9 (suite)

**7.2. Definition of confirmed case**

YHV<sub>1</sub> may be confirmed by the detection of high levels of disseminated infection in tissues of ectodermal and mesodermal origin by *in situ* hybridisation in conjunction with the detection of amplified products of the prescribed size using discriminatory RT-PCR assays and sequencing, as described in Section 4.3 of this chapter. ~~As low-level chronic infections with yellow head complex viruses are common in some regions, detection of the presence of virus is not, in itself, evidence of aetiology.~~

**8. References**

ARANGUREN L.F., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2012). Protection from yellow head virus (YHV) infection in *Penaeus vannamei* pre-infected with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **98**, 185–192.

ASSAVALAPSAKUL W., SMITH D.R. & PANYIM S. (2003). Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 253–258.

CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31** (12), 953–956.

CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., SPANN K.M., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Differential detection of gill-associated virus (GAV) from Australia and yellow head virus (YHV) from Thailand by multiplex RT-nested PCR. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59.

COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.

COWLEY J.A., WALKER P.J., FLEGEL T.W., LIGHTNER D.V., BONAMI J.R., SNIJDER E.J. & DE GROOT R.J. (2012). Family Roniviridae. *In: Virus Taxonomy, IXth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A., Adams M., Carstens E. & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier, Academic Press, London, UK, 797–801.

FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.

FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAIRATANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. *In: Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.

FLEGEL T.W., SRIURAIRATANA S., WONGTERRASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. *In: Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.

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 assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.

LIGHTNER D.V. (Ed.) (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.

LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., 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** (4), 703–709.

LIGHTNER D.V., HANSON, K.W., WHITE, B.L. & REDMAN R.M. (1998). Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 271–281.

LOH P.C., CESAR E., NADALA B. JR, TAPAY L.M. & LU Y. (1998). Recent developments in immunologically-based and cell culture protocols for the specific detection of shrimp viral pathogens. In: Advances in Shrimp Biotechnology, Flegel T.W., ed. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand, 255–259.

LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.

LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.

LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.

MA H., OVERSTREET R.M. & JOVONOVICH J.A. (2009). Daggerblade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*): A reservoir host for yellow head virus (YHV). *J. Invert. Pathol.* **101**, 112–118.

MOHR P.G., MOODY N.J.G., HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.STJ. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.

OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.

SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Internatn.*, **17**, 101–112.

SENAPIN S., THAOWBUT Y., GANGNONNGIW W., CHUCHIRD N., SRIURAIRATANA S. & FLEGEL TW. (2010). Impact of yellow head virus outbreaks in the whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone), in Thailand. *J. Fish Dis.*, **33** (5), 421–430.

SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.

SPANN K.M., DONALDSON R.A., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2000). Differences in susceptibility of some penaeid prawn species to gill-associated virus (GAV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 221–225.

SPANN K.M., MCCULLOCH R.J., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2003). Detection of gill-associated virus (GAV) by *in situ* hybridisation during acute and chronic infections in *Penaeus monodon* and *Penaeus esculentus* shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 1–10.

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.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.

Annexe 9 (suite)

TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.

TIRASOPHON W., YODMUANG S., CHINNIRUNVONG W., PLONGTHONGKUM & PANYIM S. (2007). Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Res.*, **74**, 150–155.

WALKER P.J., COWLEY J.A. SPANN K.M., HODGSON R.A.J. HALL M.R & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. *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, LA, USA, 292–302.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., SITTIDILOKRATNA, N., PHETCHAMPAI, N., COWLEY, J.A., GUDKOV, N. & WALKER P.J. (2009). Homologous genetic recombination in the yellow head complex of nidoviruses infecting *Penaeus monodon* shrimp. *Virology* doi: 10.1016/j.virol.2009.04.015.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A., PHAN T., HODGSON R.A.J., NIELSEN L., KIATPATHOMCHAI W. & WALKER P.J. (2008a). Genetic diversity in the yellow head nidovirus complex. *Virology* **380**, 213–225.

WIJEGONAWARDANE P.K.M., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2008b). Consensus RT-nested PCR to detect yellow head virus genotypes in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **153**, 168–175.

WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1997). Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 181–186.

WONGTEERASUPAYA C., SRIURAIRATANA S., VICKERS J.E., AKRAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. *Dis. Aquat. Org.*, **22**, 45–50.

\*  
\* \*

**NB:** There is an OIE Reference Laboratory for infection with yellow head disease-virus genotype 1 (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 yellow head disease-virus genotype 1

## GLOSSAIRE (PARTIE B)

Aux fins du présent *Code aquatique* :

### **ANIMAUX AQUATIQUES**

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

### **NORME DE L'OIE**

désigne un texte ~~formellement~~ adopté par l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE, ~~et publié par l'OIE dans le Code aquatique ou le Manuel aquatique décrivant les exigences, les recommandations, les critères, les spécifications et les caractéristiques à mettre en œuvre de façon cohérente et destiné pour à préserver ou à améliorer la santé animale et le bien-être des animaux aquatiques ou la santé publique vétérinaire et le bien-être animal~~ dans le monde.

### **LIGNE DIRECTRICE DE L'OIE**

désigne un ~~texte~~ ~~une publication de l'OIE qui fournit des conseils pour améliorer la santé animale, la santé publique vétérinaire et le bien-être animal dans le monde et qui, bien qu'qui a été approuvée par une Commission spécialisée de l'OIE ou le Conseil de l'OIE; mais qui n'a pas été formellement adoptée par l'Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE. Ce texte contient des préconisations visant à préserver ou améliorer la santé et le bien-être des animaux aquatiques ou de la santé publique vétérinaire dans le monde.~~

-----

— Texte supprimé.



CHAPITRE 1.2.

**CRITÈRES D'INCLUSION D'UNE MALADIE  
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~~ dans le 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 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~~ 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,~~ un 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 sécurité au plan sanitaire des *échanges internationaux d'animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques*.

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

Les principes 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* dans la liste de l'OIE sont les suivants :

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

ET

- 2) Au moins un pays ~~ou une zone~~ 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 de lourdes conséquences telles que des pertes de production, une morbidité ~~et~~ ou une mortalité constatées au niveau du pays ou de la *zone*.

Annexe 11 (suite)

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 et ou une mortalité à l'échelle de la population, une baisse de productivité ~~ainsi que~~ ou des répercussions sur l'écologie.

---

-----

— Texte supprimé.

## CHAPTITRE 1.2.

## CRITÈRES D'INCLUSION D'UNE MALADIE 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
<b>A. Conséquences</b>			
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), a un impact significatif sur <u>affecte la santé des animaux aquatiques</u> d'élevage à l'échelle d'un pays ou d'une zone, en tenant compte de l'apparition et de la sévérité des signes cliniques, avec des lourdes conséquences impacts graves 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.Or	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' <i>animaux aquatiques</i> sauvages, avec de lourdes conséquences, 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, 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.	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 11B (suite)

<u>ET</u>			
3.4.	<u>a</u> Or	L'agent infectieux représente une menace pour la santé publique. <u>La transmission naturelle à l'homme a été prouvée, et la présence de l'infection chez l'homme est associée à des conséquences graves.</u>	
<b>Et – B. Propagation</b>			
4.	-	Une étiologie infectieuse de la maladie est prouvée.	
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.
6.1.	Et	Probabilité de <u>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.</u>	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	<u>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.</u> Plusieurs pays ou zones peuvent être déclarés indemnes de la maladie, conformément aux principes généraux de surveillance énoncés au <u>aux dispositions des du chapitre 1.4. et 1.5.</u>	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.
<b>Et – C. Diagnostic</b>			
<u>ET</u>			
8.3.		<u>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</u>	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 <i>Manuel aquatique</i> ) 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<sup>er</sup> 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* (~~P~~este de l'écrevisse) (~~Aphanomyces astaci~~)
- Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune
- Infection par le virus de la nNécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse
- Infection par le virus de la mMyonécrose infectieuse
- Infection à *Hepatobacter penaei* (~~H~~épatopancréatite nécrosante)
- Infection par le virus du sSyndrome de Taura.
- Infection par le virus du syndrome ~~Maladie~~ des points blancs
- Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (~~M~~aladie 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 à ~~†~~*Ranavirus*.

- 
- 
- Texte supprimé.



## CHAPITRE 9.X.

## MALADIE DE NÉCROSE HÉPATOPANCRÉATIQUE AIGÛE

## Article 9.X.1.

Aux fins de l'application du *Code aquatique*, l'expression « maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe » désigne une infection causée par les souches de la bactérie *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp<sub>AHPND</sub>*) 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 *Photobacterium* (*Pir*), *PirA* et *PirB*, pour une toxine (*Pir<sup>HP</sup>*) induisant des modifications histopathologiques du pancréas (ci-après désignées par souches *Vp<sub>AHPND</sub>*). *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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre 1.5. : la crevette à pattes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*) et la crevette géante tigrée géante (*Penaeus monodon*).

## Article 9.X.3.

**Importation 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 aigüe et du statut du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe**

- 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 aigüe, 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. :
  - [a) produits à base de crustacés stérilisés par la chaleur (c'est-à-dire exposés à une température de 121 °C pendant au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 100 °C pendant au moins trois minutes (ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *Vp<sub>AHPND</sub>*) ;
  - c) 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 *Vp<sub>AHPND</sub>*) ;
  - 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 ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.X.2. autres que ceux énumérés au point 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 aigüe.
- 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.X.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Annexe 13 (suite)

## Article 9.X.4.

**Pays indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe**

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 aigüe 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 aigüe 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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 aigüe ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, a perdu son statut indemne par suite de la détection d'une telle *maladie* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 aigüe ait été décelée.

Entretemps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone* indemne, pour autant que les conditions requises au point 3 de l'article 9.X.5. soient remplies.

## Article 9.X.5.

**Compartiment ou zone indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe**

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 aigüe 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 maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe 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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 aigüe ait été décelée ;

OU

- 4) ce pays, après avoir déposé une *auto-déclaration d'absence* de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection de cette *maladie* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~la probabilité le risque~~ de nouvelle 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 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 aigüe ait été décelée.

## Article 9.X.6.

**Maintien du statut indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe**

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe conformément aux dispositions énoncées sous les points 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.

### Annexe 13 (suite)

Un pays, une zone ou un *compartiment* déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe conformément aux dispositions énoncées sous le point 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 propices à l'expression clinique de la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, 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 aigüe 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.X.7.

### **Importation d'animaux aquatiques et 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 aigüe**

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.X.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, 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, et attestant 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 maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe 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 *certificat* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 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 aigüe**

- 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 aigüe, 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* :
  - 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  $V_{p_{AHPND}}$ .
- 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.aspxf>) 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  $V_{p_{AHPND}}$  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  $V_{p_{AHPND}}$  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  $V_{p_{AHPND}}$  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 aigüe 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 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 aigüe**

Lors de l'importation, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* 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 aigüe, 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.X.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.X.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver  $V_{p_{AHPND}}$  ou de les éliminer de manière à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.X.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe**

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* vivants appartenant à des espèces visées à l'article 9.X.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement et son maintien dans des installations de *quarantaine* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver  $V_{p_{AHPND}}$ .

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 1 de l'article 9.X.3.

Annexe 13 (suite)

## Article 9.X.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe**

- 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 aigüe, 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 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* susvisé 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 espèces visées à l'article 9.X.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 1 ci-dessus, à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne de maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe, 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.

**« 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 de la maladie X**

- 1) Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article X.X.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne de la maladie X, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé au type de *marchandise* susvisé conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures de réduction du *risque* figurant aux points 2) et 3) ci-dessous.
- 2) Dans le cas où l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques*, et il convient d'appliquer les principes suivants :
  - a) la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* 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 au chapitre 4.3.) ainsi que l'élimination de ces effluents et déchets dans des conditions de sécurité biologique adéquates ;
- 3) 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* disposant d'un statut sanitaire élevé au regard de 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 pour 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 la maladie X (tels que décrits dans la *Manuel aquatique*) et tester la présence de la maladie X chez cette population, conformément au chapitre 1.4 ;
    - v) si la présence de la maladie X n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne de la maladie X et libérée de sa *quarantaine* ;
    - vi) si la présence de la *maladie* est décelée dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine* et sera éliminée puis détruite 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 de la maladie X**

- 1) Lors de l'importation, ~~à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants~~ appartenant à des espèces visées à l'article X.X.2. à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne de 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) et 3) ci-dessous.~~
- 2) Dans le cas où l'objectif est le grossissement et la récolte des animaux aquatiques, et 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 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 au chapitre 4.3.) 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).~~
- 3) ~~Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population, 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 disposant d'un statut sanitaire élevé au regard de 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 pour 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 la maladie X (tels que décrits dans la Manuel aquatique) et tester la présence de la maladie X chez cette population, conformément au chapitre 1.4. ;
    - v) si la présence de la maladie X n'est pas décelée dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne de la maladie X et libérée de sa quarantaine ;
    - 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 éliminée puis détruite dans des conditions de sécurité biologique adéquates.

Annexe 14B (suite)

- 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 repoplement 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.

## CHAPITRE 4.4.

RECOMMANDATIONS POUR LA DÉSINFECTION  
DE SURFACE DES OEUFS 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* 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 ~~compartiments~~, zones ou pays compartiments, 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 à l'aide d'une solution saline à 0,9 % - 1,1 % 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 ; le suivi des concentrations en iodophores doit être assuré afin que ces derniers conservent leur efficacité ; il faut~~ prévoir quatre volumes de solution d'iodophores au minimum pour un volume d'œufs ; puis
- 3) second rinçage à l'aide d'une solution saline à 0,9 % – 1,1 % non contaminée par des *agents pathogènes* (pendant 30 à 60 secondes) ; puis
- 4) conservation dans une eau 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 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 (NaHCO<sub>3</sub>).

---

-----  
— Texte supprimé.



## CHAPITRE 9.1.

**INFECTION À APHANOMYCES ASTACI (PESTE DE L'ECREVISSE) (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 un champignon, *Aphanomyces astaci* Schikora. Cet organisme appartient à un sous-groupe courant de la classe des Oomycètes (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 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 alleni* et le crabe *Potamon potamios*, à la totalité des écrevisses classées en trois familles (*Gambaridae*, *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 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 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 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) 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 au moins dix minutes 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 au moins 72 heures ;
  - e) huile d'écrevisse ;
  - f) farines d'écrevisse ;
  - g) chitine extraite par un procédé chimique.

## Annexe 16 (suite)

- 2) Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire d'animaux aquatiques* ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à une espèce visée à l'article 9.1.2. autres que ceux énumérés au point 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* 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 *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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence de 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 *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* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible la probabilité le ~~risque~~ de nouvelle 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 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.

Entre-temps, tout ou partie du secteur non touché peut être déclaré *zone indemne*, pour autant que les conditions requises au point 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence de 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 *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* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible le ~~risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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.

## Annexe 16 (suite)

## 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 sous les points 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 sous le point 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 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 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.1.2. 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*, et attestant 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 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.

Ce *certificat* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 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 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* :
  - 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 *A. astaci*.
- 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 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*.
- 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 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des 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 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.1.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.1.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.1.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.1.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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 :

Annexe 16 (suite)

- 1) la livraison directe du chargement et son maintien dans des installations de *quarantaine* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver *A. astaci*.

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

## Article 9.1.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 d'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* quand elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* des *marchandises* suivantes qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions requises à l'article 5.4.2. :
  - aucune *marchandise* n'est listée.
- 2) Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.1.2., à l'exclusion de ceux énumérés au point 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* 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. ~~Ce virus est classé en tant qu'espèce dénommée *Penaeusstylirostrisdonsovirus*, appartenant au~~ dans le genre *Brevidensovirus* et ~~en tant qu'espèce dénommée *Penaeusstylirostrisdonsovirus*, appartenant au~~ 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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre 1.5. : 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 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 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* 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant au moins 20 minutes 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* ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à une espèce visée à l'article 9.3.2. autres que ceux énumérés au point 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* 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 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 17 (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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 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* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 l'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 au point 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 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* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :*

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible le ~~risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 l'infection par le virus de la de nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ait été décelée.

## Annexe 17 (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 sous les points 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 sous le point 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 propices à l'expression clinique de l'infection par le virus 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 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 9.3.7.

**Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.3.2. 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*, et attestant 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 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.

Ce *certificat* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 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 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* :
  - 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 le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse.
- 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.aspxf>) 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 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 d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse 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 9.3.3.

#### Article 9.3.9.

#### **Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des 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 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.3.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.3.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.3.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.3.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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 :

Annexe 17 (suite)

- 1) la livraison directe du chargement et son maintien dans des installations de *quarantaine* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver le virus de la nécrose hypodermique et hématoïétique infectieuse.

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

## Article 9.3.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 d'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématoïétique 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 hématoïétique infectieuse, 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 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* susvisé à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.3.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 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* susvisé 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. ~~Ce virus qui~~ présente des similitudes avec les membres de la famille des *Totiviridae*.

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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le 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 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 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant au moins trois minutes 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* ou de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à une espèce visée à l'article 9.4.2. autres que ceux énumérés au point 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* 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 le virus de la myonécrose infectieuse. L'*Autorité compétente* du *pays exportateur* doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

Annexe 18 (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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 d'une telle *maladie* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 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 au point 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 d'une telle *maladie* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 virus de la myonécrose infectieuse ait été décelée.

Annexe 18 (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 sous les points 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 sous le point 3, suivant le cas, des articles 9.4.4. ou 9.4.5. peut interrompre la *surveillance ciblée* tout en conservant le statut indemne au regard de cette *maladie*, sous réserve que les conditions propices à l'expression clinique de l'infection par le virus de la myonécrose 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 myonécrose infectieuse 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 9.4.7.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.4.2. 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*, et attestant 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 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 *certificat* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 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**

- 1) Lors de l'importation, à des fins d'*aquaculture*, d'*animaux aquatiques* vivants appartenant à des espèces 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* :
  - 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 de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver le virus de la myonécrose infectieuse.
- 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 du virus de la myonécrose infectieuse 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 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 du 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 d'infection par le virus de la myonécrose infectieuse 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 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces 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 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.4.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.4.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.4.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.4.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et

Annexe 18 (suite)

- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver le virus de la myonécrose infectieuse.

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

## Article 9.4.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 d'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 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* susvisé à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.4.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 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* susvisé 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 *Candidatus Hepatobacter penaei*. ~~Cette~~ une 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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre 1.5. : à la crevette à pattes blanches du Pacifique (*Penaeus vannamei*), à la crevette bleue (*Penaeus stylirostris*), à la crevette ligubam 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 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 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 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 100 °C pendant au moins trois minutes 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 au moins 30 minutes 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 ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.5.2. autres que ceux énumérés au point 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 19 (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 9.5.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un *risque en termes de propagation 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 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 d'une telle *maladie*, mais les conditions ci-après sont réunies :

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible le ~~risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 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 au point 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 *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 d'une telle *maladie* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :*

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 *H. penaei* ~~d'hépatopancréatite nécrosante~~ ait été décelée.

## Annexe 19 (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 sous les points 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 sous le point 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 propices à l'expression clinique de l'infection à *H. penaei* ~~l'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~~ 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 9.5.7.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 et de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des espèces visées à l'article 9.5.2. 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, et attestant 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 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 certificat doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 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 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 :
  - 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.

#### Article 9.5.9.

#### **Importation d'animaux aquatiques et 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* vivants et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des 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 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.5.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.5.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 Hepatobacter penaei* ou de les éliminer de manière à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.5.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.5.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et

Annexe 19 (suite)

- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver *Candidatus Hepatobacter penaei*.

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

Article 9.5.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 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* 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* susvisé à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.5.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 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* susvisé 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 appartenant au genre *Aparavirus*, dans 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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le chapitre 1.5. ~~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 (*P. 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 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 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 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 70 °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 du virus du syndrome de Taura ;
  - c) produits à base de crustacés pasteurisés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant au moins dix minutes 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 ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.6.2. autres que ceux énumérés au point 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 20 (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 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* 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 ci-après existent :
- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 d'infection par le virus du syndrome* de Taura, a perdu son statut indemne par suite de la détection d'une telle *maladie* mais les conditions ci-après sont réunies :
- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible le ~~risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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 au point 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 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 d'une telle *maladie* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque~~ la probabilité de nouvelle 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 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.

Annexe 20 (suite)

## 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 sous les points 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.

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* déclaré indemne ~~de~~ d'infection par le virus du syndrome de Taura conformément aux dispositions énoncées sous le point 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 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 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 9.6.7.

**Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.6.2. 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*, et attestant 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 *certificat* doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 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**

- 1) Lors de l'importation, à des fins d'*aquaculture*, d'*animaux aquatiques* vivants appartenant à des espèces visées à l'article 9.6.2. 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, si la situation le justifie, appliquer les mesures ci-après afin de réduire ce *risque* :
  - 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 le virus du syndrome de Taura.
- 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 du virus du syndrome de Taura 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 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 syndrome de d'infection par le virus du 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*.
- 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 9.6.3.

#### Article 9.6.9.

#### **Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.6.2. 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.6.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.6.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

#### Article 9.6.10.

#### **Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.6.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et

Annexe 20 (suite)

- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver le virus du syndrome de Taura.

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

Article 9.6.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 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 ~~de~~ de l'infection par le virus du syndrome de Taura, 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 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* susvisé à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.6.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 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 9.8.

**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), dans 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 sensibles suivantes, qui satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles figurant dans le 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 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 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 au moins 3,6 minutes ou à toute combinaison de température et de temps équivalente) et présentés en conditionnement hermétique ;
  - b) produits cuits à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 60 °C pendant au moins 60 minutes ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du MrNV responsable de la maladie des queues blanches ;
  - c) produits pasteurisés à base de crustacés ayant subi un traitement thermique à 90 °C pendant au moins dix minutes ou à toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation du MrNV responsable de 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 ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce visée à l'article 9.8.2. autres que ceux énumérés au point 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 21 (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 9.8.2. mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un ~~risque en termes de propagation de d'infection par le 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 ci-après sont réunies :

- a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 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 d'une telle *maladie* mais les conditions ci-après sont réunies :

- a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
- b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible ~~le risque la propagation~~ de nouvelle 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 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 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 au point 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 de 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 ci-après sont réunies :
  - a) aucune présence 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 la *maladie* n'était pas connu avant la mise en œuvre de la *surveillance ciblée* mais les conditions ci-après 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 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 d'une telle *maladie* dans la *zone* mais les conditions ci-après sont réunies :
  - a) dès la détection de la *maladie*, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
  - b) les populations infectées ont été détruites ou éliminées de la *zone infectée* par un moyen réduisant autant que possible la probabilité ~~le risque~~ de nouvelle 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 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 nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ~~de maladie des queues blanches~~ ait été décelée.

## Annexe 21 (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 sous les points 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 sous le point 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 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 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 9.8.7.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 et de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des espèces visées à l'article 9.8.2. 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, et attestant 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 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.

Ce certificat doit être conforme au modèle reproduit au chapitre 5.11.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises énumérées au point 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**

1) Lors de l'importation, à des fins d'aquaculture, d'animaux aquatiques vivants appartenant à des 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 :

- 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 de tous les effluents et de tous les déchets de manière à inactiver le MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches.
- 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 :

## Annexe 21 (suite)

- 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 MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches 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 du MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches 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 MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches 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 par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de maladie des queues blanches 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 9.8.3.

## Article 9.8.9.

**Importation d'animaux aquatiques et 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* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des 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 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, soit en l'un des produits énumérés au point 1 de l'article 9.8.3., soit en l'un des produits mentionnés au point 1 de l'article 9.8.11., soit en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement 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 la maladie des queues blanches ou de les éliminer de manière à prévenir leur contact avec des *espèces sensibles*.

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 à des fins autres que la consommation humaine.

## Article 9.8.10.

**Importation d'animaux aquatiques vivants appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques, 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 espèces visées à l'article 9.8.2. et qui sont appelés à entrer dans la composition d'aliments pour animaux ou destinés à des usages agricoles, industriels ou pharmaceutiques 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* en vue d'y être abattu et transformé en des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et

Annexe 21 (suite)

- 2) le traitement de l'eau de transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation de manière à inactiver le MrNV responsable de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* de la maladie des queues blanches.

Le présent article ne s'applique pas aux *marchandises* énumérées au point 1 de l'article 9.8.3.

## Article 9.8.11.

**Importation d'animaux aquatiques et 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 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* 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* susvisé à des fins autres que la consommation humaine.

- 2) Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à des espèces visées à l'article 9.8.2., à l'exclusion de ceux mentionnés au point 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.

## CHAPTER 2.2.X.

**ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE**

---

**1. Scope**

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) means infection with strains of *Vibrio parahaemolyticus* ( $V_{\text{AHPND}}$ ) and *V. harveyi* that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB.

**2. Disease information****2.1. Agent factors****2.1.1. Aetiological agent, agent isolates**

AHPND has a bacterial aetiology (Kondo *et al.*, 2015; Kwai *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; Liu *et al.*, 2014). It is caused by specific virulent strains of *Vibrio* species, including *V. parahaemolyticus* ( $V_{\text{AHPND}}$ ) 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.*, 2015; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within AHPND-causing *V. parahaemolyticus* ( $V_{\text{AHPND}}$ ) 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*. 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 bacteria, natural deletion of the Pir<sup>VP</sup> region may occur in a few individuals (Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences or transposase that flank the Pir toxin operon, and although different strains exhibit different levels of stability, when the deletion occurs, it means that a virulent strain of *V. parahaemolyticus* 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 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<sup>+</sup>), only progeny that inherit the PSK<sup>+</sup> plasmid will be viable. Progeny that do not inherit the PSK<sup>+</sup> 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  $V_{\text{AHPND}}$  producing PirA<sup>VP</sup> and PirB<sup>VP</sup>.

**2.1.2. Survival outside the host (i.e. in the natural environment)**

AHPND-causing strains of *V. parahaemolyticus* ( $V_{\text{AHPND}}$ ) would be expected to possess similar properties to other strains of *V. parahaemolyticus* found in seafood which have been shown to survive up to 9 and 18 days in filtered estuarine water and filtered seawater, respectively (Karunasagar *et al.*, 1987).

**2.1.3. Stability of the agent**

Experimental studies have shown that AHPND could not be transmitted via frozen infected shrimp (Tran *et al.*, 2013a). In addition, other strains of *V. parahaemolyticus* are known to be sensitive to freezing, refrigeration, heating and common disinfectants (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thompson & Thacker, 1973; Andrews *et al.*, 2000; Su & Liu, 2007).

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 a species as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*); giant tiger prawn (*P. monodon*).

**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; Nunan *et al.*, 2014; Leañó & Mohan, 2013; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013b). Interestingly, there is a report (de la Pena *et al.*, 2015) of disease outbreaks in the Philippines occurring as late as 46–96 days after pond-stocking.

**2.2.3. Species or sub-population predilection (probability of detection)**

Not applicable.

**2.2.4. Target organs and infected tissue**

Gut-associated tissues and organs.

**2.2.5. Persistent infection**

No data/not known.

**2.2.6. Vectors**

None are known, although since *Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment, the presence of vectors would not be unexpected.

**2.3. Disease pattern****2.3.1. Transmission mechanisms**

AHPND has been transmitted experimentally by immersion, in feed 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.

**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 was reported initially in 2010 from China (People's Rep. of), 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) (de la Pena *et al.*, 2015; Dabu *et al.*, 2015).

**2.3.4. Mortality and morbidity**

AHPND is characterised by sudden, mass mortalities (up to 100%) within 30-35 days of stocking grow-out ponds with PLs or juveniles (FAO, 2013; NACA, 2012) and can be reproduced experimentally (Joshi *et al.*, 2014a; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; and Tran *et al.*, 2013b).

### 2.3.5. Environmental factors (e.g. temperature, salinity, season, etc.)

Water sources with low salinity (<20 ppt) seem to reduce the incidence of the disease. Although AHPND can be found year round in South-East Asia, 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 AHPND in endemic areas (FAO, 2013; NACA, 2012).

## 2.4. Control and prevention

### 2.4.1. Vaccination

Not applicable.

### 2.4.2. Chemotherapy

Not applicable.

### 2.4.3. Immunostimulation

Not applicable.

### 2.4.4. Resistance breeding

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 etc. are all well-established practices that reduce the impact of disease, including AHPND (NACA, 2012).

## 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* 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 Davison'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).

Annexe 22 (suite)**3.3. Pooling of samples**

Samples, especially PL or specimens up to 0.5 g can be pooled for molecular testing. Larger shrimp should be processed individually.

**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 appropriate (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. Gross 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 are known.

**4.2.2. 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; Leaña & Mohan, 2013; NACA, 2012; 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013a; 2013b; 2014a; 2014b).

**4.2.3. Wet mounts**

Not applicable.

**4.2.4. Smears**

Not applicable.

**4.2.5. Fixed sections (for ISH)**

ISH is not currently available (October 2015).

**4.2.6. 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 identification may be carried out using 16S rRNA PCR and sequencing (Weisburg *et al.*, 1991), and their probable ability to cause AHPND using AHPND-specific PCR methods described in section 4.3.1.2.3.

*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).

*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 AHPND toxin genes. The AP3 method is a single-step PCR that targets the 12.7 kDa *pirA<sup>VP</sup>* gene (Sirikharin *et al.*, 2015). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing 104 isolates of 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 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 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.

## Annexe 22 (suite)

Alternatively, a nested PCR method, AP4, has been developed with a 100% positive predictive value for 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 AHPND-causing bacteria), allowing it to be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

In addition, real-time PCR (qPCR) methods, for example the AHPND-specific TaqMan qPCR 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 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

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 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 PCR primers for one-step PCR detection of 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. 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
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<sup>VP</sup></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<sup>VP</sup></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<sup>VP</sup></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<sup>VP</sup></i>	392bp	Han <i>et al.</i> , 2015a

#### 4.3.1.2.3.1.5 AP4 nested PCR primers for detection of AHPND bacteria

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.2. 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 4.2.** Primers for the AP4, nested PCR method for detection of 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	

#### 4.3.1.2.3.1.6 Primers and Probe for AHPND-specific qPCR

The primers and probe and target gene for the AHPND-specific qPCR are listed in Table 4.3.

**Table 4.3.** Primers and probe for the qPCR method for detection of 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> , 2015
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 10x PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 MgCl<sub>2</sub>, 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, 10x 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.

#### 4.3.1.2.3.1.10 Protocol for the AP4 nested PCR method

This protocol follows the method described by Sritnyalucksana *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10x PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 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<sup>-1</sup>) 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.

Annexe 22 (suite)

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10x PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 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<sup>-1</sup>) 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 qPCR 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 qPCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µM. qPCR 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 qPCR 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.

#### 4.3.1.2.3.1.13 Controls for all PCR methods

The following controls should be included in all 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 AHPND-affected shrimp tissue or DNA from an 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

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  $2 \times 10^8$  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  $2 \times 10^6$  cells ml<sup>-1</sup>. Shrimp are monitored at 6- to 8-hour intervals. Dead shrimp are processed for AHPND PCR and sequence analysis. Moribund shrimp are processed for histology, bacterial re-isolation and AHPND PCR and sequence analysis.

## 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	c	c	C	d
Bioassay	d	d	d	d	D	a
Histopathology	d	c	a	c	A	b
qPCR	d	a	a	a	A	b
Nested PCR and sequence	d	b	b	b	A	a
1-step PCR and Sequence	d	d	d	d	A	a

PL = postlarvae; PCR = polymerase chain reaction; qPCR = real-time PCR.

## 6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from AHPND

As indicated in Table 5.1, qPCR 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 suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Mortality associated with clinical signs of AHPND
- ii) Histopathology indicative of AHPND
- iii) Detection of Pir toxin genes by PCR or qPCR.

### 7.2. Definition of confirmed case

AHPND is considered to be confirmed if two or more of the following criteria are met:

- i) Histopathology indicative of AHPND
- ii) Detection of Pir toxin gene and pVA1 plasmid by PCR and sequence analysis
- iii) Positive results by bioassay (clinical signs, mortality, histopathology, PCR and sequence).

## 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 Additives and Contaminants* **19(7)**, 787-791.

DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANANGAS M.B.B. (2015). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquaculture Res.*, **2015**, 1–8 doi:10.1111/are.12923

Annexe 22 (suite)

DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRIUNYALUUCKSANA 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 PENNA 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. & 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 SCHRUYVER P., DEFOIRDT T. & SORGELOOS P. (2014). Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming? *PLoS Pathog.*, **10** (4), e1003919. doi: 10.1371/journal.ppat.1003919.

FAO (2013). Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPND) 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 pp.

FLEGEL T.W. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. *J. Invert. 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, 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 Announcements*, **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 Announcements*, **2**, e00800-14.

HAN J.E., TANG F.F.J., LIGHTNER D.V. & TRAN L. (2015a). *Photorhabdus* 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 F.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.

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., VENUGOPAL M.N., NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Systematic and Applied Microbiology* **9(3)**, 316-319.

KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2015). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, doi: 10.1111/jfd.12387.

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 Announcements*, **3**, e00978-15.

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 Announcements*, **2**, e00221-14.

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 2013, 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. AND 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. *Oceanologia Limnologia Sinica*, **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. *Letters in Applied Microbiology* **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 and the Pacific, Bangkok, Thailand.

NACA. (2014). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease Card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, 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., 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 and the Pacific, Bangkok, Thailand.  
Source: [http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article\\_id=2030](http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030).

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., THANH D.C., 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(5): 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 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 Microbiology* **24** (6): 549-558.

Annexe 22 (suite)

TANIGUCHI H., OHTA H., OGAWA M. & MIZUGUCHI Y. (1985). Cloning and expression of *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. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal* 6(3): 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 1 (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*, Vol. 10, Number 2, 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, 11–12.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R., LIGHTNER D.V. & FITZSIMMONS K. (2013a). EMS/AHPNS: Infectious disease caused by bacteria. *Global Aquaculture Advocate*, July/August 2013, 16–18.

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., BARNS 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 Announcements*. **2**, e00816-14.

\*

\* \*

## CHAPTER 2.2.1.

## INFECTION WITH CRAYFISH PLAGUE (*APHANOMYCES ASTACI* (CRAYFISH PLAGUE))

---

### 1. Scope

Infection with *Aphanomyces astaci* means infection with *A. astaci* Schikora, a member of the 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, are now considered protists and are classified with diatoms and brown algae in a group called the Stramenopiles or Chromista.

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 *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 23 (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-Uribeondo *et al.*, 1995).

## 2.2. Host factors

### 2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing a species as susceptible to infection with *Aphanomyces 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*, *A. 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).

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of Aquatic Code include: *Astacopsis fluviatilis*, *A. gouldi*, red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), yabby crayfish (*C. destructor*), *C. papuanus*, *Euastacus crassus*, *E. claydensis*, *E. kershawi*, *Geocheirax gracilis*, and Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

In addition, pathogen-specific positive PCR results have been reported in the following organisms but an active infection has not been demonstrated: *Orconectes cf. virilis*, *Procambarus fallax virginialis* and *Macrobrachium dayanum*.

Given the wide range of hosts found to meet some of all the criteria for susceptibility it is likely that other species, as yet untested or naturally exposed to *A. astaci*, may meet some or all criteria for susceptibility'

### 2.2.3. Susceptible stages of the host

All live stages need to be considered as susceptible to infection.

### 2.2.43. Species or subpopulation predilection (probability of detection)

The host species susceptible to infection with *A. astaci* fall largely into 2 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.

*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 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.

### 2.2.54. 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).

### 2.2.65. 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. Infection in naturalised or aquaculture reared North American crayfish populations is usually without development of clinical disease or mortalities.

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 low density Noble crayfish populations in cold water environments may be infected at low levels in a chronic infection (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

### 2.2.7.6. Vectors

There is good field and experimental evidence that movements of fish from areas in which there is a clinical outbreak of disease due to infection with *A. astaci* crayfish plague is active can transmit infection from one watershed to another (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2006).

*Fomites:* *A. astaci* can also be spread by contaminated equipment (nets, boots, clothing etc.).

## Annexe 23 (suite)

**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.

**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, 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 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 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 epidemic among the highly susceptible animals. The velocity of spread will depend, among other factors, on the prevalence of infection in the population of North American crayfish.

Fish 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 all three (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (nets, boots clothing, etc.).

**2.3.2. Prevalence**

In the highly susceptible European crayfish species, exposure to *A. astaci* spores is considered to lead to infection and eventually to death. The minimal 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 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 outbreak of crayfish plague in 2001 that was followed in subsequent years suggest that in sparse Noble crayfish populations, spread throughout the host population may be prolonged over a time span of several years.

Prevalence levels in North American crayfish appear to vary greatly. Limited studies suggest prevalence levels ranging from anywhere between 0 and 100% are possible (Oidtmann *et al.*, 2006).

**2.3.3. Geographical distribution**

First reports of large crayfish mortalities 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 until the 1890s, but the post-1960s extensions are largely linked to movements of North American crayfish introduced more recently for purposes of crayfish farming (Alderman, 1996). Escapes of such introduced species were almost impossible to prevent and *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii* are now widely naturalised in many parts of Europe.

Since North American crayfish serve as a reservoir of *A. astaci*, any areas where North American crayfish species are found have to be considered as areas where *A. astaci* is present (unless shown otherwise).

Australia and New Zealand have never experienced any outbreaks of crayfish plague to date and are currently considered free of the infection with *A. astaci* (OIE WAHID website, accessed June 2011).

#### 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 has some effect on 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 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/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 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 crayfish plague in the form of 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 occur at a wide temperature range, and at least in the temperature range from 4–20°C. The velocity 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 epidemic is enhanced by higher water temperatures. At low water temperatures, the epidemic curve can increase very slowly and the period during which mortalities are observed can be several months (B. Oidtmann, unpublished data).

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.–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<sub>2</sub> stimulates zoospore emergence from primary cysts, whereas MgCl<sub>2</sub> 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).

Annexe 23 (suite)**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. To avoid the main pathways of introduction, the following measures are necessary:

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 are being planned, it should be considered whether the source water may harbour infected crayfish (including North American carrier crayfish).
3. Any fish movements from the site of a current epidemic of crayfish plague carries a high risk of spread and should generally be avoided.
4. If fish movements from a source containing North American crayfish are being planned, fish harvest methods at the source site need to 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. Therefore prior to any planned release, 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, careful consideration needs to be given, as to whether such 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.

**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**

In the 125 years since crayfish plague first occurred in Europe, there is little evidence of resistant populations of European crayfish. However, the fact that North American crayfish are not very susceptible to developing clinical disease suggests that selection for resistance may be possible and laboratory studies using *A. astaci* strains attenuated for virulence might be successful. However, there are currently no published data 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 are potential hosts for *A. astaci*, restocking with North American crayfish would further the spread of *A. astaci*. 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 mention that they experimentally exposed *Astacus astacus* and *P. leniusculus* eggs to zoospore suspensions and were unable to induce infection (Unestam & Söderhäll, 1977). 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 established site, where the highly susceptible species are being farmed, the following recommendations should be followed to avoid an introduction of *A. astaci* onto the site:

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 must be prevented.
2. If fish transfers are being planned, these must not come from streams or other waters that harbour potentially infected crayfish (either susceptible crayfish populations that are going through a current outbreak of crayfish plague or North American carrier crayfish).
3. North American crayfish must not be brought onto the site.
4. Fish obtained from unknown freshwater sources or from sources, where North American crayfish may be present or a current outbreak of 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 that will kill *A. astaci* (see Section 2.1.3).
5. Any equipment that is brought onto site should be disinfected.
6. General biosecurity measures should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when site is entered; 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 crayfish plague in a population of highly susceptible crayfish species, the batch of crayfish selected for investigation for the presence of *A. astaci* should ideally consist of: a) live crayfish showing signs of disease, 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 temperatures deleterious to the animals. These can be attached at the inside bottom of the transport container. 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.

Annexe 23 (suite)

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/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 crayfish plague. Clinical signs of 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 laboratory (Oidtmann *et al.*, 1999). Molecular methods are now available that are less dependent on speed of 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 a crayfish plague mortality may be the presence 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 fall over on their backs and remain unable to right themselves. Often, however, unless waters are carefully observed, the first sign that there is a problem will 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 are present to allow infection to spread rapidly, particularly at summer water temperatures, infection will spread quickly and stretches of over 50 km may lose all their crayfish in less than 21 days from the first observed mortality (D. Alderman, pers. comm.). 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 *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).

## 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. Additionally, such material does not prove that any hyphae observed are those of the primary pathogen. 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.

Annexe 23 (suite)**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 the presence of hyphae pervading the cuticle and 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 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 H<sub>2</sub>O) clean disposable paper towel. Simple aseptic excision of infected tissues, which are then placed as small pieces (3–5 mm<sup>2</sup>) 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).

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. Parafilm<sup>2</sup>) 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 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 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.

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 23 (suite)

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). 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 ( $\geq 3:1$  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 H<sub>2</sub>O) 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.

##### 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  $\mu$ l reaction volume containing 1  $\times$  PCR buffer 75 mM Tris/HCl, pH 8.8, 20 mM [NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% (v/v) Tween 20), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each of dATP, dCTP, dTTP, and dGTP, 0.5  $\mu$ M 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  $\mu$ l 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).

Annexe 23 (suite)*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 needs to 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 a crayfish plague outbreak is investigated, the test sensitivity in animals that had died of 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 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 of crayfish plague (*Aphanomyces 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.

**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 <sup>1</sup>
qPCR	a	b or a <sup>1</sup>
Sequencing of PCR products	n/a	a
Transmission EM	d	d
Antibody-based assays	n/a	n/a
<i>In-situ</i> DNA probes	n/a	n/a

PCR = polymerase chain reaction; qPCR = quantitative (real-time) PCR; 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

## Annexe 23 (suite)

Method	Screening method	Confirmatory method
PCR	a	b, possibly a <sup>1</sup>
qPCR	a	b, possibly a <sup>1</sup>
Sequencing of PCR products	n/a	a
Transmission EM	d	d
Antibody-based assays	n/a	n/a
<i>In-situ</i> DNA probes	n/a	n/a

PCR = polymerase chain reaction; qPCR = quantitative (real-time) PCR; 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
qPCR	a	b
Sequencing of PCR products	n/a	a
Transmission EM	d	d
Antibody-based assays	n/a	n/a
<i>In-situ</i> DNA probes	n/a	n/a

PCR = polymerase chain reaction; qPCR = quantitative (real-time) PCR; 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 would need to 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 fish stocks from infected waters present a risk of pathogen transmission, monitoring the status of crayfish populations to confirm that they remain healthy, is necessary.

In a farm setting, an infection with ~~crayfish plague~~ *A. astaci* should be noticed relatively quickly, due to 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 would need to 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

#### *Highly susceptible crayfish species*

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.

#### *North American crayfish species*

Any population of North American crayfish is generally to be regarded as potentially infected with *A. astaci*.

### 7.2. Definition of confirmed case

#### *Highly susceptible crayfish species*

Confirmation of presence of *A. astaci* by PCR or qPCR and sequencing.

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  $\leq 30$ ), and (3) the investigated suspect case is not the first case of detection of *A. astaci* in the country or region, the PCR result alone may be considered sufficient as a confirmation.

#### *North American crayfish species*

Confirmation of presence of *A. astaci* by PCR or qPCR and sequencing

## 8. References

ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15** (2), 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. *Aquaculture and Fisheries Management*, **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.

Annexe 23 (suite)

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 URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHALL 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. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, **372–373**, 281–288.

HUANG, T.S., CERENIUS L. & SÖDERHALL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–10.

NINNI A.P. (1865). Sulla mortalità dei gambari (*Astacus fluviatilis* L.) nel veneto e più particolarmente nella provincia trevigiana. *Atti Inst. Veneto Ser. III*, **10**, 1203–1209.

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.

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.~~

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. *Freshwater Crayfish*, **6**, 182–186.

SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFFNER P. (eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.

SVENSSON E. & UNESTAM T. (1975). Differential induction of zoospore encystment and germination in *Aphanomyces astaci*, Oomycetes. *Physiologia Plantarum*, **35**, 210–216.

TUFFS S & OIDTMANN B (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153** (3–4), 345–353.

UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiologia Plantarum*, **19**, 1110–1119.

UNESTAM T. (1969a). On the adaptation of *Aphanomyces astaci* as a parasite. *Physiologia Plantarum*, **22**, 221–235.

~~UNESTAM T. (1969b). Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. Report Institute Freshw. Res., 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. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshw. Crayfish*, **15**, 376–382.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSSTRÖM 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** (5), 182–188.

VRÅLSTAD T., JOHNSEN S.I., FRISTAD R., EDSMAN L. & STRAND D.A. (2011). Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 75–83.

VRÅLSTAD T., KNUITSEN 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.

\*  
\* \*



## CHAPTER 2.2.2.

## 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 infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) of the genus *Brevidensovirus* 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 to the genus *Brevidensovirus*, *Penstyldensovirus* family *Parvoviridae* with the species name of *PstDNV* (for *Penaeus stylirostris densovirus*) (Fauquet *Decapod penstyldensovirus* 1 (King *et al.*, 2005-2012). 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<sup>-1</sup> 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 are found embedded in the genome of penaeids 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). The putative IHHNV sequences in the *P. monodon* genome are not infectious to the 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 24 (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 IHNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), white leg shrimp (*P. vannamei*), blue shrimp (*P. stylirostris*), yellow leg shrimp (*P. californiensis*), northern white shrimp (*P. setiferus*) and giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).

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; Castillo *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 or 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 (*P. 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. japonicas*), *P. semisulcatus*, *Hemigrapsus penicillatus*, *Artemesia longinarus*, *Callinectes arcuatus*, *Archirus mazatlanus*, *Gerres cinerus*, *Oreochromis sp.*, *Lile stolifera* and *Centropomus medium*.

**2.2.32. Susceptible stages of the host**

Infection with 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 IHNV 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

IHNV 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 IHNV 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 IHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHNV 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 IHNV positive included the brown shrimp, *P. californiensis* and the Western white shrimp *P. occidentalis*. In farms where IHNV 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

IHNV 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, infection with IHNV is commonly found in wild penaeid shrimp in the eastern Pacific from Peru to Mexico. Although infection with IHNV 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). IHNV 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).

~~Infectious~~ The IHNV was detected for the first time in farmed prawns in Australia in 2008. Additionally an IHNV-like virus sequence has been reported from Australia (Krabsetsve *et al.*, 2004; Owens *et al.*, 1992), and the presence of IHNV in farmed prawns in Australia was reported to the OIE in 2008. As discussed in Section 2.1.1, IHNV-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 24 (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, IHHN may take three distinct forms: populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with by 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 by IHHNV results in a more subtle, chronic disease, 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 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, 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 lower viral load than shrimp held at 24°C. However, even at the higher temperature, significant (up to 105 virus copies 50 ng<sup>-1</sup> 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

Selected stocks of *P. stylirostris* that are resistant to infection with IHHNV 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 lines of *P. stylirostris* bred for IHHNV resistance were found to be refractory to infection (Tang et al., 2000). However, such stocks do not have increased resistance to diseases such as white spot syndrome virus (WSSV), and, hence, their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHHN 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-resistant *P. stylirostris* (Clifford, 1998; Lightner, 1996a; Weppe, 1992; Zarin-Herzberg & Ascencio 2001). The relative resistance of *P. vannamei* to clinical IHHN disease, 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

Infection with 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 pathogenic agents), the method is not effective for preventing transmission of IHHNV (Motte *et al.*, 2003).

#### 2.4.8. General husbandry practices

Some husbandry practices have been successfully ~~applied to in the prevention~~ applied to in the prevention of ~~infection~~ infection with IHHNV infections and clinical disease. Among these has been the application of PCR pre-screening of wild or pond-reared broodstock and/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 IHHN (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~~ with IHHNV are all life stages (eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) (Motte *et al.*, 2003). While infection with IHHNV may ~~infect affect~~ 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 suitable samples for ~~IHHNV detection or certification of for IHHN freedom~~ IHHNV detection or certification of for IHHN 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 24 (suite)

### 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/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 is required.

#### 4.1.2. Behavioural changes

In acute clinical ~~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 in *Penaeus stylirostris*

Infection with IHHNV often causes an acute clinical disease with very high mortalities in juveniles 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 and/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 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 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 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 of 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 & Quintio, 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 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 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 less the abdomen) is immersed in fixative for from 24 to no more than 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).

*In-situ* hybridisation (see Section 4.3.1.2.3 below).

Annexe 24 (suite)**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/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*<sup>TM</sup>. *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<sup>TM</sup>.~~

*Dot-blot hybridisation procedure for IHHNV:* the dot-blot hybridisation 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) 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 tetra-acetic acid]) buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) plus 50 µg ml<sup>-1</sup> salmon sperm DNA, using ~~4 µl sample in 9 µl buffer in 1.5 ml microcentrifuge tubes~~. Samples for dot-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.~~
- vii) 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.
- viii) Boil the DIG-labelled probe for ~~40 3-5~~ minutes, 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.
- viii) 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
<i>(use 4 ml/filter and seal in bags)</i>		
Buffer I	1 ×	5 minutes at room temperature
Buffer II	1 ×	<del>30 minutes at room temperature</del>
Buffer I	1 ×	<del>5 minutes at room temperature</del>
<i>(Buffers are prepared ahead of time).</i>		
- ix) React the membrane in bags with anti-DIG AP ~~alkaline phosphatase~~ conjugate (Roche Diagnostics<sup>3</sup> 1-093-274) diluted 1/5000 in Buffer I. ~~Use 3 ml per membrane~~; incubate for 30–45 minutes at room temperature on a shaker platform.
- x) Wash membrane well with:
 

Buffer I	2 ×	15 minutes at room temperature
Buffer III	1 ×	5 minutes at room temperature
- xi) 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.
- xii) Photograph the results (colour fades over time).

<sup>3</sup> 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 24 (suite)

- xiii) Store dry membranes in heat-seal bags.

In-situ hybridisation (ISH) procedure: the ISH method given below uses a 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.~~

- 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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).

- xvii) Examine the slides under bright-field for a dark-blue or black precipitate that marks sites where IHHNV 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 x phosphate buffered saline~~

NaCl	160 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	4 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	23 g
KCl	4 g
DD-H <sub>2</sub> O	1950 ml (qs to 2 litres)

~~pH to 8.2 with NaOH; autoclave to sterilise; store at room temperature. To make 1 x PBS, dilute 100 ml 10 x PBS in 900 ml DD-H<sub>2</sub>O; Filter 1 x solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

- ii) ~~10 x Tris/NaCl/EDTA (TNE) buffer~~

Tris base	60.57 g
NaCl	5.84 g
EDTA	3.72 g
H <sub>2</sub> O	900 ml (qs to 1 litre)

~~pH to 7.4 with concentrated or 5 M HCl. To make 1 x TNE, dilute 100 ml 10 x TNE in 900 ml DD-H<sub>2</sub>O; Filter 1 x solution through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

- iii) ~~Proteinase K, 100 µg ml<sup>-1</sup> (prepare just prior to use)~~

PBS	10 ml 1 x PBS
Proteinase K	1 mg

- iv) ~~0.4% formaldehyde~~

37% formaldehyde	5.4 ml
DD-H <sub>2</sub> O	500 ml

~~Store at 4°C; can be reused up to four times before discarding.~~

- v) ~~Prehybridisation buffer (50 ml final volume)~~

4 x SSC	10 ml 20 x SSC
50% formamide	25 ml 100% formamide
1 x Denhardt's	2.5 ml 20 x Denhardt's
5% dextran sulphate	10 ml 25% dextran sulphate
Warm to 60°C	

~~Boil 2.5 ml of 10 mg ml<sup>-1</sup> salmon sperm DNA and add to buffer for final concentration of 0.5 mg ml<sup>-1</sup> salmon sperm DNA; store at 4°C.~~

- vi) ~~20 x SSC buffer~~

3M NaCl	175.32 g NaCl
0.3 M Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O	88.23 g Na citrate·2H <sub>2</sub> O
DD-H <sub>2</sub> O	1000 ml (qs)

~~pH to 7.0; autoclave; store at 4°C.~~

~~To make 2 x SSC, dilute 100 ml 20 x SSC in 900 ml DD-H<sub>2</sub>O; To make 1 x SSC, dilute 50 ml 20 x SSC in 950 ml DD-H<sub>2</sub>O; To make 0.5 x SSC, dilute 50 ml 20 x SSC in 1950 ml DD-H<sub>2</sub>O. Filter solutions through a 0.45 µm filter; store at 4°C.~~

- vii) ~~20 x 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 <sub>2</sub> 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.~~

## Annexe 24 (suite)

- viii) ~~25% dextran sulphate~~
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Dextran sulphate    | 25 g   |
| DD-H <sub>2</sub> O | 100 ml |
- Mix to dissolve; store frozen in 10 ml aliquots.
- ix) ~~Salmon sperm DNA (10 mg ml<sup>-1</sup>)~~
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Salmon sperm DNA    | 0.25 g |
| DD-H <sub>2</sub> 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 x Buffer I~~
- |                     |                   |
|---------------------|-------------------|
| 1 M Tris/HCl        | 121.1 g Tris base |
| 1.5 M NaCl          | 87.7 g NaCl       |
| DD-H <sub>2</sub> O | 1000 ml (qs)      |
- pH to 7.5 with HCl. Autoclave; store at 4°C.  
To make 1 x Buffer I, dilute 100 ml of 10 x stock in 900 ml DD-H<sub>2</sub>O. 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 1-096-476) |
| Buffer I         | 50 ml 1 x 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 <sub>2</sub> O | 100 ml (qs)      |
- pH to 9.5 with HCl  
Then add:  
50 mM MgCl<sub>2</sub> 1.02 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.
- xvii) ~~10% polyvinyl alcohol (PVA)~~
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Polyvinyl alcohol   | 10 g   |
| DD-H <sub>2</sub> 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 <sup>-1</sup> in 70% dimethylformamide<br>(Roche Diagnostics 1-383-213)  |
| 3.5 µl X-phosphate | 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate, toluidine salt<br>(50 mg ml <sup>-1</sup> in dimethylformamide)<br>(Roche Diagnostics 1-383-221) |
- xix) ~~Buffer IV~~
- |                     |   |
|---------------------|---|
| 10 mM Tris/HCl      | 1.21 g Tris base                              |
| 1 mM EDTA           | 0.37 g EDTA·2H <sub>2</sub> O (disodium salt) |
| DD-H <sub>2</sub> O | 1000 ml                                       |
- pH to 8.0 with HCl. Filter through a 0.45 µm filter; store at 4°C.
- xx) ~~0.5% Bismarck Brown Y~~
- |                     |        |
|---------------------|--------|
| Bismarck Brown Y    | 2.5 g  |
| DD-H <sub>2</sub> 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.*, 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; Saksmerprome *et al.*, 2011; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). PCR primers have been developed that can detect the IHHNV viral sequence but do not react with IHHNV-related sequences present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprome *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHHNV types 1 and 2 (the infectious forms of infection with 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 and/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> , 2000)
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; 2007)
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.

General PCR method for IHHNV: the PCR method described below for IHHNV generally follows the methods outlined in Tang *et al.* (2007) and Nunan *et al.* (2000). Cumulative experience with the technique has led to modifications with respect to template (DNA extraction of clinical specimens), methods, choice of primers (Table 4.1), and volume of reaction.

## Annexe 24 (suite)

- 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 IHHNV: (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 IHHNV-infected material, or primers 77012F and 77353R, which elicit a band 356 bp in size from IHHNV-infected material. Prepare primers at  $400\ \mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$  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 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
		1 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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 IHHNV.

*Real-time PCR* (qPCR) method for IHNV: qPCR 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 qPCR 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 qPCR 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 15 seconds 1 second and annealing/extension at 60°C for 1 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).

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.

## Annexe 24 (suite)

PCR commercial kits are available for IHHNV 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 IHHN are not available.

### 5. Rating of tests against purpose of use

The methods currently available for surveillance, detection, and diagnosis of infection with IHHNV 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.** *Infection with* IHHNV surveillance, detection and diagnostic methods

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	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	d	b	b	a	a
PCR, qPCR	a	a	a	a	a	a
Sequence	d	d	d	d	d	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; qPCR = real-time polymerase chain reaction.

### 6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis

As indicated in Table 5.1, PCR 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 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 IHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Clinical signs indicative of Infection with IHNV and a positive result by *in-situ* hybridisation
- or
- ii) Histopathology indicative of Infection with IHNV and a positive result by *in-situ* hybridisation.

### 7.2. Definition of confirmed case

Infection with IHNV 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 IHNV 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. (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). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV 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 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 IHNV 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.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV 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 (IHNV) 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 IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, **122**, 133–146.

Annexe 24 (suite)

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 IHNV) 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). IHNV virus and intensive culture of *Penaeus vannamei*: effects of stocking density and water exchange rates. *J. Crustacean 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. (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). IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquaculture 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, 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, 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 Marine Science Symposia*, **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 Aquaculture. 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 Pathology*, **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, pp. 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.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., BELL T.A. & BROCK J.A. (1983b). Detection of IHHN 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 Aquaculture. Soc.*, **16**, 267–274.

Annexe 24 (suite)

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. *The Progressive Fish Culturist*, **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 (IHHNV) 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 Aquaculture 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 IHHNV 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., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV 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 (IHHNV) 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 (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World Aquaculture Soc.*, **32**, 330–334.

OWENS L., ANDERSON I.G., KENWAY M., TROTT L. & BENZIE J.A.H. (1992). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in a hybrid penaeid prawn from tropical Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 219–228.

PANTOJA C.R., LIGHTNER D.V. & HOLTSCHMIT K.H. (1999). Prevalence and geographic distribution of IHHN 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. Crustacean 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](http://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** (1–2), 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. *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) 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.

\*  
\* \*



## CHAPTER 2.2.3.

## INFECTION WITH INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS

---

### 1. Scope

Infection with infectious myonecrosis virus means infection with infectious myonecrosis virus (IMNV), which 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<sup>-1</sup> 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 *P. vannamei* stocks from Brazil) indicate that the virus 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 ~~infection with IMNV-IMN~~, but which are caused by two different types of virus: a nodavirus named *Panaeus vannamei* novavirus – PvNV (Tang *et al.*, 2007) and a nodavirus named *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus – *MnV* (see Chapter 2.2.7 ~~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 25 (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 a species as susceptible to infection with IMNV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: brown tiger prawn (*Penaeus esculentus*), banana prawn (*P. merguensis*), white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

The principal host species in which IMNV is known to cause significant disease outbreaks and mortalities in farmed populations is *Penaeus 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 (*Penaeus 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*).

**2.2.3.2. 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).

**2.2.4.3. Species or subpopulation predilection (probability of detection)**

No data.

**2.2.5.4. 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).

**2.2.6.5. 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.~~

**2.2.7.6. Vectors**

There are no specific data on vectors. However, because of its non-enveloped particle structure, it is possibly 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).

**2.2.7. 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 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, sudden changes in water salinity or temperature, etc. 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).

### 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 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

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 (Sutanto, 2011). There are unofficial and anecdotal reports of 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. 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 25 (suite)**2.4.5. Restocking with resistant species**

While there are no published reports, some shrimp farms in Indonesia are believed have stocked *P. monodon* and *P. stylirostris* because of data from a preliminary study showing these species to be 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 pathogens 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 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 and/or their spawned eggs/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 viral pathogens of shrimp, and should be applicable to control and prevent infection with IMNV-IMN disease (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

**3. Sampling****3.1. Selection of individual specimens**

Specimens suitable for testing for IMNV infection using molecular methods (e.g. RT-PCR, nested RT-PCR, qRT-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 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.

**3.4. Best organs or tissues**

IMNV infects tissues of mesodermal origin. The principal target tissues in the acute phase of 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/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~~.

#### 4.1.2. Behavioural changes

Only shrimp with 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.

#### 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 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).

Annexe 25 (suite)

Significant hypertrophy of the LO caused by accumulations of LO 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 (q)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 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 (i.e. Qiagen RNA extraction kit, Promega and Roche RNA purification kit recommend using 25–50 mg of tissue<sup>4</sup>). 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)

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 <sub>2</sub> 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 <sup>-1</sup> ) RT/Taq enzyme mix	1.0 µl	0.62 µM
Primer R (100 ng µl <sup>-1</sup> )	1.0 µl	0.62 µM
Mn(Oac) <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 µl	2.5 mM
rTth Enzyme (2.5 U µl <sup>-1</sup> )	6.5 1.0 µl	0.1 U µl <sup>-1</sup>
RNA template <sup>1</sup>	1–5 5.0 µl	1–50 ng total RNA

<sup>1</sup>Template must be boiled for 3 minutes and chilled on ice just prior to adding to reaction mix.

<sup>4</sup> 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 25 (suite)

RT-PCR thermal cycling conditions:

PCR Primers	Temperature (°C)	Time	No. cycles	Amplicon length
4587F/4914R	60, 95	30 minutes, 2 minutes	1	328 bp
	95, 60, 62	45 seconds, 45 seconds	39	
	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 <sub>2</sub> O	22.5 <u>23</u> µl	–
Primer NF (100 ng µl <sup>-1</sup> 10 µM)	4.0 <u>0.5</u> µl	0.465 <u>0.2</u> µM
Primer NR (100 ng µl <sup>-1</sup> 10 µM)	4.0 <u>0.5</u> µl	0.465 <u>0.2</u> µM
Template <sup>2</sup>	0.5 <u>1.0</u> µl	–

<sup>2</sup>Template 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
4725 NF/ 4863 NR	95	2 minutes	1	139 bp
	95, 65, 72	30 seconds, 30 seconds, 30 seconds	39	
	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, ~~12.5 µl~~ TaqMan Master mix (2×), ~~0.625 µl~~ Multiscribe mix (40×), 300 nM each primer IMNV412F and IMNV545R, 200 nM

IMNVp1TaqMan 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 15-3 seconds and 60°C for 4 minute. The IMNV RNA copy number 30 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

#### 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 Infectious myonecrosis 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	d	d	c	c	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	d
DNA probes (ISH)	d	d	a	a	a	a
Nested RT-PCR	a	a	a	a	a	a
qRT-PCR	d	c	a	a	a	a

PLs = postlarvae; LM = light microscopy; EM = electron microscopy; ISH = *in-situ* hybridisation (ISH); RT-PCR = reverse-transcription polymerase chain reaction; qRT-PCR = quantitative (real-time) RT-PCR.

Annexe 25 (suite)**6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from infectious myonecrosis**

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**

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 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):

- Histological demonstration of diagnostic acute, transition or chronic-phase IMNV lesions in the striated muscles and/or the LO.
- ISH positive (with a 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.
- One step or nested RT-PCR, or real time qRT-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.

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.

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., CHAIVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANY 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 Aquaculture 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., DUSTIN LOY 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. doi: 10.1099/vir.0.000137. Epub 2015 Apr 2.
- 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., 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** (6), 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, 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.

Annexe 25 (suite)

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.

\*  
\* \*

## CHAPTER 2.2.4.

## INFECTION WITH *HEPATOBACTER PENA EI* (NECROTISING HEPATOPANCREATITIS)

---

### 1. Scope

~~Infection with *Hepatobacter penaei* means infection with Candidatus *Hepatobacter penaei*, an obligate intracellular bacterium of the Order  $\alpha$ -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 Rio-Rodriguez *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 *H. penaei* is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium preliminarily called Candidatus *Hepatobacter penaei* (Nunan *et al.*, 2013). It is a member of the  $\alpha$ -subclass of proteobacteria (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 x 0.9  $\mu$ m), whereas the helical form (0.25 x 2–3.5  $\mu$ m) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy *et al.*, 1996a; 1996b). Genetic analysis of the NHPB-Candidatus *H. penaei* associated with North and South American outbreaks of NHP suggest that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy *et al.*, 1996a; 1996b).~~

##### 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 –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 26 (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. hepatobacter penaei* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: white leg shrimp (*Penaeus 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: northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*), blue shrimp (*P. stylirostris*), banana prawn (*P. merguensis*), Aloha prawn (*P. marginatus*), northern brown shrimp (*P. aztecus*) and giant tiger prawn (*P. monodon*).

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: 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* (Frelier *et al.*, 1995; Lightner, 1996). *Penaeus setiferus* is reportedly less susceptible to disease than *P. vannamei* (Frelier *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).

**2.2.3.2. Susceptible stages of the host**

NHPB infection with *H. penaei* has been demonstrated in juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei*.

**2.2.4.3. Species or sub-population predilection**

See Sections 2.2.1 and 2.2.2.

**2.2.5.4. Target organs and infected tissue**

The target tissue is the hepatopancreas, with NHPB infection with *H. penaei* reported in all hepatopancreatic cell types.

**2.2.6.5. 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 pass it on to other populations by horizontal transmission (Aranguren *et al.*, 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2008; 2010; Vincent & Lotz, 2005).

Natural transmission of NHPB-Candidatus *H. penaei* is thought to occur *per os* by cannibalism (Frelier *et al.*, 1993; 1995; Johnson, 1990; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010), although cohabitation and dissemination of NHPB-Candidatus *H. penaei* via the water column may also play a role (Frelier *et al.*, 1993; 1995). NHPB-Candidatus *H. penaei* 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 clinical disease are often preceded by prolonged periods of high water temperature (approximately 30°C) and salinity (up to 40 parts per thousand [ppt]) (Frelier *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

Transmission of ~~NHPB-Candidatus~~ *H. penaei* can be horizontal by cannibalism; transmission by contaminated water has 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).

### 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); 0.77% in *P. vannamei*, and 0.43% in *P. stylirostris* collected from Tumbes Region, Peru (Lightner & Redman, 1994).

Some reported mean values for ~~NHPB-Candidatus~~ *H. penaei* prevalence in shrimp farms are 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 replication rate of ~~NHPB-Candidatus~~ *H. penaei* increases at lengthy periods of high temperatures (>29°C) and salinity changes (20–38%). 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 infection with *H. paeni* is detected in the initial phase (Frelief *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 infection.
- b) Shrimp starvation and cannibalism of shrimps with ~~NHPB-infection with~~ *H. penaei*, as well as positive conditions for ~~NHPB-Candidatus~~ *H. penaei* cultivation, are important factors for ~~NHPB-Candidatus~~ *H. penaei* propagation in *P. vannamei*.

Annexe 26 (suite)

- c) The use of quick hydrated lime (Ca(OH)<sub>2</sub>) to treat pond bottoms during pond preparation before stocking can help reduce the incidence of NHPB infection with *H. penaei*.
- d) Preventive measures can include raking, tilling and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged sun drying 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.

**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**

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 pathogenic agents).

**2.4.8. General husbandry practices**

Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of NHPB-Candidatus *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 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/age) may be necessary to obtain sufficient sample material (extracted nucleic acid) to run a diagnostic assay. See also Chapter 2.2.0.

### 3.4. Best organs or tissues

NHPB-Candidatus *H. penaei* infects most enteric tissue. The principal target tissue for NHPB-Candidatus *H. penaei* is 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; Frelief *et al.*, 1993; Lightner, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2012).

### 3.5. Samples/tissues those are not suitable

NHPB-Candidatus *H. penaei* do 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-infection with *H. penaei* 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, ablated, and marginal water quality (i.e. 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.

#### 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 infection 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* shows 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).

## Annexe 26 (suite)

**4.2.3.1. Initial phase of infection with *H. penaei*-necrotising hepatopancreatitis**

Initial ~~NHPB-disease~~ 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 to 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 in 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-disease~~ 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-disease~~ 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<sup>-1</sup> organism<sup>-1</sup>) and cell detachment.

*Acute phase:* infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules (6–10 field<sup>-1</sup> organism<sup>-1</sup>), encapsulation present in different regions of the sample, which is atrophied tubules surrounded by multiple layers of haemocytes.

*Transition phase:* infiltration of haemocytes, increased numbers of deformed tubules (11–15 field<sup>-1</sup> organism<sup>-1</sup>), 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.

##### 4.3.1.2. Agent isolation and identification

###### 4.3.1.2.1. Cell culture/artificial media

~~NHPB-Candidatus *H. 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*~~ according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004).

###### 4.3.1.2.3. Molecular techniques

ISH and PCR tests for ~~NHPB~~ infection with *H. penaei* have been developed, and PCR kits for ~~NHPB~~ are commercially available. PCR tests for infection with *H. penaei* have been developed and a number of methods and commercial products using these methods are available (Loy & Frelief, 1996; Loy *et al.*, 1996b). Gene probes and PCR methods provide greater diagnostic sensitivity than do classic histological approaches to ~~NHP~~-diagnosis of infection with *H. penaei*. Furthermore, these methods have the added advantage of being applicable to non-lethal testing of valuable broodstock shrimp.

## Annexe 26 (suite)

## 4.3.1.2.3.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled probes for NHPB-Candidatus *H. penaei* may be produced in the laboratory. The ISH method of Loy & Frelief (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 & Frelief, 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 2.2.2 IHHN 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 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. 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)<sup>5</sup>.
- 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.
- 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<sup>-1</sup>), 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 the 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).

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*.

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the 16S, rRNA gene of NHPB-Candidatus *H. penaei* (GenBank U65509) (Loy & Frelief., 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. A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, purified bacteria, or DNA extracted from NHPB-CHp-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).

#### 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 *H. penaei*~~ is unculturable using traditional bacteriological methods, thus NHPB-infection with *H. penaei* must be maintained through continual exposure of uninfected *L. vannamei* stock to a population undergoing an NHPB-infection with *H. penaei* epizootic.

#### 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	c	c	b	d
Bioassay	d	d	d	d	c	d
Direct LM	d	d	c	d	c	d
Histopathology	d	b	b	c	a	b
<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	b	b
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 suspect case

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

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 NHPB-infection with *H. penaei*-type lesions.
- PCR positive results for NHPB-infection with *H. penaei*.

## 8. References

- AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-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.
- 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. & 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 Aquaculture 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. (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.
- 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., GARSON J., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M., SHIPLEY G., VANDESOMPELE J. & WITTEWER C. (2009). The MIQE guidelines: minimal information for publication of quantitative realtime PCR experiments. *Clin. Chem.*, **55** (4), 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 RÍO-RODRÍGUEZ R.E., SOTO-RODRÍGUEZ 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**, 606–209.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.

Annexe 26 (suite)

- 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., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN 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-GÁMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Ciencias Marinas*, **33**, 1–9.
- JOHNSON S.K. (1990). Handbook of Shrimp Diseases. Texas A&M Sea Grant College Program, Galveston, TX, USA.
- ~~JORY 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 Aquacult. 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. & 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. (1996b). 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., LOZANO-OLVERA R.Y. & HERNÁNDEZ-SILVA A.J. (2010). Necrotizing hepatopancreatitis in cultured shrimp caused by extracellular and intracellular bacteria. *Tilapia & Camarones*, **5**, 33–39.
- MORALES-COVARRUBIAS M.S., LEMUS-PEREIRA A.M., SOLÍS MONTIEL V.T., RUÍZ-LUNA A. & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Científica FCV-LUZ*, **XXI** (5), 434–446.

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., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ 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. Científica, FCV-LUZ*, **XXII** (1), 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.

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 stock *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 265–268.

\*  
\* \*



## CHAPTER 2.2.5.

**INFECTION WITH TAURA SYNDROME VIRUS****1. Scope**

Infection with Taura syndrome virus means infection with Taura syndrome virus (TSV) of the 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 is TSV, as described by Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) 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<sup>-1</sup>. 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:* Taura syndrome 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 Taura syndrome (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

**2.1.2. Survival outside the host**

No information available.

## Annexe 27 (suite)

**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 a species as susceptible to infection with TSV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) include: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*), blue shrimp (*P. stylirostris*), northern white shrimp (*P. setiferus*), greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*), giant tiger prawn (*P. monodon*) and northern brown shrimp (*P. aztecus*).

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 to infection with TSV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code include: fleshy prawn (*P. Chinensis*), giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), *Ergasilus manicatus*, *Chelonibia patula* and *Octolasmis muelleri*.

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 (*Panaeus duorarum*), kuruma prawn (*P. japonicas*), southern white shrimp (*P. schmitti*), *Fundulus grandis*, *Callinectes sapidus*, *Uca vocans*, *Sesarma mederi* and *Scylla serata*.

**2.2.32. Susceptible stages of the host**

TSV has been documented in all life stages (i.e. PL, juveniles and adults) of *P. vannamei* (the most economically significant of the two principal host species) except in eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

**2.2.43. Species or subpopulation predilection (probability of detection)**

No data.

**2.2.54. 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 by 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).

**2.2.65. Persistent infection with lifelong carriers**

Some members of populations of *P. vannamei* or *P. stylirostris* that survive 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*) (Garza *et al.*, 1997); and chickens (*Gallus domesticus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) (Vanpatten *et al.*, 2004), thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastro-intestinal system of any bird species. These findings indicate that birds may act as a mechanical vector for the transmission of the virus. However, there is no epidemiological evidence to suggest that this is an important route of spread between farms or farming regions.

~~*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. pooled 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

Taura syndrome 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 TS 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 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 endemic in farmed stocks, the prevalence of 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).

*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, infection with TSV have 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 endemic 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).

Annexe 27 (suite)

*Asia and the Middle East:* 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* (Chang *et al.*, 2004; Lightner, 2011; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005). Recently During 2010 and 2011, TSV has also been 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

In on-farm Taura syndrome epizootics involving unselected (i.e. not selected for TSV resistance) stocks of *P. vannamei*, the principal host species for 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 Taura syndrome 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

After Taura syndrome emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to TSV (genotype 1, MA1 Type A). Following from this discovery and due to 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 TS in Central America, improved TS 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 TSV infection 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 TSV might be transmitted vertically (transovarian transmission), despite no published report 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 TSV infections and disease occurring during farm grow-out. These include the application of polymerase chain reaction (PCR) prescreening of wild or pond-reared broodstock and/or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), fallowing 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 TS. 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 by 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 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.

#### 3.4. Best organs and tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of TS 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/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 by TSV.

## 4. Diagnostic methods

### 4.1. Field diagnostic methods

#### 4.1.1. Clinical signs

Only acute-phase 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 disease.

#### 4.1.2. Behavioural changes

Only shrimp with acute-phase 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 Taura syndrome outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicate the presence of a serious disease outbreak (which is often either Taura syndrome or WSD when sea birds are observed) to the farm manager.

### 4.2. Clinical methods

#### 4.2.1. Gross pathology

Taura syndrome 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 TS are unique and provide a presumptive diagnosis of infection with TSV.

*Acute phase:* gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase TSV infection 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  $\times 10$  hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute Taura syndrome 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 epizootics, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a tentative diagnosis of 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 resolving 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 the disease in which persistently infected shrimp show no obvious clinical 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 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 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 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, 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 Taura syndrome 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 Taura syndrome 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 TSV infections distinguishes it from acute-phase yellowhead 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 the disease from the transitional phase (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).

##### 4.2.3.2. Transition (recovery) phase of Taura syndrome

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 Taura syndrome

Shrimp in the chronic phase of Taura syndrome 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).

Annexe 27 (suite)**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 TSV infection) focal lesions of acute-phase TS TSV infection in cuticular epithelial cells. Preparations presenting TS TSV infection acute-phase lesions 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 publication that incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle et al., 2003), two other laboratories repeated the study and both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines with known 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 TSV infection 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 a 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).
- 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 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 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.

Annexe 27 (suite)

- 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 (and/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 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~~)<sup>6</sup>.
- 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,  $\gamma$  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 MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5.
- vi) Reactions are stopped with distilled water.
- 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 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 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.

<sup>6</sup> 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*.

#### 4.3.1.2.7.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for 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 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 'backshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari et al., 1998). (See Chapter 2.2.2 IHHN 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.~~

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 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<sup>-1</sup>).
- 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.

## Annexe 27 (suite)

- iv) ~~The GeneAmp® EZ rTth RNA-PCR kit (Applied Bioscience, Forster City, CA) was used. SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq 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<sup>-1</sup>), 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>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>5.5 µl</u>	
<u>2x Reaction Mix</u>	<u>12.5 µl</u>	<u>1x</u>
<u>Primer Forward/Reverse (10 M each)</u>	<u>1.0 µl</u>	<u>0.4 µM</u>
<u>RT/Taq 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<sup>-1</sup>), 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 HHHN.~~

#### 4.3.1.2.7.3. Real-time RT-PCR (qPCR qRT-PCR) method for TSV

Quantitative RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of qRT-PCR is ~100 copies of the target sequence from the TSV genome (Dahr *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

The ~~real-time RT-qRT-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 qRT-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 Biosystems; 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~~ °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 ~~45–3~~ seconds and annealing/extension at 60°C for ~~1 minute~~. ~~The levels of fluorescence are measured at the end of each annealing/extension cycle 30 seconds.~~
- 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 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 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.** Infection with TSV surveillance, detection and diagnostic methods in penaeids

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	d	d	c	d	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, qRT-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-transcriptase polymerase chain reaction; qPCR = quantitative PCR.

## 6. Test(s) recommended for targeted surveillance to declare freedom from Taura syndrome

As indicated in Table 5.1, RT-PCR (Section 4.3.1.2.7.2) 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 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

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 infection with TSV, 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

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 TSV lesions 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 TSV lesions are pathognomonic for 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).
- ISH-positive (with a TSV-specific cDNA probe) signal to TSV-type lesions in histological sections (i.e. cuticular acute-phase Taura syndrome lesions) or to distinctive lymphoid organ spheroids (LOS) in the lymphoid organs of shrimp with chronic phase Taura syndrome lesions.
- RT-PCR positive results for 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. & Technol.*, **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. *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.

Annexe 27 (suite)

ERICKSON H.S., POULOS B.T., TANG K.F.J., BRADLEY-DUNLOP D. & LIGHTNER D.V. (2005). Taura Syndrome 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. (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. (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 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). Síndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador*. Cámara 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 4<sup>th</sup> 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 99<sup>th</sup> 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, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquaculture*, **9**, 27–52.
- 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. & 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. (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 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**, 917–928.
- 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-OU M., 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.

Annexe 27 (suite)

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.

~~ROSENBERY 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 Research*, **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 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** (2), 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 Aquacult. 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.

Annexe 27 (suite)

WYBAN J., WHITE B. & LIGHTNER D.V. (2004). TSV Challenges Advance Selective Breeding in Pacific White Shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 40–41.

YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **32**, 21–24.

ZARIN-HERZBERG M. & ASCENCIO F. (2001). Taura syndrome in Mexico: follow-up study in shrimp farms of Sinaloa. *Aquaculture*, **193**, 1–9.

\*  
\* \*



## CHAPTER 2.2.7.

## INFECTION WITH *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* NODAVIRUS (WHITE TAIL DISEASE)

---

### 1. Scope

Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus means infection with *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 *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) (primary) and extra small virus (XSV) (associate) (Qian *et al.*, 2003; Romestand & Bonami, 2003). MrNV is important in WTD outbreaks in prawns, although the role of XSV in pathogenicity remains unclear. Strains are not yet known. MrNV belongs in the family Nodaviridae (Bonami *et al.*, 2005; 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 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 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 a species 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 28 (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 (*P. vannamei*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results (but an active infection has not been demonstrated) have been reported in the following organisms: kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), Indian white prawn (*P. indicus*), giant tiger prawn (*P. monodon*), *Aesohna* sp., *Belostoma* sp., *Cybister* sp., *Notonecta* sp., *Macrobrachium rude*, *M. malcolmsonii*, *Artemia* sp. and *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 (*MtNV/XSV*) infected subadult and adult prawns. Experimental studies confirmed vertical transmission from infected broodstock to PL (Sudhakaran *et al.*, 2006a).

**2.2.45. Target organs and infected tissue**

*MtNV* 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 *MtNV* WTD from broodstock to larvae and PL. Experiments proved that pleopods would be a convenient source of RNA for non-destructive screening of *MtNV* 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 *MtNV* WTD from broodstock to larvae and PL (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a).

**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., *Aesohna* 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 *MtNV* WTD infection has been reported in hatchery-reared larvae and PL of *M. rosenbergii*. The *MtNV* 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).

**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; b).

### 2.3.3. Geographical distribution

WTD 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), 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 *MtNV*, 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 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 WTD, but can be persistently subclinically infected (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 *MtNV*-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 on control and prevention of infection with *MtNV*-WTD. However, proper preventive measures, such as screening of brood stock and PL, and good management practices may help to prevent 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 *MtNV*-WTD.

### 2.4.3. Immunostimulation

No reports available concerning the use of immunostimulants infection with *MtNV*-WTD.

### 2.4.4. Resistance breeding

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).

### 2.4.8. General husbandry practices

Experimental infection confirmed the possibility of horizontal and vertical transmission of infection with *MtNV*-WTD in culture systems (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2006a). 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 WTD in culture systems (Chen *et al.*, 1992; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2008). There is no evidence of WTD prevention by crop rotation either with rice or polyculture with fish. 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) and Ravi *et al.* (2009) in their studies. Based on their results, it would seem that mixed culture of *M. rosenbergii* with *P. monodon* is to be avoided before adopting any preventive measures in the management of infection with *MtNV*.

## Annexe 28 (suite)

### 3. Sampling

#### 3.1. Selection of individual specimens

Infection with *MtNV* WTD of freshwater prawns is mainly diagnosed 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 *MtNV* WTD and diagnosis is not easy, particularly in the earlier stages of infection. WTD-affected PL 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/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  $-70^{\circ}\text{C}$  until further use (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

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) would be a convenient source of RNA for non-destructive screening of *MtNV* and XSV without stress to the broodstock (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

#### 3.5. Samples/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 discoloration 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 *MtNV* WTD and mortality reaches a maximum in about 5 days after the appearance of whitish coloration. 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

The ~~infection with *MtNV*-WTD of *M. rosenbergii*, resulting from *MtNV*~~ and XSV infection, is mainly diagnosed by the whitish coloration of abdominal muscle. However, this clinical sign is not specific to WTD, but it is associated with high mortality rates.

### 4.2.2. Clinical chemistry

The prophenol oxidase activity significantly increased in *MtNV* 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 *MtNV* and XSV-injected prawns on day 1 and 3 p.i. and there was no significant change in the level of hemocyanin in *MtNV* 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 *MtNV* in infected cells can be demonstrated in histological sections using a DIG-labelled DNA *in-situ* hybridisation probe specific for *MtNV* (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 *MtNV*. 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).

## 4.3. Agent detection and identification methods

### 4.3.1. Direct detection methods

Genome and antibody-based diagnostic methods are available to detect *MtNV*/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.

Annexe 28 (suite)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*

*MnV/XSV* can be easily propagated in the C6/36 mosquito *Aedes albopictus* cell line (Sudhakaran *et al.*, 2007a) and this cell line can be cultured easily in Leibovitz L-15 medium containing 100 International Units ml<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycin and 2.5 µg ml<sup>-1</sup> fungizone supplemented with 10% fetal bovine serum at 28°C (Sudhakaran *et al.*, 2007a). 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 *MnV* include the ELISA described by Romestand & Bonami (Ravi *et al.*, 2009) 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-*MnV* 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<sup>-1</sup> and incubate for 1 hour at room temperature.
- vi) Add 50 µl orthophenylene diamine chromogen at 0.4 mg ml<sup>-1</sup> in substrate buffer (citric acid 0.1 M, sodium acetate 0.1 M, pH 5.4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a 0.33% final concentration).
- vii) Stop the reaction after 15 minutes by adding 25 µl of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 *MnV* 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 *MnV* 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<sup>-1</sup> and incubate for 1 hour at room temperature.
- vii) Add 50 µl orthophenylene diamine chromogen at 0.4 mg ml<sup>-1</sup> in substrate buffer (citric acid 0.1 M, sodium acetate 0.1 M, pH 5.4, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at a 0.33% final concentration).

- viii) Stop the reaction after 15 minutes by adding 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 *MnV*/*XSV* developed by Sri Widada *et al.* (2003) and Sahul Hameed *et al.* (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b) is recommended for all situations. *MnV* 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 (nRT-PCR) is also available and recommended for screening broodstock and seed (Sudhakaran *et al.*, 2006a).

##### 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<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub>.

##### RT-PCR protocol

Three RT-PCR methods are described to detect *MnV* 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 *MnV* and *XSV* in PL of prawns collected from suspected WTD outbreaks. The second protocol is a sensitive nRT-PCR protocol described by Sudhakaran *et al.* (2006a). 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 *MnV* 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 *MnV* or *XSV* in infected prawn PL or juveniles (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Sudhakaran *et al.*, 2007b):

The following controls should be included in every RT-PCR assay for *MnV* or *XSV*: a) a known *MnV*/*XSV*-negative tissue sample; b) a known *MnV*/*XSV*-positive sample (tissue or purified virus); and c) a 'no-template' control.

Annexe 28 (suite)

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 *MtNV* 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 *MtNV* and a 546 bp product for XSV. The sensitivity of the assay is approximately 2.5 fg of total RNA.

PCR primer sequences for *MtNV* (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 nRT-PCR is more sensitive and useful for screening seed and broodstock (Sudhakaran *et al.*, 2006a):

For the nRT-PCR, 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 nRT-PCR, 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 nRT-PCR 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 nRT-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 the viral load is sufficiently high, a 425 bp DNA will be amplified for *MtNV* and 546 bp DNA for XSV in the first PCR step. In the nPCR step, a 205 bp product indicates detection of *MtNV* and a 236 bp product indicates detection of XSV. The detection sensitivity of the nRT-PCR is ~1000-fold greater than the one-step RT-PCR.

The sequence of external primers for *MtNV* and XSV is given in protocol 1 and the sequence of internal primers is given below:

The sequence of internal primers for *MtNV* (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 *MtNV* 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 *MtNV* and XSV in a single-tube, one-step multiplex RT-PCR assay can be performed. The reaction is performed in 50 ml RT-PCR buffer containing 20 pmol of each primer specific to *MtNV* 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 *MnV* and *XSV* are present in the sample, a 681 bp DNA for *MnV* and 500 bp DNA for *XSV* will be amplified. The presence of both 681 bp and 500 bp products indicates the presence of *MnV* and *XSV*. The detection sensitivity of the multiplex RT-PCR assay is approximately 25 fg of total RNA.

PCR primer sequences for *MnV* (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: quantitative RT-PCR assay

Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) assay can be performed to quantify the *MnV/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  $\mu\text{l}^{-1}$  M-MLV RT in buffer, 20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  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 RT-qPCR using q-PCR mixture (1  $\mu\text{l}$  of cDNA [10 ng], 6  $\mu\text{l}$  of sterile water, 0.5  $\mu\text{l}$  of each primer specific to *MnV* and *XSV* [25  $\mu\text{M}$  concentration] and 2  $\mu\text{l}$  of reaction mixture containing Fast Start *Taq* polymerase, dNTP mix, SYBR Green, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and 1  $\mu\text{l}$  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.
- v) The number of viral cDNA copies in the sample will be determined using Light Cycler fit point method.

PCR primer sequences for *MnV* (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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{g ml}^{-1}$  RNase-free proteinase K.

Annexe 28 (suite)

- 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, 1x Denhart's solution, 4x SSC (standard saline citrate), 10 mM dithiothreitol (DTT), 1 mg ml<sup>-1</sup> yeast tRNA, 1 mg ml<sup>-1</sup> denatured and sheared salmon sperm DNA and 40 ng ml<sup>-1</sup> denatured digoxigenin-labelled DNA probe specific to *MnV*.
- ix) Wash the slides at 37°C for 10 minutes with 1 x SSC, for 10 minutes with 0.5 x 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 MgCl<sub>2</sub>).
- 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 2x 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 *MnV* and XSV in the freshwater prawn. A set of four primers, two outer and two inner, have been designed separately for detection of *MnV* and XSV. In addition, a pair of loop primers specific to *MnV* 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 MgSO<sub>4</sub>, 8 U of Bst DNA polymerase along with 1x 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<sup>-1</sup> 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 *MnV*/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*

*MnV* 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 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 MNV 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.

**Table 5.1.** Methods for targeted 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	a	a	a	A	a	a
Sequence	d	d	d	A	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 *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

The method for targeted surveillance to declare freedom from infection with MNV WTD is nRT-PCR.

## 7. Corroborative diagnostic criteria

### 7.1. Definition of suspect case

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 coloration. Corroborative diagnostic criteria are summarised in Section 4.2 above.

### 7.2. Definition of confirmed case

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, pp. 1–114.
- 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., NAIR 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. *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.
- 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.
- 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. *Molecular Cellular 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 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) 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 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) and extra small virus 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 rosenbergii* in India. *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 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., VENKATESAN C. & SAHUL HAMEED A.S. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* noda virus (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). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **29**, 1–9.
- SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* Noda virus (MrNV) and extra small virus (XSV) in C6/36 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). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* noda virus (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). 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.

Annexe 28 (suite)

YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAN 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**, 1–5.

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**, 54–656.

\*  
\* \*

## ÉVALUATION DE L'INFECTION À *BATRACHOCHYTRIUM SALAMANDRIVORANS* AU REGARD DES CRITÈRES D'INCLUSION DANS LA LISTE DES MALADIES FIGURANT DANS LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES

### Évaluation globale

La Commission sanitaire pour les animaux aquatiques 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		
Infection à <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

**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.*

Annexe 29 (suite)**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 au 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.

**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.

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 quatre 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*. 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 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.

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 TGhL (tryptone-gélatin hydrolysate-lactose [TGhL]) produisait les meilleurs résultats (Martel *et al.*, 2013).

Annexe 29 (suite)

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 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.

**Conclusion :** le critère est partiellement satisfait.

**Références**

- Bales, Emma K et al. 2015. "Pathogenic Chytrid Fungus Batrachochytrium Dendrobatidis, but Not B. Salamandrivorans, Detected on Eastern Hellbenders." *PloS one* 10(2): e0116405. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4335058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cunningham, A. A., Beckmann, K., Perkins, M., Fitzpatrick, L., Cromie, R., Redbond, J., Fisher, M. C. (2015). Emerging disease in UK amphibians. *Veterinary Record*, 176 (18), 468. <http://doi.org/10.1136/vr.h2264>
- 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), 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., Pasmans, F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, 346 (6209), 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., ... Pasmans, F. (2013). Batrachochytrium salamandrivorans sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(38), 15325–15329. <http://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
- Muletz, Carly et al. 2014. "Unexpected Rarity of the Pathogen Batrachochytrium Dendrobatidis in Appalachian Plethodon Salamanders: 1957–2011." *PLoS ONE* 9(8): 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 Invasions*, 13(6), 1291–1303. <http://doi.org/10.1007/s10530-010-9890-9>
- Spitzen-van der Sluijs, Annemarië; Frank Spikmans, Wilbert Bosman, M. de Z., & Tom van der Meij, Edo Goverse, Marja Kik3, Frank Pasmans, A. M. (2013). Rapid enigmatic decline drives the fire salamander (*Salamandra salamandra*) to the edge of extinction in the Netherlands. *Amphibia-Reptilia*, 34, 233–239. Retrieved from [http://www.ravon.nl/Portals/0/spitzen\\_et\\_al\\_2013\\_rapid\\_decline\\_fire\\_salamander\\_Netherlands.pdf](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. (2015). Averting a North American biodiversity crisis. *Science*, 349, 6247–6248.



Organisation  
Mondiale  
de la Santé  
Animale

World  
Organisation  
for Animal  
Health

Organización  
Mundial  
de Sanidad  
Animal

Original : anglais  
Octobre 2015

## RAPPORT DE LA RÉUNION DU GROUPE AD HOC DE L'OIE SUR LA SENSIBILITÉ DES ESPÈCES DE CRUSTACÉS À L'INFECTION PAR DES MALADIES DE LA LISTE DE L'OIE

Paris, 13 - 15 octobre 2015

Le Groupe ad hoc de l'OIE sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies de la liste de l'OIE (ci-après désigné par « le Groupe ad hoc ») s'est réuni au siège de l'OIE du 12 au 15 octobre 2015.

Les membres du Groupe ad hoc, l'ordre du jour adopté et les termes de référence figurent respectivement aux annexes 1, 2 et 3.

La Docteure Gillian Mylrea, adjointe du chef du Service du commerce international de l'OIE, a accueilli les membres du Groupe ad hoc et les a remerciés d'avoir accepté de travailler sur cet important sujet. La Docteure Mylrea a informé les membres que les recommandations formulées par le Groupe ad hoc lors de sa première réunion de février 2015 concernant la liste des espèces sensibles à l'infection par le virus de la tête jaune avaient été examinées par la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques lors de sa réunion de mars 2015.

Le Docteur Grant Stentiford, président du Groupe ad hoc, a remercié les membres pour leurs efforts en prévision de cette réunion, y compris l'analyse de la littérature et la préparation d'évaluations de sept maladies des crustacés listées par l'OIE (maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, peste de l'écrevisse, nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, myonécrose infectieuse, hépatopancréatite nécrosante, syndrome de Taura et maladie des queues blanches). Le Docteur Stentiford a expliqué que le but de la réunion était d'examiner ces évaluations afin de finaliser la liste des espèces sensibles aux agents pathogènes associés à ces maladies en vue de l'inclure dans le *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (ci-après désigné par « le *Code aquatique* ») et le *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (publié uniquement en anglais et en espagnol ; ci-après désigné par « le *Manuel terrestre* »).

Le Groupe ad hoc a évalué la sensibilité des espèces à une infection par un agent pathogène particulier en appliquant l'approche en trois étapes décrite à l'article 1.5.3. du chapitre 1.5. du *Code aquatique*. Les « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » dans le *Code aquatique* sont les suivants :

- 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.).

Le Groupe ad hoc proposera d'inclure à l'article X.X.2. du *Code aquatique* les espèces hôtes qui auront été considérées comme étant sensibles (conformément à l'article 1.5.7).

Le Groupe ad hoc proposera d'inclure dans le nouveau paragraphe 2.2.2. (« *Species with incomplete evidence for susceptibility* » : Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) du *Manuel aquatique* les espèces hôtes pour lesquelles les preuves de la sensibilité étaient jugées incomplètes (conformément à l'article 1.5.8. du *Code aquatique*).

Annexe 30 (suite)

En outre, le Groupe ad hoc a identifié des espèces hôtes pour lesquelles les seules preuves portaient sur les critères énoncés aux articles 1.5.4 (« voies de transmission naturelles de l'infection ») et 1.5.5 (« l'agent pathogène a été identifié de façon adéquate »), à l'exclusion de ceux énoncés à l'article 1.5.6 (« les preuves de la présence de l'agent pathogène suffisent pour conclure à l'infection »). Le Groupe ad hoc a proposé que ces espèces hôtes soient mentionnées dans le chapitre pertinent du *Manuel aquatique* sous le nouveau paragraphe 2.2.2 proposé, intitulé : « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) du paragraphe 2.2., « *Host factors* » (Facteurs liés à l'hôte), dans la formulation suivante :

« *In addition, pathogen-specific positive PCR results (but an active infection has not been demonstrated) have been reported in the following organisms:...* » (En outre, des résultats positifs au test PCR visant à détecter un agent pathogène spécifique ont été obtenus chez les espèces suivantes : ... (sans toutefois que la présence d'une infection ait pu être démontrée).

Les évaluations détaillées de chaque agent pathogène réalisées par le Groupe ad hoc sont présentées dans les annexes 4 à 10.

Maladie	Numéro d'annexe
Peste de l'écrevisse ( <i>Aphanomyces astaci</i> )	Annexe 4
Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse	Annexe 5
Myonécrose infectieuse	Annexe 6
Hépatopancréatite nécrosante	Annexe 7
Syndrome de Taura	Annexe 8
Maladie des queues blanches	Annexe 9
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë	Annexe 10

Le Groupe ad hoc a constaté qu'une partie du texte et des renvois bibliographiques du paragraphe 2.2. « *Host Factors* » (Facteurs liés à l'hôte) se référaient aux espèces sensibles. Compte tenu de la révision qui venait d'être faite des listes d'espèces sensibles, le Groupe ad hoc a formulé les recommandations suivantes :

- 1) Paragraphe 2.2.5. « *Persistent infection with lifelong carriers* » (Infection persistante et porteurs chroniques). Le Groupe ad hoc a recommandé de modifier ce titre en « Porteurs persistants » car on ignore si l'infection persistante est chronique. En outre, le Groupe ad hoc a recommandé que l'expert du Laboratoire de référence de la maladie ajoute au sein de ce paragraphe une phrase sur le statut d'infecté persistant, étayée par des références, et que le texte sur la sensibilité soit supprimé.
- 2) Paragraphe 2.2.7. « *Known or suspected wild aquatic animal carriers* » (Espèces sauvages d'animaux aquatiques porteurs connus ou suspects). Le Groupe ad hoc a proposé de supprimer cet alinéa dans la mesure où il vise une situation prise en compte dans les paragraphes sur les espèces hôtes sensibles et sur les porteurs persistants et où sa rédaction prête à confusion.

Le Groupe ad hoc a pris acte du fait que la maladie des points blancs, causée par le virus du syndrome des points blancs, était la seule maladie des crustacés de la liste restant à évaluer. Le Groupe ad hoc a décidé de commencer à y travailler en échangeant par voie électronique ; il a demandé qu'une réunion présentielle soit organisée au début de l'année 2016 afin de finaliser cette évaluation.

.../Annexes

**RÉUNION DU GROUPE AD HOC DE L'OIE SUR LA SENSIBILITÉ  
DES ESPÈCES DE CRUSTACÉS À L'INFECTION PAR DES MALADIES DE LA LISTE DE L'OIE****Paris (France), 13 - 15 octobre 2015**

---

**Liste des participants****MEMBRES DU GROUPE AD HOC**

---

**Dr Grant D. Stentiford (*président*)**

Directeur, Laboratoire de référence de  
l'Union européenne pour les maladies  
des crustacés  
Chef d'équipe, Systématique pathologie  
et moléculaire  
Centre for Environment, Fisheries and  
Aquaculture Science (Cefas)  
Barrack Road - Weymouth  
Dorset - DT4 8UB  
ROYAUME-UNI  
Tél. : +44(0)1305 206722  
Mèl. : grant.stentiford@cefas.co.uk

**Dr Mark Crane**

Senior Principal Research Scientist  
Research Group Leader | AAHL Fish  
Diseases Laboratory  
CSIRO Australian Animal Health  
Laboratory  
5 Portarlington Road Geelong VIC 3220  
Private Bag 24 Geelong VIC 3220  
AUSTRALIE  
Tél. : +61 3 5227 5118  
Mèl. : mark.crane@csiro.au

**Dre Sophie St-Hilaire**

Department of Health Management  
Atlantic Veterinary College  
University of Prince Edward Island,  
Charlottetown, PEI  
CANADA  
Tél. : (902) 620-5190  
Mèl. : ssthilaire@upe.ca

**Dr Temdoung Somsiri**

Director of Inland Aquatic Animal Health  
Research Institute  
Department of Fisheries  
50 Paholyothin Road, Ladyao, Jatujak  
Bangkok 10900  
THAÏLANDE  
Mèl. : tsi\_f@yahoo.com

**Dr Jorge Cuéllar Anjel**

Directeur du service des maladies des  
crevettes et de la recherche,  
Cameronera de Coclé S.A. CAMACO  
Apartado 0201-049, Aguadulce  
PANAMA  
Tél. : +507 997-6334  
Mèl. : jocuan@gmail.com

**SIÈGE DE L'OIE**

---

**Dre Gillian Mylrea**

Adjointe au Chef du Service  
Service du commerce international  
OIE  
Mèl. : g.mylrea@oie.int



Annexe 30 (suite)

Annexe 2

**RÉUNION DU GROUPE AD HOC DE L'OIE SUR LA SENSIBILITÉ  
DES ESPÈCES DE CRUSTACÉS À L'INFECTION PAR DES MALADIES DE LA LISTE DE L'OIE**

**Paris (France), 13 - 15 octobre 2015**

---

**Ordre du jour**

1. Accueil des participants
2. Examen des évaluations sur la sensibilité des espèces hôtes au regard des dispositions énoncées au chapitre 1.5. du *Code aquatique* pour les maladies suivantes :
  - 2.1. Peste de l'écrevisse (*Aphanomyces astaci*) (chapitre 9.1.)
  - 2.2. Nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.)
  - 2.3. Myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.)
  - 2.4. Hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.)
  - 2.5. Syndrome de Taura (chapitre 9.6.)
  - 2.6. Maladie des queues blanches (chapitre 9.8.)
  - 2.7. Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (chapitre 9.X.)



Annexe 30 (suite)Annexe 3

**RÉUNION DU GROUPE AD HOC DE L'OIE SUR LA SENSIBILITÉ  
DES ESPÈCES DE CRUSTACÉS À L'INFECTION PAR DES MALADIES DE LA LISTE DE L'OIE**

**Paris (France), 13 - 15 octobre 2015**

---

**Termes de référence**

**Contexte**

Un nouveau chapitre 1.5. portant sur les « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » a été ajouté en 2004 au *Code aquatique*. Ce chapitre a pour objet d'exposer les critères permettant de déterminer quelles sont les espèces hôtes qui doivent être citées en tant qu'espèces sensibles dans l'article X.X.2. de chaque chapitre du *Code aquatique* dédié à une maladie spécifique. Les critères seront progressivement appliqués à tous les chapitres du *Code aquatique* dédiés à une maladie spécifique.

Les évaluations réalisées par les groupes ad hoc seront distribuées aux États membres afin de recueillir leurs commentaires avant d'introduire la moindre modification dans la liste des espèces sensibles figurant dans les articles X.X.2. des chapitres du *Code aquatique* dédiés à des maladies spécifiques.

Les espèces dont la sensibilité est démontrée par un certain nombre d'éléments sans toutefois que ces éléments soient suffisamment probants au sens de l'approche décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* seront mentionnées dans le chapitre pertinent du *Manuel aquatique* dédié à cette maladie, en donnant ces précisions.

**Objectif**

Le Groupe ad hoc de l'OIE sur la sensibilité des espèces de crustacés à l'infection par des maladies de la liste de l'OIE est chargé de réaliser l'évaluation pour les maladies des crustacés listées par l'OIE.

**Termes de référence**

- 1) Prendre en compte les éléments probants requis pour satisfaire aux critères décrits dans le chapitre 1.5.
- 2) Étudier la littérature scientifique dédiée à la sensibilité des espèces.
- 3) Proposer les espèces sensibles pour les maladies de la liste de l'OIE, en vertu de l'article 1.5.7.
- 4) Proposer les espèces sensibles pour les maladies de la liste de l'OIE, en vertu de l'article 1.5.8.

**Résultats attendus de la réunion d'octobre 2015 du Groupe ad hoc**

- 1) Établir la liste des espèces sensibles à citer dans les articles pertinents des chapitres du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* dédiés aux maladies suivantes des crustacés : peste de l'écrevisse (chapitre 9.1.); nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (chapitre 9.3.); myonécrose infectieuse (chapitre 9.4.); hépatopancréatite nécrosante (chapitre 9.5.); syndrome de Taura (chapitre 9.6.); maladie des queues blanches (chapitre 9.8.); maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë (chapitre 9.X.).
- 2) Rédiger un rapport et le soumettre à la Commission pour les animaux aquatiques afin que celle-ci l'examine lors de sa réunion de février 2016.



## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À L'INFECTION PAR *APHANOMYCES ASTACI*

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à l'infection par *Aphanomyces astaci* (l'agent de la peste de l'écrevisse) en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à l'infection par *A. astaci* (étape 2) repose sur les dispositions du chapitre 2.2.1. du *Manuel aquatique* qui précise qu'un diagnostic présumé d'*A. astaci* peut être établi en présence d'hyphes traversant la cuticule se traduisant par une réponse tissulaire de l'hôte (à savoir : infiltration d'hémocytes et mélanisation) et en présence de sporanges présentant une morphologie confirmée comme étant spécifique d'*A. astaci*. Toutefois, l'identité d'*A. astaci* doit être confirmée au moyen d'une PCR et d'une analyse séquentielle spécifique de cet agent pathogène.

Les critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par *A. astaci* (étape 3) sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de répllication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant infectés par *A. astaci*.

**Tableau 1. Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection à *A. astaci* (étape 3)**

A : Réplication#	B : Viabilité / infectiosité	C : Manifestations cliniques / pathologiques	D : Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
Présence d'hyphes d' <i>A. astaci</i> poussant avec ou sans formation de spores dans la cuticule et/ou les tissus sous-jacents.	Culture possible d' <i>Aphanomyces</i> dans des milieux artificiels (Alderman & Polglase, 1986).	Présence d'hyphes fongiques de 7 à 9 µm de largeur dans la cuticule et/ou les tissus sous-jacents, associée à une infiltration d'hémocytes avec ou sans mélanisation.	Les premiers tissus atteints correspondent souvent aux parties fines et souples de la cuticule ; néanmoins, <i>A. astaci</i> finit par se propager dans les tissus conjonctifs et les sinus veineux.
OU	OU		
Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.	Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à un individu SPF d'une espèce hôte sensible et confirmation de l'identité de l'agent pathogène**.	L'apparition de taches blanches localisées dans les muscles sous la cuticule infectée fait partie des signes cliniques.	
ET			
1. Mise en évidence des hyphes par hybridation <i>in situ</i> (ISH) ou immunofluorescence indirecte (IFAT).			
OU			
2. Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies dans le temps par qPCR et confirmation de l'identité d' <i>A. astaci</i> par PCR / analyse séquentielle spécifique de l'agent pathogène.			

Note explicative :

# Le Groupe ad hoc a décidé de renoncer aux méthodes moléculaires ou à la mise en évidence de la présence d'anticorps pour démontrer que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, ces techniques n'ayant jamais été utilisées pour cet agent pathogène.

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient au cours du passage dans des hôtes exempts d'agents pathogènes appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans n'importe quelle espèce hôte SPF reconnue comme étant sensible est requis.

Annexe 30 (suite)

Annexe 4 (suite)

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection à *A. astaci* (nc : preuve non concluante).

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité de l'hôte à l'infection à *A. astaci*

Famille	Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats*	Référence
					A	B	C	D		
Astacidae	<i>Austropotamobius</i>	<i>pallipes</i>	Infection naturelle	PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	1	1,3
Astacidae	<i>Austropotamobius</i>	<i>torrentium</i>	Infection naturelle	PCR et séquençage	nc	nc	nc	Oui	2	
Astacidae	<i>Astacus</i>	<i>leptodactylus</i>	Procédures expérimentales non invasives	PCR et séquençage	nc	Oui	Oui	Oui	1	1 6
Astacidae	<i>Astacus</i>	<i>astacus</i>	Infection naturelle ; procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	1	4, 9, 15
Astacidae	<i>Pacifastacus</i>	<i>leniusculus</i>	Infection naturelle	PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	1	7, 9, 14,16
Cambaridae	<i>Procambarus</i>	<i>clarkii</i>	Infection naturelle	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	2	4, 9,14
Cambaridae	<i>Procambarus</i>	<i>alleni</i>	Infection naturelle	PCR et séquençage	nc	Oui	Oui	Oui	1	8
Cambaridae	<i>Procambarus</i>	<i>fallax virginalis</i>	Infection naturelle	PCR	nc	nc	nc	Oui	3	5, 8
Cambaridae	<i>Orconectes</i>	<i>limosus</i>	Infection naturelle	PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	1	9, 14
Cambaridae	<i>Orconectes</i>	cf. <i>virilis</i>	Infection naturelle	PCR	nc	nc	nc	nc	3	14
Cambaridae	<i>Orconectes</i>	<i>immunis</i>	Infection naturelle	PCR	nc	nc	nc	Oui	2	10

Annexe 30 (suite)

Annexe 4 (suite)

Famille	Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats*	Référence
					A	B	C	D		
Parastacidae	<i>Cherax</i>	<i>quadricarinatus</i>	Infection naturelle ; procédures expérimentales non invasives	Non**	Oui	nc	Oui	Oui	2	8, 15
Parastacidae	<i>Cherax</i>	<i>destructor</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Cherax</i>	<i>papuanus</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Euastacus</i>	<i>kershawi</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Euastacus</i>	<i>claydensis</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Euastacus</i>	<i>crassus</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Geocheirax</i>	<i>gracilis</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Astacopsis</i>	<i>gouldi</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Parastacidae	<i>Astacopsis</i>	<i>fluviatilis</i>	Procédures expérimentales non invasives	Non	Oui	nc	Oui	Oui	2	15
Palaemonidae	<i>Macrobrachium</i>	<i>dayanum</i>	Procédures expérimentales non invasives	PCR	nc	nc	nc	nc	3	13
Varunidae	<i>Eriocheir</i>	<i>sinensis</i>	Infection naturelle ; procédure expérimentale	PCR et séquençage	nc	Oui	Non	Oui	1	2, 14, 11, 13
Potamidae	<i>Potamon</i>	<i>potamios</i>	Infection naturelle	PCR et séquençage	Oui	nc	Oui	Oui	1	12

\* Catégories de résultats :

Résultats 1 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.1.2. du *Code aquatique*.Résultats 2 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) du chapitre 2.2.1. du *Manuel aquatique*.Résultats 3 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.1. du *Manuel aquatique*, « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes), pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection ait pu être démontrée).Remarque : Aucune distinction n'a été apportée entre les différents groupes (A-D) d'*A. astaci* dans ce rapport, les types de souches n'étant généralement pas mentionnés dans la littérature.

\*\* La PCR effectuée dans l'une des études a donné des résultats positifs mais il s'agit probablement d'une contamination de sorte que l'étape 3 n'a pas été réalisée.

Annexe 30 (suite)Annexe 4 (suite)**Informations complémentaires concernant *A. astaci***

Dans la plupart des études plus anciennes, aucune technique moléculaire n'a été utilisée pour confirmer l'identité de l'agent pathogène en le différenciant d'autres oomycètes ou champignons. Dans la plupart des cas à l'exception de l'écrevisse australienne (*Cherax* spp.), le Groupe ad hoc a pu confirmer la sensibilité de taxons hôtes grâce à des études plus récentes qui avaient fait appel à la PCR et au séquençage. Étant donné que l'infection par cet agent pathogène se localise dans la cuticule, il est particulièrement difficile de déterminer si une écrevisse est infectée par l'agent pathogène ou s'il s'agit seulement d'une contamination de surface dès lors qu'aucune évaluation diagnostique n'a été réalisée en complément du test moléculaire sur l'exosquelette de l'animal. Le Groupe ad hoc s'est basé sur le constat d'une réplification de l'agent pathogène ou de son invasion des tissus pour différencier entre ces deux scénarios, mais de nombreux rapports ne faisaient aucune mention de signes imputables à la peste de l'écrevisse.

**Espèces hôtes à inclure dans l'article 9.1.2. du Code aquatique**

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.1.2. du *Code aquatique* : *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii*, *Austropotamobius torrentium*, *Austropotamobius pallipes*, *Orconectes limosus*, *Orconectes immunis*, *Procambarus alleni* et *Potamon potamios*.

**Remarque :** Le Groupe ad hoc a constaté l'existence de travaux de recherche démontrant que plusieurs espèces d'écrevisses des familles Cambaridae et Astacidae satisfaisaient aux critères de sensibilité retenus (résultats désignés comme relevant de la catégorie 1 dans le Tableau 2). Néanmoins, d'autres travaux de recherche faisaient état d'éléments permettant de démontrer, au sein de chacune des deux familles, la sensibilité de plusieurs espèces, mais les informations fournies à elles seules ne suffisaient pas pour satisfaire aux critères d'inclusion de ces hôtes dans le *Code aquatique*. Compte tenu du grand nombre d'espèces de ces deux familles qui remplissent intégralement ou partiellement les critères permettant de les inclure dans la liste des espèces sensibles (résultats relevant des catégories 1 ou 2 dans le Tableau 2), le Groupe ad hoc recommande que toutes les espèces d'écrevisses des familles Cambaridae et Astacidae soient incluses dans la liste des espèces sensibles figurant à l'article 9.1.2. du *Code aquatique*.

**Espèces hôtes à inclure dans le chapitre 2.2.1. du Manuel aquatique**

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.1. du *Manuel terrestre* en tant qu'espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité à *A. astaci* étaient incomplètes : *Astacopsis fluviatilis*, *Astacopsis gouldi*, *Cherax quadricarinatus*, *Cherax destructor*, *Cherax papuanus*, *Euastacus crassus*, *Euastacus claydenis*, *Euastacus kershawi*, *Geocheirax gracilis*, et *Eriocheir sinensis*.

**Remarque :** les écrevisses appartenant à la famille des Parastacidae ne satisfaisaient pas aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles ; néanmoins, les études consacrées à l'évaluation de ces espèces sont extrêmement rares. Les seuls rapports disponibles n'ont pas recouru aux méthodes moléculaires pour confirmer l'identité d'*A. astaci* et/ou n'apportent pas suffisamment d'éléments probants permettant de conclure à l'infection. Par conséquent, le Groupe ad hoc recommande d'inclure les espèces appartenant à la famille des Parastacidae ainsi que le crabe de l'espèce *Eriocheir sinensis* dans le *Manuel aquatique*, en les faisant apparaître dans la catégorie des espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes ou partielles, en attendant de nouveaux éléments probants. Étant donné qu'au moins une espèce autre que l'écrevisse (à savoir *Potamon potamios*) remplit les critères permettant de l'inclure parmi les espèces sensibles à *A. astaci* et qu'une deuxième espèce de crabe (*Eriocheir sinensis*) appartenant au sous-ordre des Brachyura satisfait à un certain nombre de ces critères, le Groupe ad hoc recommande d'introduire dans le *Manuel aquatique* un texte indiquant que toute espèce de crustacé provenant d'un bassin versant où *A. astaci* est présent doit être considérée comme pouvant transmettre cet agent pathogène, soit en tant que vecteur, soit en tant qu'hôte sensible.

**Références**

- 1) Alderman D.J., Polglase J.L. et Frayling M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *Journal of Fish Diseases*, **10**, 385–393.
- 2) Benisch J. (1940). Kuenstlich hervorgerufener *Aphanomyces* Befall bei Wollhandkrabben. *Zeitschrift fuer Fischerei*, **38**, 71–80.
- 3) Caprioli R., Cargini D., Marcacci M., Cammà C., Giansante C. et Ferri N. (2013). Self-limiting outbreak of crayfish plague in an *Austropotamobius pallipes* population of a river basin in the Abruzzi region (central Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*, **103**, 149–156.

Annexe 30 (suite)

Annexe 4 (suite)

- 4) Dieguez-Uribeondo J. et Soderhall K. (1993). *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management*, 24, 761–765.
- 5) Keller N.S., Pfeiffer M., Roessink I., Schulz R. et Schrimpf A. (2014). First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax forma virginalis*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 414: 15.
- 6) Kokko H., Koistinen L., Harlioğlu M.M., Makkonen J., Aydın H. et Jussila J. (2012). Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 404: 12.
- 7) Kušar D., Vrezec A., Ocepek M. et Jencic V. (2013). *Aphanomyces astaci* in wild crayfish populations in Slovenia: first report of persistent infection in a stone crayfish *Austropotamobius torrentium* population. *Diseases of Aquatic Organisms*, **103**, 157–169.
- 8) Mrugała A., Kozubikova-Balcarova E., Chucholl C., Cabanillas Resino S., Viljamaa-Dirks S., Vukic J. et Petrusek A. (2015). Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biological Invasions*, **17**, 1313–1326.
- 9) Oidtmann B., Geiger S., Steinbauer P., Culas A. et Hoffmann RW. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*, **72**, 53–64.
- 10) Schrimpf A., Chucholl C., Schmidt T. et Ralf Schulz R. (2013). Crayfish plague agent detected in populations of the invasive North American crayfish *Orconectes immunis* (Hagen, 1870) in the Rhine River, Germany *Aquatic Invasions* 8(1): 103–109.
- 11) Schrimpf A., Schmidt T. et Schulz R. (2014). Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*), *Aquatic Invasions*. 9(2): 203–209.
- 12) Svoboda J., Strand D.A., Valstad T., Grandjean F.E., Edsman L., Kozak P., Inkouba A., Fristad R.F., Bahadirkoca, S. et Petrusek A. (2014). The crayfish plague pathogen can infect freshwater inhabiting Crabs. *Freshwater Biology*, **59**, 918–929.
- 13) Svoboda J., Mrugała A., Kozubikova-Balcarova E., Kouba A., Dieguez-Uribeondo J. et Petrusek A. (2014). Resistance to the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in two freshwater shrimps. *Journal of Invertebrate Pathology*, **121**, 97–104.
- 14) Tilmans M., Mrugała A., Svoboda J., Engelsma M.Y., Petie M., Soes D.M., Nutbeam-Tuffs S., Oidtmann B., Roessink I. et Petrusek A. (2014). Survey of the crayfish plague pathogen presence in the Netherlands reveals a new *Aphanomyces astaci* carrier. *Journal of Invertebrate Pathology*, **120**, 74–79.
- 15) Unestam T. (1975). Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, **53**, 349–359.
- 16) Vralstad T., Strand D.A., Grandjean F., Kvellestad A., Hastein T., Knutsen A.K., Taugbøl T. et Skaar I. (2014). Molecular detection and genotyping of *Aphanomyces astaci* directly from preserved crayfish samples uncovers the Norwegian crayfish plague disease history. *Veterinary Microbiology*, **173**, 66–75.



## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HYPODERMIQUE ET HÉMATOPOÏÉTIQUE INFECTIEUSE

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse repose sur les dispositions du chapitre 2.2.2. du *Manuel aquatique* qui précise qu'un diagnostic confirmé s'établit comme suit :

« Le diagnostic de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse (IHHN) est considéré comme confirmé si deux des critères suivants sont réunis :

- i) obtention d'un résultat positif au test d'hybridation *in situ* ;
- ii) obtention d'un résultat positif au test PCR (assurant à chaque fois la détection spécifique du génotype) ;
- ii) obtention d'un résultat d'analyse séquentielle de l'acide nucléique confirmant qu'il s'agit du virus de l'IHHN.

Les deux méthodes choisies doivent cibler des zones différentes du génome. »

Les critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de réplication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant infectés par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse.

**Tableau 1.** Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

A : Réplication	B : Viabilité / infectiosité	C : Manifestations cliniques / pathologiques	D : Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
<p>Présence d'inclusions caractéristiques et émission de signaux d'hybridation suite à la réalisation d'hybridation <i>in situ</i> (ISH) ou d'immunofluorescence indirecte (IFAT).</p> <p>Présence de virions au niveau des inclusions observée en microscopie électronique en transmission (MET).</p> <p>Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies dans le temps par qPCR et confirmation de l'identité du virus par PCR / analyse séquentielle spécifique du virus.</p> <p>Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.</p>	<p>Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à un individu SPF d'une espèce hôte sensible et confirmation de l'identité de l'agent pathogène**.</p>	<p>Présence, au sein des tissus cibles, de nombreuses cellules nécrosées présentant des noyaux pycnotiques ou des noyaux hypertrophiés dans lesquels sont observées une marginalisation de la chromatine et des inclusions éosinophiles caractéristiques. En outre, peuvent être associés des signes cliniques (par ex., syndrome de malformation du rostre)***.</p>	<p>Branchies, épithélium cuticulaire (ou hypoderme), tous les tissus conjonctifs, tissus des organes hématopoïétiques, organe lymphoïde, glande antennaire, cordon nerveux ventral, son ganglion nerveux et ses lames branchiales****.</p>

Note explicative :

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient par passages successifs dans des hôtes exempts de pathogènes cibles appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans n'importe quelle espèce hôte SPF reconnue comme étant sensible est requis.

\*\*\* En l'absence de résultats d'examen histopathologiques concluants, la constatation de manifestations cliniques caractéristiques de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse peut constituer une preuve suffisante pour satisfaire à ce critère. Néanmoins, le chapitre du *Manuel aquatique* relatif à cette maladie précise que les signes cliniques ne se manifestent pas de manière homogène chez tous les taxons hôtes et ne sont pas nécessairement spécifiques de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse.

\*\*\*\* L'organe lymphoïde n'est pas présent chez la plupart des taxons hôtes n'appartenant pas aux pénéidés.

## Annexe 30 (suite)

## Annexe 5 (suite)

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse.

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

Genre	Espèce	Étape 1 Transmission*	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve concluante de l'infection				Catégorie des résultats**	Réf.
				A	B	C	D		
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	N, E (per os)	PCR	ISH; MET	Oui	Oui	Oui	1	3, 8, 10, 13
	<i>aztecus</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Oui	2	1
	<i>stylirostris</i>	N, E (per os)	PCR	ISH; MET	Oui	Oui	Oui	1	3, 7, 8
	<i>californiensis</i>	N	PCR	ISH	Non	Non	Oui	1	4, 5, 9
	<i>setiferus</i>	N	PCR	Non	Non	Oui	Oui	1	1
	<i>duorarum</i>	E	Non	Non	Non	Non	Non	3	4
	<i>monodon</i>	N, E (per os)	PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	8, 13
	<i>occidentalis</i>	N	Non	Non	Non	Non	Non	3	4
	<i>semisulcatus</i>	N	Non	Non	Non	Non	Non	3	4
	<i>japonicus</i>	N	Non	Non	Non	Non	Non	3	4
<i>Macrobrachium</i>	<i>rosenbergii</i>	N	PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	2
<i>Hemigrapsus</i>	<i>penicillatus</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	14
<i>Artemesia</i>	<i>longinaris</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	6
<i>Callinectes</i>	<i>arcuatus</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	5
<i>Achirus</i>	<i>mazatlanus</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	5
<i>Gerres</i>	<i>cinerus</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	5
<i>Oreochromis</i>	sp.	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	5
<i>Lile</i>	<i>stolifera</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	5
<i>Centropomus</i>	<i>medius</i>	N	PCR	Non	Non	Non	Non	3	5

\* Modalités de la transmission :

N : infection naturelle.

E : infection expérimentale.

\*\* Catégories de résultats :

Résultats 1 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.3.2. du *Code aquatique*.

Résultats 2 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) du chapitre 2.2.2. du *Manuel aquatique*.

Résultats 3 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.2. du *Manuel aquatique*, « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes), pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection ait pu être démontrée).

Annexe 30 (suite)Annexe 5 (suite)**Informations complémentaires concernant le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse**

La présence dans le génome de l'hôte de séquences d'acide nucléique du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse n'étant pas considérée comme une preuve de l'infection par ce virus, la présente évaluation n'a pas couvert cet aspect (Tang & Lightner, 2006 ; Tang *et al.*, 2007).

**Espèces hôtes proposées pour inclusion dans la liste de l'article 9.3.2. du Code aquatique**

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.3.2. du *Code aquatique* :

*Penaeus vannamei*, *P. stylirostris*, *P. californiensis*, *P. setiferus*, *P. monodon* et *Macrobrachium rosenbergii*.

**Espèces hôtes à inclure dans le chapitre 2.2.2. du Manuel aquatique**

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.2. du *Manuel aquatique* :

*P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. occidentalis*, *P. japonicus*, *P. semisulcatus*, *Hemigrapsus penicillatus*, *Artemesia longinarus*, *Callinectes arcuatus*, *Archirus mazatlanus*, *Gerres cineris*, *Oreochromis* sp., *Lile stolifera* et *Centropomus medius*.

**Références**

- 1) Guzman-Saenz F.M., Molina-Garza Z.J., Perez-Castaneda R., Ibarra-Gamez J.C. et Galaviz-Silva L. (2009). Virus de la necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa (IHHNV) y virus del síndrome de Taura (TSV) en camarón silvestre (*Farfantepenaeus aztecus* Ives, 1891 y *Litopenaeus setiferus* Linnaeus, 1767) de La Laguna Madre, Golfo de México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **44**, 663–672.
- 2) Hsieh C.Y., Chuang P.C., Chen L.C., Tu C., Chien M.S., Huang K.C., Kao H.F., Tung M.C. et Tsai S.S. (2006). Infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) infections in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, **258**, 73–79.
- 3) Jimenez R., Barniol R., de Barniol L. et Machuca M. (1999). Infection of IHHN virus in two species of cultured penaeoid shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) and *Litopenaeus stylirostris* (Stimpson) in Ecuador during El Niño 1997-98. *Aquaculture Research*, **30**, 695–705.
- 4) Lightner D.V. (1996). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiane, USA.
- 5) Macias-Rodriguez N.A., Manon-Rios N., Romero-Romero J.L., Camacho-Beltran E., Magallanes-Tapia M.A., Leyva-Lopez N.E., Hernandez-Lopez J., Magallon-Barajas F.J., Perez-Enriquez R., Sanchez-Gonzalez S. et Menez-Lozano J. (2014). Prevalence of viral pathogens WSSV and IHHNV in wild organisms at the Pacific Coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*, **116**, 8–12.
- 6) Martorelli S.R., Overstreet R.M. et Jovonovich J.A. (2010). First report of viral pathogens WSSV and IHHNV in Argentine crustaceans. *Bulletin of Marine Science*, **86**, 117–131.
- 7) Morales-Covarrubias M.S., Nunan L.M., Lightner D.V., Mota-Urbina J.C., Garza-Aguirre M.C. et Chavez-Sanchez C. (1999). Prevalence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in wild adult blue shrimp *Penaeus stylirostris* from the northern Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, **11**, 296–301.
- 8) Nunan L.M., Poulos B.T. et Lightner D.V. (2000). Use of polmerase chain reaction for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimp. *Marine Biotechnology*, **2**, 319–328.

Annexe 30 (suite)Annexe 5 (suite)

- 9) Pantoja C.R., Lightner D.V. and Holschmit K.H. (1999). Prevalence and Geographic Distribution of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV) in Wild Blue Shrimp *Penaeus stylirostris* from the Gulf of California, Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, **11**, 23–34.
- 10) Tang K.F.J., Durand S.V., White B.L., Redman R.M., Pantoja C.R. and 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.
- 11) Tang K.F.J. and Lightner D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in the genome of the black tiger prawn *Penaeus monodon* from Africa and Australia. *Virus Research*, **118**, 185–191.
- 12) Tang K.F.J., Navarro S.A. and 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*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **74**, 165–170.
- 13) Tang K.F.J., Poulos B.T., Wanbg J., Redman R.M., Shih H.H. and Lightner D.V. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, **53**, 91–99.
- 14) Yang B., Song X.-L., Huang J., Shi C.-Y. and Liu Li. (2007). Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp cultured in China. *Veterinary Microbiology*, **120**, 63–70.

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À L'INFECTION PAR LE VIRUS DE LA MYONECROSE INFECTIEUSE

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse (IMNV) en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3 du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse repose sur les dispositions du chapitre 2.2.3. du *Manuel aquatique* qui précisent qu'un diagnostic confirmé s'établit comme suit : « toute combinaison d'un test de diagnostic moléculaire (PCR ou ISH) et d'une analyse morphologique (histologie) au moyen d'au moins deux des trois méthodes suivantes (les résultats obtenus doivent être positifs) :

- examen histologique révélant la présence de lésions aiguës, transitoires ou chroniques associées à la myonécrose infectieuse dans les muscles striés et/ou l'organe lymphoïde ;
- test d'hybridation *in situ* (utilisant des sondes ADNc spécifiques pour la détection du virus de la myonécrose infectieuse) mettant en évidence un signal au niveau des lésions des fibres des muscles striés nécrosés évocatrices de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse ou un signal au niveau des sphéroïdes observés dans l'organe lymphoïde des crevettes en phase de transition ou en phase chronique de la maladie ;
- réalisation d'une RT-PCR en une étape ou emboîtée ou d'une RT-qPCR confirmant la présence du virus de la myonécrose infectieuse. »

Les critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de répllication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant infectés par le virus de la myonécrose infectieuse.

**Tableau 1. Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse**

A : Réplication	B : Viabilité / infectiosité	C : Manifestations cliniques / pathologiques	D : Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
Présence d'inclusions caractéristiques et mise en évidence de ces inclusions par hybridation <i>in situ</i> (ISH) ou immunofluorescence indirecte d'anticorps (IFAT). Présence de virions dans les inclusions mises en évidence par microscopie électronique en transmission (MET). Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies dans le temps par RT-qPCR et confirmation de l'identité du virus par RT-PCR / analyse séquentielle spécifique du virus. Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exemptés d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.	Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à un individu SPF (pour l'agent pathogène cible) d'une espèce hôte sensible et confirmation de l'identité de l'agent pathogène**.	Présence de lésions multifocales ou diffuses et nécrose coagulante caractéristique des fibres des muscles squelettiques, souvent accompagnée d'un œdème prononcé. La présence de lésions opaques et blanchâtres dans le muscle de l'abdomen est le principal signe clinique ; une léthargie peut être observée chez les crevettes atteintes. Des lésions aiguës peuvent être observées au sein de lésions plus anciennes. Dans ce cas, l'atteinte des fibres musculaires semble évoluer d'une nécrose coagulante à une nécrose liquéfiante, cette dernière s'accompagnant d'une infiltration et d'une accumulation hémocytaires modérées, d'une fibrose et de l'apparition d'inclusions basophiles dans le cytoplasme des hémocytes et dans les cellules des tissus musculaires et conjonctifs. La présence de sphéroïdes dans l'organe lymphoïde ainsi que la présence de sphéroïdes ectopiques sont fréquemment observées. Dans les lésions les plus avancées, les hémocytes et les fibres musculaires inflammées sont progressivement remplacés par une matrice lâche de fibrocytes dans lesquels sont enclavés des hémocytes et des amas de fibres musculaires en phase (présumée) de régénération***.	Muscle strié (squelettique et, plus rarement, cardiaque), tissus conjonctifs, hémocytes et cellules parenchymateuses de l'organe lymphoïde****.

Note explicative :

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient au cours de passages successifs dans des hôtes indemnes de l'agent pathogène cible appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans n'importe quelle espèce hôte SPF reconnue comme étant sensible est requis.

\*\*\* Les signes cliniques associés à la myonécrose infectieuse peuvent éventuellement constituer une preuve que les critères de cette catégorie sont satisfaits, en l'absence d'éléments histopathologiques probants. Toutefois, le chapitre sur cette maladie du *Manuel aquatique* précise que ces signes cliniques peuvent ne pas être présents chez tous les taxons hôtes et qu'ils ne sont pas nécessairement spécifiques de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse.

\*\*\*\* L'organe lymphoïde n'est pas présent chez la plupart des taxons hôtes n'appartenant pas aux pénéidés.

Annexe 30 (suite)

Annexe 6 (suite)

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse.

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse

Genre	Espèce	Étape 1 Transmission*	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve concluante de l'infection				Catégorie des résultats**	Réf.
				A	B	C	D		
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	N, E ( <i>per os</i> )	RT-PCR	ISH	Oui	Oui	Oui	1	3-5
	<i>stylirostris</i>	E (injection)	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	2	4
	<i>monodon</i>	E (injection)	RT-PCR	ISH	Non	Non	Oui	2	4
	<i>subtilis</i>	E ( <i>per os</i> )	RT-PCR	Non	Non	Non	Non	3	1
	<i>esculentus</i>	E (injection ; immersion ; <i>per os</i> )	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	2
	<i>merguiensis</i>	E (injection ; immersion ; <i>per os</i> )	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	2

\* Modalité de la transmission :

N : infection naturelle.

E : infection expérimentale.

\*\* Catégorie de résultats :

Résultats 1 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.4.2. du *Code aquatique*.

Résultats 2 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. intitulé « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) du chapitre 2.2.3. du *Manuel aquatique*.

Résultats 3 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. intitulé « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) du chapitre 2.2.3 du *Manuel aquatique*, pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection active ait pu être démontrée).

### Informations complémentaires concernant le virus de la myonécrose infectieuse

Sans objet.

### Espèces hôtes proposées pour inclusion dans la liste de l'article 9.4.2. du *Code aquatique*

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.4.2. du *Code aquatique* :

*Penaeus vannamei*, *P. esculentus* et *P. merguiensis*.

### Espèces hôtes à inclure dans le chapitre 2.2.3. du *Manuel aquatique*

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.3. du *Manuel aquatique* :

*P. monodon*, *P. stylirostris* et *P. subtilis*.

Annexe 30 (suite)

Annexe 6 (suite)

## Références

- 1) Coelho M.G.L., Silva A.C.G., Vila Nova C.M.V., Neto J.M.O., Lima C.A.N., Feijo R.G., Apolinario D.F., Maggioni R. et Gesteira T.C.V. (2009). Susceptibility of the wild southern brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) and infectious myonecrosis (IMN). *Aquaculture*, **294**, 1–4.
- 2) Gudkovs N., Slater J., McColl K., Handayani C.R. et Crane M. (2015). Tactical Research Fund Aquatic Animal Health Subprogram: Determining the susceptibility of Australian species of prawns to infectious myonecrosis. <http://frdc.com.au/research/final-reports/Pages/2011-048-DLD.aspx>.
- 3) Senapin S., Phewsaiya K., Briggs M. et 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.
- 4) Tang K.F.J., Pantoja C.R., Poulos B.T., Redman R.M. et 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). *Diseases of Aquatic Organisms*, **63**, 261–265.
- 5) Taukhid et Nur'aini Y.L. (2009). Infectious Myonecrosis Virus (IMNV) in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Indonesia. *Israeli Journal of Aquaculture*, **61**, 255–266.



## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À L'INFECTION PAR CANDIDATUS *HEPATOBACTER PENAEI*

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à l'infection par Candidatus *Hepatobacter penaei* (ci-après désigné par « sensibilité à l'hépatopancréatite nécrosante ») en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante repose sur les dispositions du chapitre 2.2.4. du *Manuel aquatique* qui précise qu'un diagnostic confirmé est établi par la mise en évidence à l'histologie des lésions causées en phase aiguë par la bactérie responsable de l'hépatopancréatite nécrosante, notamment une atrophie de l'hépatopancréas associée à une atrophie modérée de la muqueuse des tubules, la présence de bactéries et une infiltration hémocytaire dans un ou plusieurs tubules (encapsulations multifocales) ; ET, par la mise en évidence d'un signal au niveau des lésions causées par la bactérie responsable de l'hépatopancréatite nécrosante lors de la réalisation d'un test d'hybridation in situ (ISH) ; OU, par l'obtention de résultats positifs lors de la réalisation d'une PCR visant à détecter l'agent étiologique, Candidatus *Hepatobacter penaei*.

Les critères permettant de déterminer la sensibilité à l'hépatopancréatite nécrosante sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de répllication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant sensibles à l'hépatopancréatite nécrosante.

**Table 1.** Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante

A: Réplication	B: Viabilité / Infectiosité	C: Manifestations cliniques / pathologiques	D: Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
<p>L'histologie révèle la présence de colonies de Candidatus <i>Hepatobacter penaei</i>, observées dans le cytoplasme des cellules épithéliales de l'hépatopancréas. La confirmation de l'espèce bactérienne présente et de sa localisation dans les tissus s'effectue par hybridation <i>in situ</i> (ISH) ou immunofluorescence indirecte (IFAT).</p> <p>Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies des gènes cibles de la bactérie (codant pour l'ARNr 16S) dans le temps par qPCR.</p> <p>Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.</p>	<p>Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à une population de n'importe quelle espèce hôte sensible (par exemple, <i>P. vannamei</i>) et confirmation, par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, que le pathogène présent chez l'espèce hôte donneuse est identique à celui identifié dans la population receveuse**.</p>	<p>Il y a plusieurs phases distinctes dans l'évolution de l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante : une phase <b>initiale</b> (caractérisée par une faible desquamation épithéliale des tubules de l'hépatopancréas), une phase <b>aiguë</b> (caractérisée par un hépatopancréas atrophié, une augmentation de la desquamation épithéliale, la présence de colonies bactériennes et une infiltration hémocytaire), une phase <b>de transition</b> (caractérisée par une nécrose/desquamation épithéliale étendue, de l'œdème, une infiltration hémocytaire massive et une encapsulation des tubules de l'hépatopancréas) et une phase <b>chronique</b> (caractérisée par des lésions de l'hépatopancréas moins nombreuses mais l'organe est le siège d'une infiltration hémocytaire généralisée et de fibrose apparente). Les signes cliniques (par exemple une faible croissance, une cuticule molle et un corps flasque) associés à une forme aiguë de la maladie, aux conséquences usuellement catastrophiques pour l'élevage, avec un taux de mortalité proche de 100 %, sont fortement évocateurs mais non pathognomoniques de l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante***.</p>	<p>L'agent pathogène est localisé dans les tubules de l'hépatopancréas. Il s'agit d'une infection intracellulaire, localisée dans le cytoplasme des cellules épithéliales des tubules de l'hépatopancréas et causée par des colonies de Candidatus <i>Hepatobacter penaei</i>. On observe une encapsulation profonde des tubules infectés de l'hépatopancréas pendant les phases aiguë et de transition de la maladie.</p>

Note explicative:

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient au cours de passages successifs dans des hôtes exempts de l'agent pathogène cible appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans un hôte SPF reconnu comme étant sensible est requis.

\*\*\* Les signes cliniques associés à l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante peuvent éventuellement constituer des preuves que les critères de cette catégorie sont satisfaits, en l'absence d'éléments histopathologiques probants. Toutefois, le chapitre sur l'hépatopancréatite nécrosante du Manuel aquatique précise que non seulement ces signes cliniques ne sont pas pathognomoniques de la maladie mais aussi qu'ils ne sont pas nécessairement présents chez l'ensemble des taxons hôtes.

Annexe 30 (suite)Annexe 7 (suite)**ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES**

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante.

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité de l'hôte à l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante

Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats*	Référence(s)
				A	B	C	D		
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	Naturelle	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	1	1, 2, 3, 4, 5
	<i>setiferus</i>	Naturelle	Partielle	Non	Non	Non	Non	2	6
	<i>aztecus</i>	Naturelle	Partielle	Non	Non	Non	Non	2	6
	<i>duorarum</i>	Naturelle	Partielle	Non	Non	Non	Non	2	6
	<i>merguiensis</i>	Naturelle	Non	Non	Non	Oui	Oui	2	7
	<i>marginatus</i>	Naturelle	Non	Non	Non	Oui	Oui	2	7
	<i>stylirostris</i>	Naturelle	Non	Non	Non	Oui	Oui	2	7, 8
	<i>monodon</i>	Naturelle	Non	Non	Non	Oui	Oui	2	7
<i>Homarus</i>	<i>americanus</i>	Experimentale /non invasive	Oui	Non	Non	Non	Non	3	9

\* Catégorie de résultats :

Résultat 1 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.5.2. du *Code aquatique*.

Résultat 2 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.4. du *Manuel aquatique* « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes).

Résultat 3 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.4. du *Manuel aquatique* « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes) pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection ait pu être démontrée).

Annexe 30 (suite)

Annexe 7 (suite)

### Informations complémentaires concernant l'hépatopancréatite nécrosante

Le chapitre 2.2.4. du *Manuel aquatique* de l'OIE dispose que les méthodes suivantes peuvent être utilisées pour confirmer l'identité de la bactérie de l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante :

« toute combinaison d'un test de diagnostic moléculaire (PCR ou ISH) et d'une analyse morphologique (histologie) au moyen d'au moins deux des trois méthodes suivantes (les résultats obtenus doivent être positifs) : mise en évidence à l'histologie des lésions causées en phase aiguë par la bactérie responsable de l'hépatopancréatite nécrosante, notamment une atrophie de l'hépatopancréas associée à une atrophie modérée de la muqueuse des tubules, la présence de bactéries et une infiltration hémocytaire dans un ou plusieurs tubules (encapsulations multifocales) ; mise en évidence d'un signal au niveau des lésions causées par la bactérie responsable de l'hépatopancréatite nécrosante lors de la réalisation d'un test d'hybridation in situ (ISH) ; obtention de résultats positifs lors de la réalisation d'un test PCR visant à détecter la bactérie responsable de l'hépatopancréatite nécrosante. » Dans un article récent de Nunan *et al.* (2013) (10), il a été proposé de nommer la bactérie responsable de l'infection par l'hépatopancréatite nécrosante *Candidatus Hepatobacter penaei*. L'analyse des gènes codant pour l'ARN 16S et la gyrase B ont permis de déterminer la position taxonomique de cette bactérie au sein de la classe des *Alphaproteobacteries*, dans l'ordre des *Rickettsiales*.

Les auteurs indiquent que « classifier et attribuer de façon provisoire un nom scientifique à la bactérie responsable de l'hépatopancréatite nécrosante permettra de prévenir toute confusion avec d'autres bactéries pathogènes susceptibles de causer une maladie similaire de l'hépatopancréas chez *P. vannamei*. Lightner (1996) (7) avait indiqué auparavant que « la présence de bactéries similaires, voire identiques, à celles responsables de l'hépatopancréatite nécrosante, associée à des foyers de maladie épizootique sévère a été constatée dans des élevages de crevette au Pérou, en Equateur, au Venezuela, au Brésil, au Panama et au Costa Rica ».

Au regard de ces éléments et aux fins du présent exercice, « la confirmation » de l'identité d'un pathogène dans un hôte sensible potentiel repose sur la caractérisation de *Hepatobacter penaei* par la méthode de Nunan *et al.* (2013) (10) ou par l'approche développée antérieurement et publiée par la même équipe, qui met en œuvre un séquençage et un test PCR (Nunan *et al.*, 2008) (11).

### Espèces hôtes à inclure dans l'article 9.5.2. du Code aquatique

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.5.2. du *Code aquatique* : *Penaeus vannamei*.

### Espèces hôtes à inclure dans le chapitre 2.2.4. du Manuel aquatique

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.4. du *Manuel aquatique* :

*Penaeus aztecus*, *Penaeus setiferus*, *Penaeus stylirostris*, *Penaeus duorarum*, *Penaeus merguensis*, *Penaeus marginatus* et *Penaeus monodon*.

### Références

- 1) KROL, R.M., HAWKINS, W.E., OVERSTREET, R.M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of Invertebrate Pathology*, **57** (3):362–70.
- 2) 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. *Veterinary Pathology*, **29**, 269–277.
- 3) VINCENT A.G. & LOTZ J.M. (2007). Effect of salinity on transmission of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) to KONA stock *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **75**, 265–268.
- 4) FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **61**, 44–48.

Annexe 30 (suite)Annexe 7 (suite)

- 5) 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, **67**, 163–169.
- 6) AGUIRRE-GUZMAN G., SANCHEZ-MARTINEZ J.G., PÉREZ-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 Journal of Veterinary Medicine*, **40**, 337–341.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) AVILA-VILLA, L.A., GOLLAS-GALVAN, T., MARTINEZ-PORCHAS, M., MENDOZA-CANO, F., HERNANDEZ-LOPEZ, J. (2012). Experimental infection and detection of necrotizing hepatopancreatitis bacterium in the American Lobster *Homarus americanus*. The Scientific World Journal Vol. 2012, Article ID #979381
- 10) 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). *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 1407–1409
- 11) NUNAN M.L., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2008). Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, **80**, 69–73.

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À L'INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME DE TAURA

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à l'infection par le virus du syndrome de Taura en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à l'infection par le virus du syndrome de Taura repose sur les dispositions du chapitre 2.2.5. du *Manuel aquatique* qui précise qu'un diagnostic confirmé est établi au moyen de :

« toute combinaison d'un test de diagnostic moléculaire (PCR ou ISH) et d'une analyse morphologique (histologie), au moyen d'au moins de deux des trois méthodes suivantes (les résultats obtenus doivent être positifs) :

- mise en évidence par l'histologie des lésions causées en phase aiguë par le virus du syndrome de Taura, notamment celles présentes au niveau de l'épithélium cuticulaire du tube digestif antérieur (qui comprend l'œsophage ainsi que les chambres antérieure et postérieure de l'estomac) et/ou des lésions présentes au niveau des branchies, des appendices ou de la cuticule dans sa globalité ; ce type de lésions est considéré comme pathognomonique du syndrome de Taura sous réserve qu'il ne soit pas associé à une nécrose aiguë sévère (avec comme altérations nucléaires une pycnose et une caryorrhexie) des cellules parenchymateuses des tubules de l'organe lymphoïde (lésions pouvant être observées lors de la phase aiguë de l'infection par le virus de la tête jaune) ;
- obtention de signaux d'hybridation (par ISH mettant en œuvre une sonde ADNc spécifique du virus du syndrome de Taura) sur les coupes histologiques, au niveau des lésions de la cuticule habituellement observées en phase aiguë de la maladie, ou au niveau des sphéroïdes observables dans l'organe lymphoïde des crevettes en phase chronique du syndrome de Taura ;
- obtention de résultats positifs lors de la réalisation de RT-PCR visant à détecter le virus du syndrome de Taura ;
- selon les besoins, possible réalisation du séquençage des produits de PCR, incluant la CP2, afin de déterminer le génotype du virus du syndrome de Taura. »

Les critères permettant de déterminer la sensibilité au syndrome de Taura sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de répllication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant infectés par le virus du syndrome de Taura.

## Annexe 30 (suite)

## Annexe 8 (suite)

Tableau 1. Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par le virus du syndrome de Taura

A: Réplication	B: Viabilité / Infectiosité	C: Manifestations cliniques / pathologiques	D: Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
<p>Présence d'inclusions caractéristiques et émission de signaux d'hybridation suite à la réalisation d'hybridation <i>in situ</i> (ISH) ou d'immunofluorescence indirecte (IFAT).</p> <p>Présence de virions au niveau des inclusions observée en microscopie électronique en transmission (TEM).</p> <p>Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies dans le temps par RT-qPCR et confirmation par RT-PCR/séquençage pour identifier spécifiquement le virus responsable de l'infection.</p> <p>Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.</p>	<p>Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à un individu SPF de n'importe quelle espèce hôte sensible et confirmation de l'identité de l'agent pathogène**.</p>	<p>Présence d'inclusions caractéristiques associée à une pycnose et une caryorrhexie des noyaux dans les tissus cible (aspect de « grains de poivre » ou « d'impacts de tirs de chevrotine »). Il n'y a aucune infiltration hémocytaire. Les signes cliniques incluent une léthargie, une prise alimentaire réduite, une inactivité des individus moribonds aux abords des bassins, une couleur rouge pâle associée à une décoloration des appendices, une queue et des pléopodes arborant une couleur rouge intense, une carapace molle, un intestin vide, ainsi que des lésions de la cuticule mélanisées, irrégulières et multifocales. Chez <i>P. vannamei</i>, le syndrome de Taura évolue selon un cycle de trois phases, distinctes d'un point de vue clinique et histologique. Les individus en phase suraiguë à aiguë présentent les signes cliniques suivants : léthargie, anorexie, un intestin moyen vide, un comportement natatoire erratique, un corps flasque, une cuticule molle, une opacité musculaire et une dilatation des chromatophores résultant en une coloration rouge ou sombre des uropodes, des antennes et du corps.</p> <p>Les individus en phase de transition / rétablissement présentent des lésions de la cuticule mélanisées (noires), irrégulières, multifocales et généralisées ; ils peuvent également être léthargiques et anorexiques. Les mortalités continuent à augmenter. La phase chronique/ sub-clinique/de portage ne peut avoir lieu que si les animaux réussissent à muer et à se débarrasser de leur cuticule mélanisée. Cette phase peut alors persister toute la vie de la crevette. Les lésions histologiques caractéristiques sont observées uniquement en phase aiguë de la maladie.</p> <p>Chez les crevettes sévèrement touchées par l'infection, les sphéroïdes de l'organe lymphoïde sont parfois observés au niveau des glandes tégumentaires et dans le tissu conjonctif du céphalothorax et des appendices (sphéroïdes ectopiques)***.</p>	<p>L'agent pathogène est localisé dans les cellules des tissus d'origine ectodermique et endodermique, c'est-à-dire l'épithélium cuticulaire (dénommé également hypoderme) recouvrant la quasi-totalité de l'exosquelette, le tube digestif antérieur, le tube digestif postérieur, les branchies, les appendices, le tissu conjonctif, les tissus hématopoïétiques, l'organe lymphoïde et la glande antennaire****.</p>

Note explicative:

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient au cours de passages successifs dans des hôtes SPF (pour l'agent pathogène cible) appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans n'importe quelle espèce hôte SPF reconnue comme étant sensible est requis.

\*\*\* Les signes cliniques associés au syndrome de Taura peuvent éventuellement constituer une preuve que les critères de cette catégorie sont satisfaits, en l'absence d'éléments histopathologiques probants. Toutefois, le chapitre sur le syndrome de Taura du *Manuel aquatique* précise que ces signes cliniques peuvent ne pas être présents chez tous les taxons hôtes et qu'ils ne sont pas nécessairement spécifiques de l'infection par le virus du syndrome de Taura.

\*\*\*\* L'organe lymphoïde n'est pas présent chez la plupart des taxons hôtes n'appartenant pas aux pénéidés.

Annexe 30 (suite)

Annexe 8 (suite)

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par le virus du syndrome de Taura.

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité de l'hôte à l'infection par le virus du syndrome de Taura

Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène I	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats*	Référence(s)
				A	B	C	D		
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	N	RT-PCR	IHC	Non	Oui	Oui	1	7, 8
	<i>aztecus</i>	E (per os)	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	6
	<i>stylirostris</i>	N	RT-PCR	IHC	Non	Oui	Oui	1	8
	<i>setiferus</i>	E (per os)	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	6
	<i>duorarum</i>	E (per os)	RT-PCR	No	Non	No	No	3	6
	<i>monodon</i>	N, E (per os)	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	1	2, 7
	<i>japonicus</i>	E (injection)	RT-PCR	No	Non	No	No	3	1
	<i>ensis</i>	N	RT-PCR	No	Non	Oui	Oui	1	1
	<i>chinensis</i>	E (injection)	RT-PCR	No	Non	Oui	Oui	2	6
	<i>schmitti</i>	N	RT-PCR	No	Non	No	No	3	3
<i>Macrobrachium</i>	<i>rosenbergii</i>	E (injection)	RT-PCR	ISH	Non	Oui	Oui	2	2
<i>Fundulus</i>	<i>grandis</i>	E (per os)	RT-PCR	No	Non	Non	Non	3	5
<i>Ergasilus</i>	<i>manicatus</i>	E (per os)	RT-PCR	RT-qPCR	Non	Non	Non	2	5
<i>Chelonibia</i>	<i>patula</i>	E (per os)	RT-PCR	ISH	Non	Non	Non	2	5
<i>Callinectes</i>	<i>sapidus</i>	E (per os)	RT-PCR	Non	Non	Non	Non	3	5
<i>Octolasmis</i>	<i>muelleri</i>	E (per os)	RT-PCR	ISH	Non	Non	Non	2	5
<i>Uca</i>	<i>vocans</i>	E (injection et per os)	RT-PCR	Non	Non	Non	Non	3	4
<i>Sesarma</i>	<i>mederi</i>	E (injection et per os)	RT-PCR	Non	Non	Non	Non	3	4
<i>Scylla</i>	<i>serrata</i>	E (injection et per os)	RT-PCR	Non	Non	Non	Non	3	4

Modalité de la transmission\*:

N : Infection naturelle.

E : Infection expérimentale.

Catégorie de résultats\*\*:

Résultat 1 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.6.2. du *Code aquatique*.

Résultat 2 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.5. du *Manuel aquatique* « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes).

Résultat 3 : Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.5. du *Manuel aquatique* « *Species with incomplete evidence for susceptibility* » (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes), pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection active ait pu être démontrée).

Annexe 30 (suite)

Annexe 8 (suite)

### Informations complémentaires concernant le virus du syndrome de Taura

Sans objet.

#### Espèces hôtes à inclure dans l'article 9.6.2. du Code aquatique

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.6.2. du *Code aquatique* : *Penaeus vannamei*, *P. aztecus*, *P. stylirostris*, *P. setiferus*, *P. monodon* et *P. ensis*.

#### Espèces hôtes à inclure dans le chapitre 2.2.5. du Manuel aquatique

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.5. du *Manuel aquatique* :

*P. duorarum*, *P. japonicus*, *P. chinensis*, *P. schmitti*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Fundulus grandis*, *Ergasilus manicatus*, *Chelonibia patula*, *Callinectes sapidus*, *Octolasmis muelleri*, *Uca vocans*, *Sesarma mederi* et *Scylla serata*.

### Références

- 1) 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.
- 2) Churchird N, Limsuwan C. 2007. Experimental infection of Taura syndrome virus (TSV) to Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Kasetsart J.*, **41**, 514–521.
- 3) Fajardo C, Rodulfo H, de Donato M, Manrique R, Boada M, Aguado N. 2010. Molecular detection of the Taura syndrome virus in wild *Litopenaeus schmitti* from Maracaibo Lake and Unare Lagoon, Venezuela. *Rev Cientif FCV-LUZ*, **20**, 457–466.
- 4) Kiatpathomchai W, Jaroenram W, Arunrut N, Gangnonngiw W, Boonyawiwat V, Sithigorngul P. 2008. Experimental infections reveal that common Thai crustaceans are potential carriers for spread of exotic Taura syndrome virus. *Dis Aquat Org.*, **79**, 183–190.
- 5) Overstreet RM, Jovonovich J, Ma H. 2009. Parasitic crustaceans as vectors of viruses, with an emphasis on three penaeid viruses. *Integrative Comp Biol.*, **49**, 127–141.
- 6) Overstreet RM, Lightner DV, Hasson KW, McIlwain S, Lotz JM. 1997. Susceptibility to Taura syndrome virus of some penaeid shrimp species native to the Gulf of Mexico and the southeastern United States. *J Invert Pathol.* **69**, 165–176.
- 7) Phalitakul S, Wongtawatchai J, Sarikaputi M, Viseshakul N. 2006. The molecular detection of Taura syndrome virus emerging with White spot syndrome virus in penaeid shrimps of Thailand. *Aquaculture*, **260**, 77–85.
- 8) Robles-Sikisaka R, Hasson KW, Garcia DK, Brovont KE, Cleveland KD, Klimpel KR, Dhar AK. 2002. Genetic variation and immunohistochemical differences among geographic isolates of Taura syndrome virus of penaeid shrimp. *J Gen Virol.*, **83**, 3123–3130.

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À L'INFECTION PAR LE NODAVIRUS DE MACROBRACHIUM (MRNV)

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (ci-après désigné par « la sensibilité à la maladie des queues blanches ») en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à l'infection par le virus de la maladie des queues blanches repose sur les dispositions du chapitre 2.2.7. du *Manuel aquatique* qui précise qu'un diagnostic confirmé est établi en deux étapes : une RT-PCR sur les cas suspects est d'abord effectuée. Puis, le résultat obtenu est confirmé au moyen d'une nRT-PCR, d'un séquençage, de la microscopie électronique en transmission (MET) et de sondes ADN.

Les critères permettant de déterminer la sensibilité à la maladie des queues blanches sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de réplication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant infectés par le virus de la maladie des queues blanches.

**Tableau 1.** Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par le virus de la maladie des queues blanches

A: Réplication	B: Viabilité / Infectiosité	C: Manifestations cliniques / pathologiques	D: Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
Présence de lésions caractéristiques et émission de signaux d'hybridation suite à la réalisation d'hybridation <i>in situ</i> (ISH) ou d'immunofluorescence indirecte (IFAT).	Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à un individu SPF de n'importe quelle espèce hôte sensible et confirmation de l'identité de l'agent pathogène**.	Les lésions caractéristiques sont les suivantes : une dégénérescence progressive des myofibrilles des muscles striés et une myopathie nécrotique. Des inclusions cytoplasmiques basophiles sont observées dans les muscles striés de l'abdomen, le céphalothorax et le tissu conjonctif intratubulaire de l'hépatopancréas.	L'agent pathogène est localisé dans les muscles striés.
OU	OU	ET/OU	
Présence de virions observée par la microscopie en transmission (MET).	Réplication de l'agent pathogène sur un clone C6/36 de la lignée cellulaire du moustique <i>Aedes albopictus</i> .	Parmi les signes cliniques figurent la léthargie, l'anorexie, l'opacification du muscle abdominal et la dégénérescence du telson et des uropodes.	
OU			
Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies des gènes cibles de l'agent pathogène dans le temps par RT-qPCR.			
OU			
Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.			

Note explicative :

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient au cours de passages successifs dans des hôtes indemnes de l'agent pathogène cible appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans n'importe quel hôte SPF reconnu comme étant sensible est requis.

## Annexe 30 (suite)

## Annexe 9 (suite)

**ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES**

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection par le virus de la maladie des queues blanches.

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité de l'hôte à l'infection par le virus de la maladie des queues blanches

Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats*	Référence(s)
				A	B	C	D		
<i>Macrobrachium</i>	<i>rosenbergii</i>	Infection expérimentale (par immersion, <i>per os</i> , par injection)	Méthodes du Northern blot, de RT-PCR, de RT-PCR en temps réel, de RT-PCR nichée et d'hybridation <i>in situ</i> . Naturelle	Oui	Oui	Oui	Oui	1	3, 4, 5, 7, 10, 13, 17, 18, 19
<i>Penaeus</i>	<i>japonicus</i>	Infection expérimentale ( <i>per os</i> et par injection intramusculaire)	RT-PCR	Non	Non	Non	Non	3	16
<i>Penaeus</i>	<i>indicus</i>	Infection naturelle et expérimentale	RT-PCR	Non	Oui	Non	Non	3	6,16
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	Infection naturelle et expérimentale	Confirmée	Non	Oui	Oui	Non	3	6
<i>Penaeus</i>	<i>monodon</i>	Infection expérimentale ( <i>per os</i> et par injection intramusculaire)	Confirmée	Non	Non	Non	Non	3	16
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	Infection naturelle et expérimentale (par l'alimentation)	Confirmée	Non	Oui	Non	Oui	2	11
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	Infection naturelle	Confirmée	Non	Oui	Oui	Non	2	12
<i>Belostoma</i>	sp.	Induction expérimentale de l'infection sur lignée cellulaire C6/36	Confirmée	Non	Oui	Non	Non	3	15
<i>Aesohna</i>	sp.	Induction expérimentale de l'infection sur lignée cellulaire C6/36	Confirmée	Non	Oui	Non	Non	3	15
<i>Cybister</i>	sp.	Induction expérimentale de l'infection sur lignée cellulaire C6/36	Confirmée	Non	Oui	Non	Non	3	15
<i>Notonecta</i>	sp.	Induction expérimentale de l'infection sur lignée cellulaire C6/36	Confirmée	Non	Oui	Non	Non	3	15
<i>Macrobrachium</i>	<i>malcolmsonii</i>	Infection expérimentale (par voie orale et par injection intramusculaire)	Confirmée	Non	Non	Non	Non	3	8
<i>Macrobrachium</i>	<i>rude</i>	Infection expérimentale ( <i>per os</i> et par injection intramusculaire)	Confirmée	Non	Non	Non	Non	3	8

Annexe 30 (suite)

Annexe 9 (suite)

Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats*	Référence(s)
				A	B	C	D		
<i>Artemia</i>	sp.	Infection expérimentale (per os)	Confirmée	Non	Non	Non	Non	3	16
<i>Cherax</i>	<i>quadricarinatus</i>	Infection expérimentale (par l'alimentation et par injection intramusculaire)	Confirmée	Non	Non	Oui	Non	3	2

\*Catégorie de résultats:

Résultat 1: Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.8.2. du *Code aquatique*.

Résultat 2: Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.7. du *Manuel aquatique* «*Species with incomplete evidence for susceptibility* » (*Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes*).

Résultat 3: Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.7. du *Manuel aquatique*, «*Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes* », pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection active ait pu être démontrée).

### Informations complémentaires concernant la maladie des queues blanches

Les foyers de maladie des queues blanches n'ont jamais été rapportés dans des espèces de crustacés autres que l'espèce *Macrobrachium rosenbergii*. La présence du nodavirus de macrobrachium (MrNV) a été observée chez plusieurs espèces de crustacés sans que des mortalités ou des signes cliniques ne soient constatés. Il est possible que ces espèces aient un rôle de réservoir du virus.

Seules les post-larves de *Macrobrachium rosenbergii* présentent les signes cliniques caractéristiques, notamment une opacification des muscles localisés le long du corps (de la queue au céphalothorax). Le taux de mortalité atteint 100 % en 2 à 5 jours. Aucun foyer de la maladie chez les crustacés adultes n'a été rapporté à ce jour.

Le chapitre du *Manuel aquatique* traitant de la maladie des queues blanches précise que les cas suspects doivent d'abord être soumis à une RT-PCR (9, 10, 21). Le résultat obtenu est confirmé au moyen d'une nRT-PCR (14), d'un séquençage, de la microscopie électronique en transmission (MET) et de sondes ADN (20,21).

La maladie des queues blanches est causée par les deux agents étiologiques que sont le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (MrNV) et le virus de très petite taille (dit virus XS). Le rôle et la pathogénicité du virus XS ne sont pas clairement connus. Le génome de MrNV est composé de deux ARN simple brin (ou ARNss), en ratio équimolaire et ayant une longueur respective de 3200 nucléotides (RNA-1) et 1250 nucléotides (RNA-2) (1).

### Espèces hôtes à inclure dans l'article 9.8.2. du *Code aquatique*

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.8.2. du *Code aquatique*: le bouquet géant (*Macrobrachium rosenbergii*).

### Espèces hôtes à inclure dans le chapitre 2.2.7. du *Manuel aquatique*

Le Groupe ad hoc a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le nouveau paragraphe 2.2.2. du chapitre 2.2.7. du *Manuel aquatique*:

*Penaeus vannamei*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *Belostoma* sp., *Aesohna* sp., *Cybister* sp., *Notonecta* sp., *Macrobrachium rude*, *M. malcolmsonii*, *Artemia* sp. et *Cherax quadricarinatus*.

### Références

- 1) Bonami, J.-R. et Sri Widada J. (2011). Viral diseases of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. **106**, 131–142.

Annexe 30 (suite)Annexe 9 (suite)

- 2) Hayakijkosol O., La Fauce K. et Owens L. (2011). Experimental infection of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, the aetiological agent of white tail disease. *Aquaculture*. **319**, 25–29.
- 3) 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. et 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. *Journal of Fish Diseases*. **29**, 665–671
- 4) Owens L., La Fauce K., Juntunen K., Hayakijkosol O. et Zang C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85**, 175–180.
- 5) Qian D., Shi Z., Zhang S., Cao Z., Liu W., Li L., Xie Y., Cambournac I. et Bonami J.-R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with white muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fish Diseases*, **26**, 521–527.
- 6) Ravi M., Nazeer Basha A., Sarathi M., Rosa Idalia H.H., Sri Widada J., Bonami J.-R. and Sahul Hameed A.S. (2009). Studies on the occurrence of white tail disease (WTD) caused by *MrNV* and XSV in hatchery-reared post-larvae of *Penaeus indicus* and *P. monodon*. *Aquaculture*, **292**, 117–120.
- 7) Ravi M., Nazeer Basha A., Taju G., Ram Kumar R. et Sahul Hameed A.S. (2010). Clearance of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) and immunological changes in experimentally injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunology*, **28**, 428–433.
- 8) Ravi M. et Sahul Hameed A. S. (2015). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) in *Macrobrachium malcolmsonii* and *Macrobrachium rude*. *Aquaculture International*, **23**, 195–201.
- 9) Sahul Hameed A.S., Yoganandhan K., Sri Widada J. et Bonami J.-R. (2004<sup>a</sup>). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
- 10) Sahul Hameed A.S., Yoganandhan K., Sri Widada J. et Bonami J.-R. (2004<sup>b</sup>). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and its associated extra small virus (XSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **62**, 191–196.
- 11) Senapin S., Jaengsanong C., Phiwsaiya K., Prasertsri S., Laisutisan K., Chuchird N., Limsuwan C. et Flegel T.W. (2012<sup>a</sup>). Infections of *MrNV* (*Macrobrachium rosenbergii* nodavirus) in cultivated whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* in Asia. *Aquaculture*, 338–341, 41–46.
- 12) Senapin S., Phiwsaiya K., Gangnonngiw W., Briggs M., Sithigorngul P. et Flegel T.W. (2012<sup>b</sup>). Dual infections of *IMNV* and *MrNV* in cultivated *Penaeus vannamei* from Indonesia, *Aquaculture*. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.10.027.
- 13) Sriwongpuk S. (2010). Histopathological changes of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus infection in broodstock of giant freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man). *Journal of Fisheries Technology*, Department of Agricultural Technology, Buri ram Rajabhat University, Thailand. 4, 94-102. (in Thai).
- 14) Sudhakaran R., Ishaq Ahmed V.P., Haribabu P., Mukherjee S.C., Sri Widada J., Bonami J.-R. et Sahul Hameed A.S. (2006<sup>a</sup>). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *Journal of Fish Diseases*, 29, 1–9.

Annexe 30 (suite)

Annexe 9 (suite)

- 15) Sudhakaran R., Haribabu P., Kumar S.R., Sarathi M., IshaqAdmed V.P., Sarath Babu, V. Venkatesan et A.S. Sahul Hameed. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **79**,141–145.
- 16) Sudhakaran R., K. Yoganandhan, V.P. Ishaq Ahmed et A.S. Sahul Hameed.(2006). Artemia as a possible vector for *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) to *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, **70**, 161–166.
- 17) Wang C.S., Chang J.S, Wen C. M., Shih H.H. et Chen S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases*, **31**, 415–422.
- 18) Yoganandhan K., Leartvibhan M., Sriwongpuk S. et Limsuwan C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **69**, 255–258.
- 19) Zhang H., Wang J., Yuan J., Li L., Zhang J. et Bonami J.-R. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white-tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **71**, 11–17.
- 20) Zsikla V., Baumann M. et Cathomas G. (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *Journal of Clinical Pathology*, **57**, 54–656.
- 21) Sri Widada J., Durand S., Cambournac Qian D., Shi Z., Dejonghe E., Richard V. et Bonami J.-R. (2003). Genomebased detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, **26**, 583–590.



## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES À LA MALADIE DE NÉCROSE HÉPATOPANCRÉATIQUE AIGÜÈ

La présente évaluation a pour objectifs (1) de déterminer la sensibilité d'un taxon hôte donné à la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë en appliquant l'approche en trois étapes décrite dans l'article 1.5.3. du *Code aquatique* et (2) de formuler des recommandations à l'intention de l'OIE en vue de la révision des textes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* traitant de la sensibilité des espèces hôtes.

Dans cette évaluation, la confirmation de la sensibilité à la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë repose sur les dispositions du projet de chapitre (en préparation) destiné au *Manuel aquatique* qui précise qu'un diagnostic confirmé est établi lorsque :

« en plus des critères figurant au paragraphe 7.1., au moins deux des critères suivants sont satisfaits :

- compatibilité des résultats de l'étude histopathologique avec la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ;
- détection par PCR et analyse séquentielle du gène codant pour la toxine Pir ;
- obtention de résultats positifs (examen clinique / taux de mortalité/étude histopathologique/ PCR et analyse séquentielle) aux tests biologiques réalisés.

Les critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë sont précisés dans le Tableau 1 ci-après (conformément aux dispositions de l'article 1.5.6. du *Code aquatique*). Ces critères sont : la capacité de réplication de l'agent pathogène dans l'hôte (A), la viabilité/infectiosité de l'agent pathogène (B), les modifications cliniques ou pathologiques induites par l'agent pathogène (C) et la localisation de l'agent pathogène dans les tissus cibles attendus (D). Les hôtes pour lesquels il existe des preuves permettant de satisfaire soit au critère A, soit à au moins deux des critères B, C et D (conformément aux dispositions du point 3 de l'article 1.5.7. du *Code aquatique*) ont été considérés comme étant infectés par la bactérie responsable de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë ».

**Tableau 1. Critères permettant de déterminer la sensibilité à l'infection par la bactérie responsable de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë**

A : Réplication	B : Viabilité / infectiosité	C : Manifestation cliniques / pathologiques	D : Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
<p>L'étude histopathologique met en évidence des signes caractéristiques de la maladie.</p> <p>Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies dans le temps par RT-qPCR et confirmation par PCR/séquençage pour identifier spécifiquement le gène codant pour la toxine Pir.</p> <p>Passage successif d'isolats prélevés d'un individu dans des individus SPF (exempts d'organismes pathogènes spécifiques) de la même espèce*.</p>	<p>Inoculation unique de l'agent pathogène concerné à un individu SPF d'une espèce hôte sensible et confirmation de l'identité de l'agent pathogène**.</p>	<p>Les signes cliniques et les mortalités peuvent apparaître au plus tôt 10 jours après le peuplement des bassins d'élevage. Les signes cliniques sont les suivants : un hépatopancréas pale voire blanc, une atrophie importante de l'hépatopancréas, une carapace molle, un contenu intestinal variable en volume, des tâches ou des stries noires visibles dans l'hépatopancréas (causées par la mélanisation des tubules).</p> <p><u>Phase aiguë</u> : cette phase est caractérisée par une dégénérescence massive et progressive des tubules de l'hépatopancréas, de la partie proximale vers la partie distale ; les cellules épithéliales des tubules de l'hépatopancréas s'arrondissent, se détachent et tombent dans la lumière et les canaux collecteurs des tubules ainsi que dans la chambre postérieure de l'estomac, en l'absence de cellules bactériennes.</p> <p><u>Phase terminale</u> : cette phase est caractérisée par une inflammation intratubulaire marquée, liée à la présence d'hémocytes ainsi que par le développement d'une infection bactérienne secondaire massive, en association avec les cellules nécrotiques détachées des tubules de l'hépatopancréas***.</p>	<p>L'agent pathogène est observé dans les tissus et organes associés à l'intestin, tels que l'hépatopancréas, l'estomac, les parties médiane et postérieure de l'intestin.</p>

Note explicative:

\* Pour démontrer par cette méthode que l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, il est nécessaire d'apporter la preuve que l'agent pathogène se maintient au cours de passages successifs dans des hôtes indemnes de l'agent pathogène cible appartenant à la même espèce que celle faisant l'objet de l'évaluation.

\*\* Pour démontrer la viabilité ou l'infectiosité de l'agent pathogène cible dans l'hôte faisant l'objet de l'évaluation, un seul passage dans n'importe quelle espèce hôte SPF reconnue comme étant sensible est requis.

\*\*\* Démontrer que les hôtes sont en phase terminale de la maladie ne constitue pas une preuve suffisante que les critères de cette catégorie sont satisfaits, en l'absence d'éléments histopathologiques probants.

Annexe 30 (suite)

Annexe 10 (suite)

## ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DES HÔTES

Le Tableau 2 présente les résultats de l'évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection causée par la bactérie responsable de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë.

**Tableau 2.** Résultats de l'évaluation de la sensibilité de l'hôte à la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë.

Genre	Espèce	Étape 1 Voie de transmission	Étape 2 Identification de l'agent pathogène	Étape 3 Preuve de l'infection				Catégorie des résultats**	Référence
				A	B	C	D		
<i>Penaeus</i>	<i>vannamei</i>	N, E* (immersion et <i>per os</i> )	PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	1	3, 5, 6
	<i>monodon</i>	N, E (immersion)	PCR	Oui	Oui	Oui	Oui	1	1, 2
	<i>chinensis</i>	N	nd	histo	Non	Oui	Oui	2	4

Note explicative\*:

N: Infection naturelle

E: Infection expérimentale

Catégorie de résultats\*\*:

Résultats 1: Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste de l'article 9.3.2. du *Code aquatique*.

Résultats 2: Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du paragraphe 2.2.2. du futur chapitre destiné au *Manuel aquatique* «*Species with incomplete evidence for susceptibility*» (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes).

Résultats 3: Espèce hôte proposée pour inclusion dans la liste du paragraphe 2.2.2. du futur chapitre destiné au *Manuel aquatique*, «*Species with incomplete evidence for susceptibility*» (Espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont incomplètes), pour lesquelles des résultats positifs au test PCR visant à détecter cet agent pathogène spécifique ont été obtenus (sans toutefois que la présence d'une infection active ait pu être démontrée).

### Informations complémentaires concernant la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

La maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë est causée par des souches particulières d'espèces de *Vibrio*, parmi lesquelles figurent *V. parahaemolyticus* (VP<sub>AHPND</sub>), *V. harveyi* et possiblement d'autres espèces possédant un plasmide de ~70-kbp, porteur de gènes codant pour des homologues des toxines d'insectes du genre *Photorhabdus* (Pir), PirA et PirB.

#### Espèces hôtes à inclure dans l'article 9.3.2. du *Code aquatique*

Le Groupe *ad hoc* a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans l'article 9.3.2. du *Code aquatique* :

*Penaeus vannamei*, *P. monodon*.

#### Espèces hôtes à inclure dans le paragraphe 2.2.2. du nouveau projet de chapitre X.X.X. du *Manuel aquatique*

Le Groupe *ad hoc* a proposé d'inclure les espèces hôtes suivantes dans le paragraphe 2.2.2. du futur chapitre destiné au *Manuel aquatique* :

*P. chinensis*.

Annexe 30 (suite)

Annexe 10 (suite)

## Références

- 1) Dabu IM, Lim JJ, Arabit PMT, Orense SJAB, Tabardillo JA, Corre VL, Manangas MMB. 2015. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquaculture Res.*, **2015**, 1–8 doi:10.1111/are.12923
- 2) de la Peña LD, Cabillon NAR, Catedral DD, Amar EC, Usero RC, Monotilla WD, Calpe AT, Fernandez DDG, Saloma CP. 2015. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 251–254.
- 3) 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 DV, Wang H-C, Wang AH-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.
- 4) 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. *Oceanologia Limnologia Sinica*, **45**, 703–709.
- 5) 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.
- 6) Tran L, Nunan L, Redman RM, Mohney L, Pantoja CR, Fitzsimmons K, Lightner DV. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **105**, 45–55.



## PLAN DE TRAVAIL 2016 – 2017 DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES

Tâches	Février 2016	Septembre 2016
<b>CODE AQUATIQUE</b>		
Glossaire	Proposer certaines définitions à l'adoption et soumettre certaines définitions aux États membres afin qu'ils formulent leurs commentaires.	Examiner les commentaires des États membres.
Chapitre 1.1. – Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques	Examiner les commentaires des États membres et proposer la version révisée du chapitre à l'adoption.	
Chapitre 1.2. – Critères d'inclusion d'une maladie des animaux aquatiques dans la liste de l'POIE	Examiner les commentaires des États membres, amender en conséquence et soumettre à nouveau pour avis.	Examiner les commentaires des États membres.
Chapitre 1.3. – Maladies listées par l'POIE	Examiner les évaluations réalisées au moyen des critères d'inclusion dans la liste de l'POIE pour les infections à <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> et à <i>Marteilia coxillia</i> . Communiquer l'évaluation réalisée pour l'infection à <i>B. salamandrivorans</i> pour avis. Communiquer la version révisée des noms de maladies des crustacés pour avis.	Examiner les commentaires des États membres.
Chapitre 4.X. – Nouveau chapitre sur la sécurité biologique		Développer et réviser le projet de mandat destiné au groupe ad hoc qui élaborera le texte de ce nouveau chapitre.
Révision des chapitres 4.2. à 4.4.		Ce travail devrait, en priorité, faire suite à l'élaboration du nouveau chapitre sur la sécurité biologique en cours.
Nouveau chapitre sur la préparation aux situations d'urgence sanitaire. À noter que le Chili (février 2016) a demandé que soit élaborée une fiche technique sur ce sujet. La Commission des animaux aquatiques souhaite-t-elle la rédiger ?)		Ce travail devrait, en priorité, faire suite à l'élaboration du nouveau chapitre sur la sécurité biologique en cours.
Chapitre 4.3. – Recommandations générales sur la désinfection	Examiner le projet de chapitre du groupe ad hoc et le proposer à l'adoption.	
Chapitre X.X. – Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés	Examiner les commentaires et soumettre le chapitre aux États membres pour avis.	Examen des commentaires.
Possibilité d'élaborer des chapitres sur la désinfection d'œufs et de larves d'autres espèces de poissons	Demander aux États membres les travaux qu'ils souhaitent voir initier en priorité.	Examiner les priorités des États membres.
Révision de l'article X.X.8. afin de retirer la référence au CIEM	Réviser l'article X.X.8. et le soumettre aux États membres pour qu'ils formulent leurs commentaires.	Examen des commentaires des États membres.
Rédiger une note conceptuelle sur la rédaction d'un document d'orientation pour l'utilisation du <i>Code aquatique</i> afin de faciliter les échanges commerciaux		Rédiger une note conceptuelle.
Chapitre 9.2. – Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune	Examiner les commentaires des États membres et proposer le chapitre à l'adoption.	
Chapitre 9.X. – Maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe	Examiner les commentaires des États membres et soumettre le chapitre pour avis.	Examen des commentaires des États membres.
Réviser les listes d'espèces sensibles de crustacés	Examiner le rapport du groupe ad hoc et amender l'article X.X.2. des chapitres traitant des maladies spécifiques concernés ; soumettre le chapitre pour avis.	Examen des commentaires.

## Annexe 31 (suite)

Tâches	Février 2016	Septembre 2016
<b>CODE AQUATIQUE (suite)</b>		
Réviser les listes d'espèces sensibles de poissons	Demander la création d'un groupe ad hoc afin qu'il évalue la sensibilité des espèces aux maladies des poissons listées par l'OIE.	Parachever la préparation du mandat.
Périodes nécessaires à la déclaration d'absence de la maladie ou au recouvrement du statut indemne de la maladie (en lien avec le chapitre 1.4). Développer des principes pour la détermination des périodes de surveillance figurant dans les chapitres traitant des maladies spécifiques et conseiller sur les amendements à apporter au chapitre 1.4.		Développer des critères à l'intention d'un groupe ad hoc afin qu'il puisse initier ce travail. Envisager que le groupe ad hoc travaille uniquement par voie électronique.
<b>MANUEL AQUATIQUE</b>		
Chapitre sur l'infection par le virus de la tête jaune	Examiner les commentaires des États membres et proposer le chapitre à l'adoption.	
Chapitre sur la maladie de nécrose hépatopancréatique aigüe	Examiner le projet de chapitre élaboré par le groupe ad hoc.	Examen des commentaires.
Réviser les listes des espèces de crustacés sensibles	Examiner le rapport du groupe ad hoc et amender le paragraphe 2.2. des chapitres traitant des maladies spécifiques concernées ; les soumettre au États membres pour qu'ils formulent leurs commentaires.	Examen des commentaires.
Chapitre sur la maladie des points blancs		
Chapitre du <i>Manuel</i> – Révision (définitions de cas et validation des épreuves de diagnostic)	Réunion du groupe ad hoc prévue du 19 au 21 avril 2016.	Examiner le rapport du groupe ad hoc.
Réviser les listes des espèces de poissons sensibles	Demander la création d'un groupe ad hoc afin qu'il évalue la sensibilité des espèces aux maladies des poissons de la liste de l'OIE.	Parachever la préparation du mandat.
<b>LABORATOIRES DE RÉFÉRENCES</b> (en collaboration avec la Commission des normes biologiques)		
Élaborer des lignes directrices pour les Laboratoires de référence		Élaborer et réviser le projet de lignes directrices pour les Laboratoires de référence.
Identifier les écarts au sein du réseau de Laboratoires de référence		Identifier les écarts et développer une stratégie.
<b>AUTRES TRAVAUX</b>		
Document d'orientation pour les évaluations visant à constituer des listes (activité commune aux Commissions)		Élaborer un guide et le diffuser avant septembre 2017.

---

© **Organisation mondiale de la santé animale (OIE), 2016**

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.