



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ ANIMALE

Protéger les animaux, préserver notre avenir

Original : anglais
Janvier et février 2022

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

Réunions virtuelles, les 24 et 27 janvier, ainsi que du 16 au 23 février 2022

PARTIE B – Textes soumis aux membres pour commentaire et à titre informatif

La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE (ci-après désignée par la Commission des animaux aquatiques) s'est réunie par voie électronique les 24 et 27 janvier ainsi que du 16 au 23 février 2022. La liste des participants est présentée en [Annexe 1](#).

Pour faciliter le déroulement de la 89^e Session générale annuelle, qui se tiendra dans un format semi-hybride, le rapport de la réunion de février 2022 de la Commission des animaux aquatiques sera publié en deux parties : la **Partie A** (accessible sur le site internet de l'OIE) contient les informations ayant trait aux textes nouveaux et révisés destinés au *Code aquatique* et au *Manuel aquatique*, et qui seront proposés pour adoption lors de la 89^e Session générale ; la **Partie B** (le présent document) présente les informations relatives aux autres sujets ayant fait l'objet de discussions lors de la réunion de février 2022 de la Commission, et notamment des textes soumis pour commentaire et à titre informatif.

La Commission des animaux aquatiques a souhaité remercier les Membres suivants de lui avoir adressé des commentaires écrits sur les projets de textes destinés au *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (ci-après désigné par le *Code aquatique*) et au *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques* (ci-après désigné par le *Manuel aquatique*) et diffusés dans la partie B de son rapport de février 2021 : le Chili, la Chine (Rép. pop. de), la Colombie, les États-Unis d'Amérique, le Japon, la Norvège, la Nouvelle-Calédonie, la Suisse, la Thaïlande et les États membres de l'Union européenne (UE). La Commission a également souhaité remercier les nombreux experts du réseau scientifique de l'OIE pour leurs précieux conseils et contributions.

La Commission des animaux aquatiques a pris en considération tous les commentaires reçus dès lors qu'ils étaient transmis dans les délais impartis et justifiés. Le cas échéant, la Commission a procédé aux amendements des textes de la façon usuelle, c'est-à-dire par l'utilisation des fonctions « double souligné » et « barré » du logiciel de traitement de texte. En annexes, les amendements proposés lors de cette réunion ont été mis en exergue par un surlignage en couleur afin d'être différenciés de ceux précédemment proposés. En raison du nombre important de commentaires reçus, 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. Elle a réservé ses commentaires aux sujets les plus importants. La Commission n'a pas fourni d'explications justifiant les modifications d'ordre rédactionnel apportées au texte. Elle a souhaité rappeler que les propositions de Membres visant à améliorer la clarté des textes n'ont pas toutes été acceptées ; elle a en effet considéré que dans les cas où le texte était clair tel que rédigé, elle n'en tiendrait pas compte.

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux Membres que les rapports des Groupes *ad hoc* étaient accessibles sur le site internet de l'OIE, à l'adresse suivante : <https://www.oie.int/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-détablissement-des-normes/groupes-ad-hoc/>. À cet égard, elle les encourage à examiner les informations pertinentes figurant dans ses précédents rapports et dans ceux des Groupes *ad hoc* lors de l'élaboration de leurs commentaires, en particulier sur des questions anciennes non résolues.

Le sommaire ci-dessous répertorie l'ensemble des points à l'ordre du jour présentés dans la présente Partie B du rapport de février de la Commission (le présent document) et inclut les liens permettant d'y accéder directement. Les Membres doivent noter que les **Annexes 2 à 12** sont présentées afin qu'ils formulent des commentaires alors que les annexes **Annexes 13 à 14** sont présentées à titre informatif.

OIE • 12, rue de Prony • 75017 Paris • France

Tel.: 33 (0)1 44 15 18 88 • Fax: 33 (0)1 42 67 09 87 • www.oie.int • oie@oie.int

Les commentaires formulés sur les textes concernés du présent rapport devront être adressés au siège de l'OIE avant le **15 juillet 2021** afin que la Commission des animaux aquatiques puisse les examiner lors de sa réunion de septembre 2022.

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

Les commentaires doivent être transmis au format Word plutôt qu'au format pdf en raison des difficultés à incorporer le texte au format pdf dans les documents de travail de la Commission.

Les commentaires doivent être présentés dans les annexes concernées, sous forme de nouvelles propositions rédactionnelles, dûment étayées par des arguments structurés ou par des références scientifiques publiées. 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 surligné »). Les Membres ne doivent pas utiliser la fonction automatique « suivi des modifications » du logiciel de traitement de texte Word car les marques du suivi de correction disparaissent lors de l'intégration de leurs propositions aux documents de travail. Les Membres sont également priés de ne pas faire figurer le texte d'un chapitre dans sa totalité car cela peut favoriser l'oubli de commentaires lors de la préparation des documents de travail.

La Commission des animaux aquatiques encourage fortement les Membres à participer à l'élaboration des normes internationales de l'OIE, en lui soumettant des commentaires sur le présent rapport.

Sommaire répertoriant les points à l'ordre du jour traités

1. PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES	4	Annexe 2
2. CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE.....	4	
2.1. Textes soumis aux Membres pour avis	4	
2.1.1. Marchandises dénuées de risques (article X.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies)....	4	
2.1.1.1. <i>Modèle révisé d'article 8.X.3. destiné aux chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens</i>	5	Annexe 3
2.1.1.2. <i>Modèle révisé d'article 11.X.3. destiné aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques</i>	5	Annexe 4
2.1.2. Article 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (Hépatopancréatite nécrosante) ».....	6	Annexe 5
2.1.3. Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ».....	6	Annexe 6
2.2. Textes soumis aux Membres à titre informatif.....	6	
2.2.1. Maladies émergentes.....	6	
2.2.1.1. <i>Infection par le virus de l'oedème de la carpe</i>	6	
2.2.1.2. <i>Infection à Enterocytozoon hepatopenaei</i>	8	
3. MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE.	9	
3.1. Textes soumis aux Membres pour avis	9	
3.1.1. Titre 2.2. « Maladies des crustacés »	9	
3.1.1.1. <i>Chapitre 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë »</i>	9	Annexe 7
3.1.1.2. <i>Chapitre 2.2.3. « Infection à Hepatobacter penaei (hépatopancréatite nécrosante) »</i>	10	Annexe 8
3.1.1.3. <i>Chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »</i>	10	Annexe 9
3.1.2. Titre 2.3. « Maladies des poissons »	11	
3.1.2.1. <i>Chapitre 2.3.1. Infection à Aphanomyces invadans (syndrome ulcératif épizootique)</i>	11	Annexe 10
3.1.2.2. <i>Chapitre 2.3.2. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique »</i>	11	Annexe 11
3.1.2.3. <i>Chapitre 2.3.7. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise »</i>	13	Annexe 12
3.2. Textes soumis aux Membres à titre informatif.....	15	
3.2.1. Document d'orientation relatif à l'utilisation des méthodes de l'ADN environnemental à des fins de surveillance des maladies des animaux aquatiques	15	Annexe 13
3.2.2. Tableau 4.1. « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently health animals and investigation of clinically affected animals »	16	Annexe 14
3.3. Autres points	17	
3.3.1. Développement d'une plateforme de communication destinée aux experts des laboratoires afin qu'ils échangent sur la performance des tests de diagnostic.....	17	
4. GROUPES AD HOC	17	
4.1. Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de mollusques aux maladies listées par l'OIE	17	
4.2. Groupe ad hoc sur les nouveaux projets de chapitre 4.X. « Préparation aux situations d'urgence sanitaire » et 4.Y « Gestion des foyers de maladie »	17	
4.3. Groupe ad hoc sur la sensibilité des espèces de poissons à l'infection par les maladies listées par l'OIE	18	
5. CENTRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE OU CHANGEMENTS D'EXPERTS	18	
5.1. Évaluation des candidatures au statut de Centre de référence de l'OIE dans le domaine de la santé des animaux aquatiques ou changements d'experts	18	
5.2. Examen des rapports annuels d'activités de 2021 des Centres de référence de l'OIE	18	
5.3. Évaluation des candidatures au statut de laboratoire de référence de l'OIE pour l'infection par le virus 1 iridescent des décapodes	19	
6. PROCHAINE RÉUNION	19	

1. PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission des animaux aquatiques a répertorié les travaux en cours figurant dans son plan de travail ainsi que les délais à prévoir pour leur achèvement. Les travaux en cours du plan de travail ont été diffusés dans le rapport de septembre 2021 pour recueillir des commentaires.

La Commission a prévu une réunion supplémentaire en novembre 2021 afin de passer en revue l'ensemble des nouveaux travaux ajoutés au plan de travail et de les classer par ordre de priorité. Les critères dont il est tenu compte pour établir l'ordre de priorité d'exécution des nouveaux travaux sont multiples et incluent notamment l'impact et l'amélioration attendue des normes, les bénéfices retirés par les Membres, les commentaires des Membres, les activités prévues dans le cadre de la Stratégie pour la santé des animaux aquatiques, les commentaires du siège de l'OIE ainsi que l'état d'avancement des travaux plus anciens figurant dans le plan de travail de la Commission.

La Commission a souligné que les travaux dont l'exécution était subordonnée à l'établissement de groupes *ad hoc* devraient progresser conformément aux prévisions pour 2022.

Le plan de travail de la Commission des animaux aquatiques est joint en [Annexe 2](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

2. CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

2.1. Textes soumis aux Membres pour commentaire

2.1.1. Marchandises dénuées de risques (article X.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies)

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2020, la Commission des animaux aquatiques a révisé l'article X.X.3. de tous les chapitres spécifiques aux maladies au regard des commentaires des Membres signalant que les couples temps/température recommandés dans cet article correspondaient à différents niveaux de traitements thermiques, et que certains n'étaient pas applicables car ils occasionnaient une baisse de la qualité des produits telle que ces derniers n'étaient plus commercialisables. Il a été procédé aux amendements proposés pour spécifier les couples temps/température des traitements thermiques nécessaires à l'inactivation de l'agent pathogène dans les articles X.X.3. de l'ensemble du *Code aquatique*. La Commission a souligné que cette approche différait de l'approche habituellement employée, c'est-à-dire fondée sur le type de marchandises commercialisées, et qu'elle avait été utilisée en réponse aux commentaires des Membres indiquant que certains des traitements thermiques recommandés dans le texte actuel étaient incohérents ou occasionnaient une baisse de la qualité des produits telle que ces derniers n'étaient plus commercialisables.

La Commission a proposé de débuter les travaux par une révision du Titre 9 « Maladies des crustacés » et a élaboré un exemple d'article afin d'expliquer l'approche suggérée. Son choix d'exemple d'article s'est porté sur l'article 9.8.3 du chapitre 9.8 « Infection par le virus du syndrome des points blancs ». La Commission a souligné qu'il était difficile de proposer un modèle d'article X.X.3 uniforme en raison de la variabilité des barèmes des traitements thermiques et des produits listés dans cet article d'un chapitre à l'autre. La Commission a diffusé l'exemple d'article 9.8.3. dans son rapport de septembre 2020 pour recueillir des commentaires.

Lors de sa réunion de février 2021, la Commission a pris en compte les commentaires sur l'exemple d'article 9.8.3. Puis, elle a appliqué les amendements proposés à l'ensemble des articles 9.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies du Titre 9 « Maladies des crustacés » du *Code aquatique*. Les couples temps/températures caractérisant les traitements thermiques figurant dans les articles 9.X.3. ont été ajustés au regard des informations fournies dans le document intitulé [Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#), publié en 2016. La Commission a également proposé d'inclure des exigences relatives aux traitements thermiques spécifiques aux farines. Les articles révisés 9.X.3. ont été diffusés dans le rapport de la Commission de février 2021 pour recueillir des commentaires.

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission a examiné les commentaires et révisé les projets d'articles 9.X.3. afin d'en améliorer la clarté, notamment en réordonnant la liste des produits issus d'animaux aquatiques ; elle a ensuite transmis la version révisée des articles 9.X.3. pour commentaire.

2.1.1.1. Modèle révisé d'article 8.X.3. destiné aux chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens

Précédents rapports de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2020 (point 4.7., page 10), février 2021 (partie B : point 1.4., page 8) et septembre 2021 (point 5.1.5., page 24).

Réunion de février 2022

Comme convenu lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission des animaux aquatiques a amendé l'article 8.X.3. de l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens afin qu'il soit en ligne avec l'approche proposée pour les modèles d'articles 9.X.3. (crustacés) et 10.X.3. (poissons) des chapitres spécifiques aux maladies.

Le choix des barèmes thermiques figurant dans l'article 8.X.3. repose sur les informations figurant dans le document intitulé [Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#), publié en 2016. Ces articles ont également été amendés de façon à ce qu'ils incluent les modifications pertinentes apportées aux articles 9.X.3. (crustacés) et 10.X.3. (poissons) et proposées à l'adoption.

Le modèle d'article révisé 8.X.3. destiné aux chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens est joint en [Annexe 3](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

2.1.1.2. Modèle révisé d'article 11.X.3. destiné aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

Précédents rapports de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2020 (point 4.7., page 10), février 2021 (partie B : point 1.4., page 8) et septembre 2021 (point 5.1.5., page 24).

Réunion de février 2022

Comme convenu lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission des animaux aquatiques a amendé l'article 11.X.3. de l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies des mollusques afin qu'il soit en ligne avec l'approche proposée pour les modèles d'articles 9.X.3. (crustacés) et 10.X.3. (poissons) des chapitres spécifiques aux maladies.

Le choix des barèmes thermiques figurant dans l'article 11.X.3. repose sur les informations figurant dans le document intitulé [Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#), publié en 2016. Ces articles ont également été amendés de façon à ce qu'ils incluent les modifications pertinentes apportées aux articles 9.X.3. (crustacés) et 10.X.3. (poissons) et proposées à l'adoption.

La Commission a souhaité informer les Membres qu'elle avait prévu, dans son plan de travail, un réexamen des évaluations de la sécurité des marchandises afin de garantir que le choix des barèmes thermiques permettant l'inactivation des agents pathogènes repose sur des éléments de preuve scientifiques récents.

La Commission a noté que pour certaines maladies des mollusques, aucune marchandise dénuée de risque traitée thermiquement n'était actuellement listée dans le *Code aquatique*. Elle a expliqué la singularité de ce cas de figure par le fait qu'aucun produit n'avait été considéré comme pertinent au regard de ces maladies et de leurs hôtes sensibles lorsque les évaluations de la sécurité des marchandises avaient été réalisées pour la première fois. La Commission est convaincue qu'elle devrait réexaminer ce point lorsqu'elle procéderait à la révision des évaluations de la sécurité des marchandises.

En raison de l'insuffisance de preuves nécessaires à établir les barèmes permettant l'inactivation des agents pathogènes responsables des maladies des mollusques, la Commission est convaincue de conserver les barèmes des traitements thermiques actuellement utilisés pour les produits présentés dans un conditionnement hermétique figurant dans les articles 11.X.3. jusqu'à ce que le document intitulé [Safe commodity assessments for OIE listed aquatic animal diseases](#) puisse être mis à jour et inclue ainsi les informations scientifiques les plus récentes.

Afin de faciliter la traduction du texte dans différentes langues, la Commission a également converti les unités des intervalles de temps en minutes et secondes dès lors que le nombre figurant dans l'article était sous forme décimale.

Le modèle d'article révisé 11.X.3. destiné aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques est joint en [Annexe 4](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

2.1.2. Article 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (Hépatopancréatite nécrosante) »

La Commission des animaux aquatiques est convenue d'amender l'article 9.3.1. afin d'en aligner le texte avec celui du chapitre 1.3.

L'article révisé 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (Hépatopancréatite nécrosante) » est joint en [Annexe 5](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

2.1.3. Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »

La Commission des animaux aquatiques est convenue d'amender le texte de l'article 9.4.1. afin de prendre en compte la mise à jour de la classification taxonomique du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ainsi que d'en assurer l'alignement sur le texte des autres chapitres spécifiques aux maladies (voir le point 3.1.1.3.).

Dans l'article 9.4.2., la Commission est convenue de lister les espèces de crustacés sensibles à l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, conformément à la convention actuelle, qui consiste à lister le nom vernaculaire des espèces sensibles par ordre alphabétique (voir point 3.1.1.3.).

Les articles révisés 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » sont joints en [Annexe 6](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

2.2. Textes soumis aux Membres à titre informatif

2.2.1. Maladies émergentes

2.2.1.1. Infection par le virus de l'œdème de la carpe

Des commentaires ont été transmis par le Japon.

Contexte

Sur la base de l'information scientifique à sa disposition, la Commission des animaux aquatiques a conclu, lors de sa réunion de février 2020, que l'infection par le virus de l'œdème de la carpe répondait à la définition de « maladie émergente » et qu'à ce titre, les Membres devraient notifier sa présence conformément aux dispositions de l'article 1.1.4. du *Code aquatique*. Lors de sa réunion de septembre 2020, la Commission a informé les membres qu'elle continuait à suivre la situation sanitaire et leur a demandé de notifier la présence de la maladie comme une maladie émergente.

Lors de sa réunion de février 2021, la Commission a examiné les commentaires des Membres et passé en revue les données scientifiques les plus récentes sur l'infection par le virus de l'œdème de la carpe. La Commission a également transmis aux Membres à titre informatif une liste exhaustive des éléments de preuve qu'elle avait examinée et a réaffirmé que l'infection par le virus de l'œdème de la carpe satisfaisait à la définition de maladie émergente.

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission a passé en revue les données scientifiques les plus récentes et a noté que l'impact de l'infection par le virus de l'œdème de la carpe sur la production continuait à être rapporté et qu'elle causait des mortalités chez les populations sauvages et d'élevage. Toutefois, la sévérité de conséquences de la maladie demeurait peu précisément documentée. La Commission a rappelé que toute détection de ce virus devait être rapportée à l'OIE au titre de maladie émergente, conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

Précédents rapports de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Février 2020 (point 7.3.3., page 17), septembre 2020 (point 6.3., page 17), février 2021 (partie B : point 2.2., page 11) et septembre 2021 (point 5.2.1.1., page 27).

Réunion de février 2022

La Commission a examiné les informations les plus récentes sur l'infection par le virus de l'œdème de la carpe et a indiqué que les éléments de preuve suivants confirmaient la gravité de cette maladie dans certaines régions du monde :

- il a été démontré que le virus de l'œdème de la carpe était l'agent pathogène responsable d'importantes mortalités de carpes communes adultes sauvages (*Cyprinus carpio*), en Italie, à la mi-juin 2020 (Marsella *et al.*, 2021) ;
- lors d'un épisode de maladie associé à des mortalités massives au sein des populations de carpes communes du Lac Swartout, dans le Minnesota, aux États-Unis d'Amérique, des charges virales importantes du virus de l'œdème de la carpe ont été détectées (Tolo *et al.*, 2021) ;
- une enquête conduite en vue de déterminer la prévalence du virus de l'œdème de la carpe en Allemagne a permis de détecter la présence de ce virus chez 69 % des populations de carpes communes (*Cyprinus carpio*) et 41 % des populations de carpes koï (une variété de *Cyprinus carpio*). En outre, la charge virale de la plupart des poissons prélevés à partir des populations de carpes communes ou carpes koï présentant des signes cliniques était élevée. Les auteurs ont conclu que la prévalence de l'infection par le virus de l'œdème de la carpe était extrêmement élevée en Allemagne et suggéraient que la maladie se propageait à la faveur des nombreux échanges commerciaux de carpes communes et carpes koï (Ademek *et al.*, 2021) ;
- les analyses biochimiques sanguines des carpes communes infectées par le virus de l'œdème de la carpe ont révélé que ce virus produisait des effets complexes et néfastes sur l'organisme, notamment des troubles métaboliques sévères résultant de l'altération des fonctions respiratoires et excrétrices des branchies (Pikula *et al.*, 2021).

Les observations rapportées à la fin des années 90 (Way *et al.*, 2015) et au début des années 2000 (Haenen *et al.*, 2014) ont montré que la distribution du virus de l'œdème de la carpe ne pouvait s'étendre qu'à un nombre limité d'aires géographiques en Europe et aux États-Unis d'Amérique. La rapide propagation du virus à d'autres pays et les mortalités associées observées depuis 2009 confirment que le critère a) de la définition de maladie émergente est désormais satisfait. La Commission a également relevé que l'élevage de la carpe commune était une aquaculture traditionnelle dans de nombreux pays et que les mortalités causées par le virus de l'œdème de la carpe suscitaient de vives inquiétudes au sein de la communauté scientifique et chez les éleveurs de poissons d'ornement, ce qui s'était d'ailleurs traduit par une augmentation croissante du nombre de rapports et d'articles scientifiques publiés chaque année sur cette maladie.

La Commission a également indiqué que le séquençage du génome du virus de l'œdème de la carpe publié en 2021 (Mekata *et al.*, 2021) s'avèrerait extrêmement utile pour faciliter, dans un futur proche, la conduite d'enquêtes épidémiologiques, la réalisation d'analyses phylogénétiques de ce virus ainsi que le développement de nouveaux tests de diagnostic de la maladie.

Se fondant sur cet examen des informations scientifiques les plus récentes ainsi que sur l'information déjà présentée dans ses précédents rapports, la Commission a conclu que l'infection par le virus de l'œdème de la carpe satisfaisait toujours à la définition de maladie émergente. La Commission a rappelé aux Membres que toute détection de ce virus devait être rapportée à l'OIE au titre de maladie émergente, conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

La Commission a informé les Membres qu'une fiche technique dédiée à l'infection par le virus de l'œdème de la carpe était en cours d'élaboration et qu'elle serait prochainement publiée sur le site internet de l'OIE.

Références bibliographiques :

ADAMEK, M., HELING, M., BAUER, J., TEITGE, F., BERGMANN, S.M., KLEINGELD, D.W., WELZEL, A., SCUDA, N., BACHMANN, J., LOUIS, C.S., BÖTTCHER, K., BRÄUER, G., STEINHAGEN, D. & JUNG-SCHROERS, V. (2021). It is everywhere-A survey on the presence of carp edema virus in carp populations in Germany. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-15.

MARSELLA, A., PRETTO, T., ABBADI, M., QUARTESAN, R., CORTINOVIS, L., FIOCCHI, E., MANFRIN, A. & TOFFAN, A. 2021. Carp edema virus-related mortality in wild adult common carp (*Cyprinus carpio*) in Italy. *Journal of Fish Diseases*. **44(7)**, 939-947.

MEKATA T, KAWATO Y, ITO T. 2021. Complete Genome Sequence of Carp Edema Virus Isolated from Koi Carp. *Microbiology Resource Announcements*; **10(16)**, e00239-21. doi: 10.1128/MRA.00239-21.

HAENEN, O., WAY, K., GORGOLIONE, B., ITO, T., PALEY, R., BIGARRE, L. & WALTZEK, T. (2016). Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **36(1)**, 11.

HAENEN O, WAY, K., STONE D, ENGELSMA M., 2014. Koi Sleepy Disease' found for the first time in Koi Carps in the Netherlands (in Dutch). *Tijdschr Diergeneesk*. **139(4)**, 26-29.

PIKULA, J., POJEZDAL, L., PAPEZIKOVA, I., MINAROVA, H., MIKULIKOVA, I., BANDOUCHOVA, H., BLAHOVA, J., BEDNARSKA, M., MARES, J. & PALIKOVA, M. (2021). Carp edema virus infection is associated with severe metabolic disturbances in fish. *Frontiers in Veterinary Science*, **8**, 679970. 10.3389/fvets.2021.679970

TOLO, I.E., PADHI, S.K., HUNDT, P.J., BAJER, P.G., MOR, S.K. & PHELPS, M.B.D. (2021). Host range of carp edema virus (CEV) during a natural mortality event in a Minnesota lake and update of CEV associated mortality events in the USA. *Viruses*, **13(3)**, 400.

WAY, K., MAIRTIN, P., READING, A., WILLIAMS, C., ENGELSMA, M., HAENEN, O. & STONE, D. (2015). Detection of carp edema-like virus in archive DNA and tissue sampled from disease outbreaks in common carp (*Cyprinus carpio*) in the UK and the Netherlands: a link with spring carp mortality syndrome. *EAFP 17th International Conference on disease of fish and shellfish, Las Palmas de Gran Canaria 7–11 September 2015. Poster P-029*, p 253

2.2.1.2. Infection à Enterocytozoon hepatopenaei

Des commentaires ont été transmis par la Nouvelle-Calédonie.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission des animaux aquatiques a noté que d'importantes conséquences sur l'économie et la production en lien avec l'infection à *Enterocytozoon hepatopenaei* étaient observées depuis un certain temps, notamment en Asie. Elle a également noté que des méthodes de diagnostic étaient disponibles et qu'il y avait des éléments indiquant que la maladie pouvait se propager à la faveur des échanges commerciaux. La Commission a considéré que l'infection à *Enterocytozoon hepatopenaei* satisfaisait à la définition de maladie émergente et que toute détection de cette infection devait être rapportée à l'OIE au titre de maladie émergente conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

Précédent rapport de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2021 (point 5.2.1.2., page 28).

Réunion de février 2022

La Commission a indiqué qu'aucune nouvelle information ne remettait en cause les conclusions de l'évaluation selon laquelle l'infection à *Enterocytozoon hepatopenaei* répondait à la définition de maladie émergente. La Commission a rappelé aux Membres que toute détection de cette infection devait être rapportée à l'OIE au titre de maladie émergente conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

La Commission a informé les Membres que la fiche technique relative à l'infection à *Enterocytozoon hepatopenaei* était en cours d'élaboration et qu'elle serait publiée sur le site internet de l'OIE.

3. MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE

3.1. Textes soumis aux Membres pour commentaire

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux Membres qu'elle avait initié les travaux de reformatage progressif des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique* selon le nouveau modèle de chapitre. Étant donné que les chapitres reformatés et les chapitres mis à jour ont subi des modifications substantielles, la Commission a décidé, lors de sa réunion se septembre 2019, que seules les versions des chapitres exemptes des marques de révision seraient présentées dans le présent rapport. Les modifications apportées ultérieurement au projet de révision initial pour prendre en compte les commentaires des Membres seraient indiquées de la façon usuelle (c'est-à-dire par l'utilisation des fonctions « double souligné » et « ~~barré~~ » pour signaler respectivement les ajouts et les suppressions).

Un document comparant le texte de la version adoptée d'un chapitre au texte de la proposition de nouveau modèle de ce chapitre sera généré par un logiciel informatique. Ce document ne sera pas inclus dans le rapport de la Commission mais sera disponible sur demande auprès du Service des normes de l'OIE (AAC.Secretariat@oie.int).

La Commission a commencé le processus de révision du chapitre 2.2.0. « Informations générales (Maladies des crustacés) » au cours duquel tous les experts des Laboratoires de référence pour les maladies des crustacés seront consultés. La Commission a indiqué qu'il serait nécessaire d'apporter certaines modifications à la version révisée des chapitres spécifiques aux maladies des crustacés une fois que la version révisée du chapitre 2.2.0. aura été complétée, afin de garantir la complémentarité des textes.

Le processus de révision des chapitres mis à jour et reformatés a permis de mettre en évidence la grande variabilité, d'un chapitre à l'autre, du niveau de détails fournis dans la description des méthodes reposant sur une technique PCR (polymerase chain reaction) figurant dans la section 4.4. « Nucleic acid amplification » ainsi que de la présentation de cette information. La Commission a décidé de traiter cette question en élaborant un modèle de paragraphe dédié à la description des méthodes mettant en œuvre des techniques PCR. Ce modèle de paragraphe inclura, d'une part, un texte générique, uniforme et concis sur les méthodes d'extraction de l'acide nucléique, les paramètres des cycles et les témoins utilisés lors du test et, d'autre part, un tableau répertoriant toutes les informations nécessaires sur les séquences de l'amorce et des sondes. Le projet de modèle sera adressé aux Laboratoires de référence de l'OIE pour avis puis finalisé lors de la prochaine réunion de la Commission, en septembre 2022. La version finalisée sera alors appliquée à l'ensemble des chapitres.

3.1.1. Titre 2.2. « Maladies des crustacés »

3.1.1.1. Chapitre 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë »

Selon le champ d'application du chapitre, l'expression « maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë » désigne une infection causée par des souches de *Vibrio parahaemolyticus* (*VpAHPND*), porteuses d'un plasmide de ~70-kbp, dont les gènes codent pour des toxines homologues aux toxines entomopathogènes de *Photorhabdus* (Pir), PirA et PirB. La Commission est informée des cas rapportés de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë causés par d'autres espèces de *Vibrio*. Lors de sa prochaine réunion, en septembre 2022, la Commission évaluera, avec le concours des experts des deux Laboratoires de référence, toute publication qui lui aura été adressée sur les espèces de *Vibrio* autres que *Vibrio parahaemolyticus* et associées avec des cas maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë.

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë », qui a été mis à jour avec le concours des experts des Laboratoires de référence de l'OIE et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies.

Les principaux amendements consistent en :

- la mise à jour de l'information dans les sections sur l'agent étiologique ;
- la mise à jour de l'information dans les sections sur les caractéristiques de la maladie, sur les stratégies en matière de sécurité biologique et de contrôle des maladies, sur la sélection des spécimens ainsi que sur le prélèvement, le transport et la manipulation des échantillons ;

- la mise à jour de l’information dans la section sur les méthodes de diagnostic, et notamment par la complétude du Tableau 4.1. ;
- la révision des définitions de cas suspect et de cas confirmé chez les animaux apparemment sains et présentant des signes cliniques, et
- la complétude des tableaux figurant dans la section sur la sensibilité et spécificité des tests de diagnostic.

Le chapitre révisé 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë » est joint en [Annexe 7](#) afin de recueillir les commentaires des Membres

3.1.1.2. Chapitre 2.2.3. « Infection à Hepatobacter penaei (hépatopancréatite nécrosante) »

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) », qui a été mis à jour avec le concours des experts du Laboratoire de référence de l’OIE et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies.

Les principaux amendements consistent en:

- la mise à jour de l’information dans les sections sur l’agent étiologique ;
- la mise à jour de l’information dans les sections sur les facteurs associés à l’agent pathogène, sur les caractéristiques de la maladie, sur les stratégies en matière de sécurité biologique et de contrôle des maladies, sur la sélection des spécimens ainsi que sur le prélèvement, le transport et la manipulation des échantillons ;
- la mise à jour de l’information figurant dans la section sur les méthodes de diagnostic, et notamment la complétude du Tableau 4.1. et la révision de la section sur les préparations humides, l’amplification des acides nucléiques et les tests moléculaires ;
- la révision des définitions de cas suspect et de cas confirmé chez les animaux apparemment sains et présentant des signes cliniques, et
- la complétude des tableaux figurant dans la section sur la sensibilité et spécificité des tests de diagnostic.

Le chapitre révisé 2.2.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) » est joint en [Annexe 8](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

3.1.1.3. Chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse », qui a été mis à jour avec le concours des experts du Laboratoire de référence de l’OIE et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies.

Les principaux amendements consistent en:

- la mise à jour de l’information figurant dans la section sur le champ d’application du chapitre ;
- la mise à jour de l’information dans les sections sur les facteurs associés à l’agent pathogène, sur les caractéristiques de la maladie, sur les stratégies en matière de sécurité biologique et de contrôle des maladies, sur la sélection des spécimens ainsi que sur le prélèvement, le transport et la manipulation des échantillons ;
- la mise à jour de l’information dans la section sur les méthodes de diagnostic, et notamment la complétude du Tableau 4.1. et la révision de la section sur les tests moléculaires et dosages biologiques, et

- la révision des définitions de cas suspect et de cas confirmé chez les animaux apparemment sains et présentant des signes cliniques.

Le chapitre révisé 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » est joint en [Annexe 9](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

3.1.2. Titre 2.3. « Maladies des poissons »

3.1.2.1. *Chapitre 2.3.1. Infection à Aphanomyces invadans (syndrome ulcératif épizootique)*

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission des animaux aquatiques a révisé le premier projet de chapitre 2.3.1. « Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique) » qui avait été reformaté selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies. La Commission est convenue de retravailler la version du projet de chapitre puis d'examiner la version ainsi révisée lors de sa réunion de février 2022.

Précédent rapport de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2021 (point 6.2.2., page 41).

Réunion de février 2022

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.3.1. « Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique) », qui a été mis à jour avec le concours des experts du Laboratoire de référence de l'OIE et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies.

Les principaux amendements consistent en:

- la mise à jour de l'information dans la section sur le champ d'application du chapitre ;
- la mise à jour de l'information dans la section sur l'agent étiologique ;
- la mise à jour de l'information dans les sections sur les caractéristiques de la maladie, sur les stratégies en matière de sécurité biologique et de contrôle des maladies, sur la sélection des spécimens ainsi que sur le prélèvement, le transport et la manipulation des échantillons ;
- la mise à jour de l'information dans la section sur les méthodes de diagnostic, et notamment la complétude du Tableau 4.1. et la révision de la description des méthodes de préparations de montages par écrasement des échantillons et de celle des tests moléculaires, et
- la révision des définitions de cas suspect et de cas confirmé chez les animaux apparemment sains et présentant des signes cliniques.

Le chapitre révisé 2.3.1. « Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique) » est joint en [Annexe 10](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

3.1.2.2. *Chapitre 2.3.2. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique »*

Des commentaires ont été transmis par la Chine (RÉP. POP. DE), la Colombie, les États-Unis d'Amérique, la Suisse, la Thaïlande et l'UE.

Contexte

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.3.2. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique », qui a été mis à jour avec le concours des experts du Laboratoire de référence de l'OIE et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies. Le chapitre révisé a été diffusé dans le rapport de la Commission de septembre 2021 pour recueillir des commentaires.

Précédent rapport de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2021 (point 6.1.3., page 31).

Réunion de février 2022

La Commission n'a pas accepté la proposition de suppression de la section 2.2.2. « Species with incomplete evidence for susceptibility ». Cette section, qui est incluse dans chacun des chapitres du *Manuel aquatique*, a pour objet de fournir des informations utiles à l'orientation de la recherche et à l'appréciation du risque.

Dans la section 2.2.3. « Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations », la Commission n'a pas accepté de transférer, dans le chapitre 2.3.0. « Informations générales » (maladies des poissons), la phrase précisant le poids des espèces hôtes pour chacun des trois stades de développement figurant dans le Tableau 4.1. La Commission a indiqué que les caractéristiques des hôtes sensibles pouvaient varier en fonction des différents stades de développement des espèces de poissons et des maladies les affectant.

Pour plus de clarté, la Commission est convenue de remplacer « has a high case fatality rate » par « once infected most fish succumb to the disease » dans la section 2.3.1. « Mortality, morbidity and prevalence ».

Dans la section 2.4.5. « Inactivation methods », la Commission est convenue d'ajouter dans la dernière phrase que le virus de la nécrose hématopoïétique épidézique présent dans le surnageant du milieu de culture cellulaire résistait à une température de 60°C pendant 15 minutes (« to 60°C for 15 minutes » dans le texte en version anglaise), afin d'améliorer l'exactitude de l'information présentée.

Dans la section 3.5.2. « Preservation of samples for molecular detection », la Commission n'a pas accepté d'inclure des informations additionnelles sur d'autres méthodes de conservation. Elle a toutefois proposé, à la place, de remplacer le texte existant par une référence à la section B.2.5. « Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis » du chapitre 2.3.0. Il s'agit d'un amendement transverse qui sera également intégré au modèle de chapitre.

De même, dans la section 3.5.3. « Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation », la Commission est convenue d'inclure l'amendement transverse qui avait été accepté lors de la dernière réunion, c'est-à-dire le remplacement du texte par une référence à la section B.2.2. du chapitre 2.3.0. Cet amendement figure déjà dans le modèle de chapitre.

Lors de sa dernière réunion, en septembre 2021, la Commission avait proposé des amendements au texte explicatif précédant le tableau 4.1. « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals ». Au cours de la présente réunion, le texte a été finalisé et intégré dans chacun des chapitres spécifiques aux maladies (voir le point 3.2.2.).

Dans le tableau 4.1., la Commission a attribué la note « ++ » à la PCR conventionnelle, dans la colonne C. « Confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis », pour l'ensemble des stades de développements des espèces hôtes et lui a attribué un niveau de validation égal à « 1 ».

Dans la section 4.2. « Histopathology and cytopathology », deux phrases relatives aux observations du virus en microscopie électronique ont été supprimées du dernier paragraphe car elles n'étaient pas pertinentes dans le cadre du diagnostic.

Dans la section 4.4.1. « Real-time PCR », un Membre a demandé la raison pour laquelle les kits d'extraction d'ARN étaient mentionnés alors que le virus de la nécrose hématopoïétique épidézique était un virus à ADN. Les experts du Laboratoire de référence ont expliqué que les kits devaient permettre l'extraction de l'ADN et a rappelé que le texte indiquait qu'ils étaient utilisés par le Laboratoire de référence de l'OIE (« in the OIE Reference Laboratory » dans le texte en version anglaise) et que les kits d'extraction d'acides nucléiques disponibles dans le commerce pouvaient être utilisés (« commercially available nucleic acid extraction kits may be used » dans le texte en version anglaise).

De même, dans la section 4.4.1., un Membre a questionné le choix de 45 cycles à 95°C pendant 15 secondes pour le processus d'amplification par PCR. Les experts du Laboratoire de référence ont préconisé l'utilisation de 45 cycles pour augmenter la sensibilité du test et réduire le risque de résultats faussement négatifs.

Dans le tableau 4.4.1.1. « Ranavirus primer and probe sequences » et le tableau 4.4.2.1. « MCP-1 » et « MCP-2 primer sequences », la Commission est convenue d'ajouter « 5'-3' » après le terme « Sequence » figurant dans le titre de la colonne et de supprimer les « 5' » et « 3' » directement intégrés aux séquences des amorces pour conserver un approche harmonisée.

Dans la section 4.4.2. « Conventional PCR », la Commission est convenue de remplacer « ethidium bromide » par « containing SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent ». Cet amendement sera appliqué à l'ensemble du *Manuel aquatique*.

Dans la section 4.7. « Immunohistochemistry », la Commission a précisé qu'une partie de l'étape d'incubation était réalisée avec un anticorps secondaire conjugué à la biotine car cette information avait été omise.

Le chapitre révisé 2.3.2. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épidémiologique » est joint en [Annexe 11](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

3.1.2.3. Chapitre 2.3.7. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise »

Des commentaires ont été transmis par la Chine (Rép. pop. de), la Colombie, les États-Unis d'Amérique, la Suisse, la Thaïlande et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.3.7. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise », qui a été mis à jour avec le concours des experts du Laboratoire de référence de l'OIE et reformulé selon le nouveau modèle de chapitre spécifique aux maladies.

La Commission est consciente que d'autres virus appartenant au genre *Megalocytivirus*, comme le virus de la nécrose rénale et splénique (ISKNV) et l'iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV), peuvent également causer des maladies chez les poissons. Ces virus ne sont actuellement pas listés par l'OIE et ne sont pas inclus dans le champ d'application du chapitre sur l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise. Leur inclusion ou celle de tout autre *Megalocytivirus* nécessiterait au préalable qu'ils soient évalués au regard des critères figurant dans le chapitre 1.2. du *Code aquatique*. En cas de satisfaction à ces critères, leur inclusion dans la liste des maladies pourrait être proposée lors de l'Assemblée générale de l'OIE. Toutefois, il convient de rappeler que le présent chapitre est uniquement dédié à l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise. Le chapitre révisé a été diffusé dans le rapport de la Commission de septembre 2021 pour recueillir des commentaires.

Précédent rapport de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2021 (point 6.1.6., page 38).

Réunion de février 2022

Dans la section 1. « Scope », la Commission n'a pas accepté d'ajouter que l'iridovirus de la daurade japonaise était un des génotypes du virus de la nécrose rénale et splénique (ISKNV). La Commission a indiqué qu'il y avait de nombreux virus, y compris l'iridovirus de la daurade japonaise, qui n'étaient pas désignés par une dénomination officielle de l'ICTV¹. Toutefois, seul l'iridovirus de la daurade japonaise est listé par l'OIE. La Commission a souligné que la nature de l'agent étiologique était discutée dans la section 2.1.1.

Dans la section 2.1.1. « Aetiological agent », la Commission est convenue d'ajouter, dans la liste de dénominations synonymes désignant l'iridovirus de la daurade japonaise, la dénomination « PIV (pompano iridovirus) » (iridovirus du pompano sole) ainsi que la référence justifiant cet ajout. La

¹ ICTV: International Committee on the Taxonomy of Viruses

Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques / janvier et février 2022

Commission a également procédé à des modifications de nature éditoriale afin d'améliorer la clarté de cette section.

Dans la section 2.2.1. « Susceptible host species », la Commission est convenue de corriger la classification du chinchard du Japon (*Trachurus japonicus*) en transférant cette espèce, classée dans la famille des Haemulidae, dans la famille de Carangidae. La Commission n'a pas accepté de remplacer « *Lateolabrax* sp. » par « *Lateolabrax* spp. ». Elle a indiqué préférer que le Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des poissons à l'infection par les maladies listées par l'OIE se prononce sur cette proposition.

Comme expliqué au point 3.1.2.2. ci-dessus, la Commission n'a pas accepté la proposition de suppression de la section 2.2.2. « Species with incomplete evidence for susceptibility ».

Dans la section 2.2.4. « Distribution of the pathogen in the host », la Commission est convenue d'inclure « other organs » dans la liste des organes présentant, à l'observation, des cellules infectées. En effet, l'agent pathogène étant responsable d'une infection systémique, la plupart des organes, sinon tous, peuvent être infectés.

Dans la section 2.3.4. « Modes of transmission and life cycle », la Commission n'a pas accepté de remplacer « water », qui est le principal mode de transmission horizontal de l'iridovirus de la daurade japonaise, par « contaminated water or cohabitation with RSIV infected fish » car cette proposition n'améliorait pas la clarté du texte.

Dans la section 2.3.6. « Geographical distribution », la Commission est convenue de remplacer le pays dans lequel la présence de l'iridovirus de la daurade japonaise a été détectée par le continent concerné, conformément au modèle de chapitre. La Commission est également convenue de supprimer la phrase et la référence sur le rôle des échanges commerciaux internationaux dans la propagation du virus, cette dernière n'ayant pas sa place dans cette section.

Dans la section 3.5.2. « Preservation of samples for molecular detection », la Commission n'a pas accepté d'inclure des informations additionnelles sur d'autres méthodes de conservation. Elle a toutefois proposé, à la place, de remplacer le texte par une référence à la section B.2.5. « Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis » du chapitre 2.3.0. Il s'agit d'un amendement transverse qui sera également intégré au modèle de chapitre.

De même, dans la section 3.5.3. « Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation », la Commission est convenue d'inclure l'amendement transverse qui avait été accepté lors de la dernière réunion, c'est-à-dire le remplacement du texte par une référence à la section B.2.2. du chapitre 2.3.0. Cet amendement figure déjà dans le modèle de chapitre.

Lors de sa dernière réunion, en septembre 2021, la Commission avait proposé des amendements au texte explicatif précédant le tableau 4.1. « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals ». Au cours de la présente réunion, le texte a été finalisé et intégré dans chacun des chapitres spécifiques aux maladies (voir le point 3.2.2.).

Dans le tableau 4.1., la Commission a ajouté les notes attribuées à l'histopathologie, le test d'immunofluorescence indirecte, la culture cellulaire ainsi qu'à la PCR en temps réelle et à la PCR conventionnelle dans la colonne C. « Confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis », pour l'ensemble des stades de développements des espèces hôtes.

Dans la section 4.2. « Histopathology and cytopathology », la Commission n'a pas accepté d'inclure « other organs » dans la liste des organes pouvant présenter, à l'examen histologique, des cellules anormalement hypertrophiées. En effet, il s'agit de modifications histopathologiques typiques et permettant d'orienter le diagnostic, et elle n'apparaissent pas dans tous les organes.

Dans la section 4.3. « Cell culture for isolation », la Commission est convenue de supprimer le texte indiquant que l'isolement du virus à partir de poissons d'eau douce tels que les gouramis était difficile à réaliser car il s'appliquait aux génotypes du virus de la nécrose rénale et splénique (ISKNV) et non aux seuls génotypes de l'iridovirus de la daurade japonaise.

Dans la section 4.4.2. « Conventional PCR », la Commission a indiqué que les séquences des amorces 4-F et 4-R, qui amplifient spécifiquement l'iridovirus de la daurade japonaise, avaient été omises. La

Commission les a donc à nouveau ajoutées au paragraphe, en précisant les tailles attendues pour les amplicons générés.

Dans la section 4.5. « Amplicon sequencing », un Membre a proposé d'inclure plus d'informations concernant l'interprétation des résultats du séquençage de Sanger réalisé sur un échantillon ayant présenté un résultat positif au test PCR, en raison de la situation complexe générée par le chevauchement des séquences chez les souches du génotype de l'iridovirus de la daurade japonaise ainsi que chez celles des génotypes du virus de la nécrose rénale et splénique (ISKNV) et de l'iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV). Non seulement la Commission a reconnu la complexité de la situation pour l'iridovirus de la daurade japonaise mais elle a également fait part de certaines incohérences relevées dans la désignation des séquences publiées, y compris dans les bases de données GenBank et EMBL. En effet, certains chercheurs publient les séquences comme étant celles du virus de la nécrose rénale et splénique alors que d'autres les publient comme étant celles de l'iridovirus de la daurade japonaise : il devient donc nécessaire de procéder à une analyse phylogénétique. La Commission est convenue qu'une approche similaire à celle utilisée dans le chapitre 2.3.3. « Infection à *Gyrodactylus salaris* », où un tableau répertoriant les numéros d'accès dans Genbank des séquences nucléotidiques concernées a été ajouté, serait particulièrement adaptée pour ce chapitre. La Commission est convenue de travailler de façon plus approfondie sur cette question et de réviser le projet de tableau lors de sa réunion de septembre.

Dans la section 6.1.2. « Definition of confirmed case in apparently healthy animals » et la section 6.2.2. « Definition of confirmed case in clinically affected animals », la Commission n'a pas accepté de supprimer « with sequence consistent with RSIV » à la suite de la confirmation par analyse de la séquence, car les produits de l'amplification par PCR doivent être séquencés puis analysés en les comparant avec le gène cible.

Le chapitre révisé 2.3.7. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise » est joint en [Annexe 12](#) afin de recueillir les commentaires des Membres.

3.2. Textes soumis aux Membres à titre informatif

3.2.1. Document d'orientation relatif à l'utilisation des méthodes de l'ADN environnemental à des fins de surveillance des maladies des animaux aquatiques

Des commentaires ont été transmis par le Canada, la Chine (RÉP. POP. DE), la Colombie, les États-Unis d'Amérique, le Royaume-Uni, la Suisse, la Thaïlande, l'UA-BIRA et l'UE.

Contexte

Le suivi des systèmes aquatiques fondé sur l'étude de l'ADN environnemental (ADNe) est un domaine de recherche qui progresse rapidement. Les méthodes développées, rapides, économiques et non destructives, offrent la possibilité de détecter la présence d'agents pathogènes, en particulier dans les populations d'animaux aquatiques sauvages, où le prélèvement d'échantillons est parfois difficile ou la suppression des individus non souhaitable. La Commission des animaux aquatiques est informée que des méthodes fondées sur l'ADNe sont disponibles pour détecter plusieurs agents pathogènes responsables de maladies listées par l'OIE, dont l'infection à *Xenohaliotis californiensis*, l'infection à *Batrachochytrium dendrobatidis*, l'infection à *Aphanomyces astaci* et l'infection à *Gyrodactylus salaris*.

Ces méthodes étant disponibles et couramment utilisées, la Commission a jugé qu'il serait opportun de disposer d'orientations sur leur utilisation appropriée et leurs éventuelles limites. Les estimations précises de la performance de ces méthodes de diagnostic utilisées dans le cadre de l'élaboration des programmes de surveillance n'étant pas disponibles, la Commission a conclu que les données qui seraient recueillies au moyen des méthodes fondées sur l'ADNe ne permettraient pas de démontrer l'absence d'une maladie listée. La Commission a également indiqué que la confirmation de l'infection par un agent pathogène responsable d'une maladie listée par l'OIE ne pourrait pas être réalisée au moyen d'une méthode reposant sur l'ADNe. Toutefois, l'obtention de résultats positifs pourrait être considérée comme un critère approprié pour la définition d'un cas suspect.

Lors de sa réunion de février 2021, la Commission a élaboré un document de travail soulignant les avantages et limites des méthodes de détection de l'ADNe à des fins de diagnostic ou de surveillance des maladies. Ce document a pour objectif de fournir des orientations sur les utilisations appropriées de

l'ADNe ainsi que sur la production des données relatives à la performance des essais conditionnant l'éventuelle inclusion de cette méthode dans le *Manuel aquatique*.

Lors de sa réunion de septembre 2021, la Commission a révisé le document de travail et indiqué qu'il serait transmis aux Membres pour un second cycle de commentaires préalablement à sa publication sur le site internet de l'OIE.

Précédents rapports de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Février 2020 (point 8.4.2., page 22), septembre 2020 (point 6.4., page 17), février 2021 (partie B : point 3.1., page 12) et septembre 2021 (point 6.1.1., page 30).

Réunion de février 2022

Certains Membres ont estimé qu'il était nécessaire que les méthodes de l'ADNe soient améliorées et validées, que leur seule utilisation ne suffisait pas à étayer les déclarations de statut indemne de maladies ou à confirmer un cas positif et qu'elles présentaient un risque de résultats faussement positifs. La Commission a souligné que tous ces commentaires étaient cohérents avec les conclusions du document. La Commission a souhaité insister sur la nécessité de réfléchir en amont aux moyens les plus adaptés d'appliquer les méthodes de l'ADNe dans le cadre d'un programme de surveillance ainsi qu'à la façon dont les résultats positifs seraient interprétés et analysés de façon plus approfondie.

La Commission a rappelé à nouveau que le document fournissait des orientations générales et, par conséquent, n'a pas accepté d'y inclure des informations spécifiques sur les différents types d'agents pathogènes. La Commission a toutefois accepté de remplacer le terme « ADN » (mais pas le terme « ADNe ») par le terme « ADN/ARN » dans l'ensemble du document.

La version finalisée du document, qui présente le cadre et les modalités d'emploi des méthodes de l'ADN environnemental, est jointe en [Annexe 13](#) à titre informatif. Il sera prochainement mis en ligne sur la page dédiée aux activités de la Commission du site internet de l'OIE.

3.2.2. Tableau 4.1. « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals »

Des commentaires ont été transmis par la Colombie, les États-Unis d'Amérique, la Suisse et l'UE.

Contexte

Le tableau 4.1. du nouveau modèle de chapitre du *Manuel aquatique* inclut une colonne pour le niveau de validation de chaque méthode de test (de 1 à 4, conformément au chapitre 1.1.2. « Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases »), en plus d'attribuer une note à chaque test au regard de l'usage auquel il est destiné. La Commission a reconnu que disposer de deux systèmes de notation différents pour deux composantes différentes d'utilisation et d'interprétation des épreuves diagnostiques induisait une certaine confusion. Des questions concernant la divergence entre les deux notations ont souvent été posées (par exemple, un bas niveau de validation mais une haute notation au regard de l'usage attendu ou inversement).

Face à ce problème, la Commission a révisé le texte explicatif du tableau 4.1. dans le modèle de chapitre spécifique à une maladie et l'a adressé aux Laboratoires de référence de l'OIE afin d'obtenir leurs commentaires préalablement à son inclusion dans le modèle de chapitre.

Précédent rapport de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :

Septembre 2021 (point 6.1.7.3., page 40).

Réunion de février 2022

La Commission a examiné les commentaires adressés par les Membres et les experts du Laboratoire de référence puis a amendé le texte en conséquence. La Commission n'a pas accepté la proposition de fournir des explications pour chacune des notes attribuées aux tests ; il n'est pas nécessaire que la notation actuelle, qui est relative et qualitative, soit rendue excessivement complexe. De même, la Commission n'a pas accepté que la note attribuée à un test au regard de l'objectif attendu soit aligné sur son niveau de validation : par exemple, une méthode peut avoir été validée au niveau « 3 » mais en raison de son coût élevé, de sa faible rapidité d'exécution, ou d'un mauvais niveau de performance, la note attribuée peut être seulement « + ».

La version finalisée du document est jointe en [Annexe 14](#) à titre informatif. Les modifications apportées au Tableau 4.1. ont été intégrées dans l'ensemble des chapitres révisés lors de la réunion (dont deux proposés à l'adoption et six communiqués aux Membres pour avis) et seront également intégrées dans les chapitres du *Manuel aquatique* prochainement mis à jour.

3.3. Autres points

3.3.1. Développement d'une plateforme de communication destinée aux experts des laboratoires afin qu'ils échangent sur la performance des tests de diagnostic

Le dernier paragraphe du texte explicatif précédant le tableau 4.1. indique que les Laboratoires de référence de l'OIE apprécieraient de disposer de retours d'expérience sur les performances des tests de diagnostic recommandés. Lors de la 3^e réunion du Comité de pilotage de la plateforme de collaboration régionale de l'OIE pour la santé des animaux aquatiques en Asie et dans le Pacifique ainsi que dans les communications adressées au Siège, les experts des Laboratoires de référence ont demandé que soient définies les conditions dans lesquelles les questions pouvaient leur être transmises afin qu'ils puissent y répondre et, le cas échéant, amender les normes dans un délai opportun.

La Commission a discuté de ce sujet et a des éventuels mécanismes à mettre en place pour favoriser la communication entre les Laboratoires de référence de l'OIE ainsi qu'avec les autres laboratoires. La Commission est convenue que ce sujet nécessitait un examen plus approfondi et la consultation des experts des Laboratoires de référence. En parallèle, tout laboratoire disposant d'informations sur la performance des tests de diagnostic recommandés par le *Manuel aquatique* peut adresser ses commentaires aux Laboratoire de référence de l'OIE concernés ou au Secrétariat de la Commission des animaux aquatiques.

4. GROUPES AD HOC

4.1. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à l'infection par les maladies listées par l'OIE

Le Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à l'infection par les maladies listées par l'OIE s'est réuni en novembre - décembre 2021 afin de procéder aux évaluations de la sensibilité des espèces de mollusques à l'infection à *Marteilia refringens*.

La Commission des animaux aquatiques a été informée que le Groupe *ad hoc* n'a pas été en mesure d'achever ces évaluations de la sensibilité à l'infection à *M. refringens* en raison de la complexité de cet agent pathogène. La Commission a examiné et commenté le rapport intermédiaire du Groupe *ad hoc* qui présentait l'état d'avancement des travaux. Le Groupe *ad hoc* envisage de se réunir à nouveau en juin 2022 afin de finaliser les évaluations de la sensibilité des espèces à *M. refringens*.

4.2. Groupe *ad hoc* sur les nouveaux projets de chapitre 4.X. « Préparation aux situations d'urgence sanitaire » et 4.Y « Gestion des foyers de maladie »

Le Groupe *ad hoc* sur la préparation aux situations d'urgence sanitaire et la gestion des foyers de maladie s'est réuni en décembre 2021 afin d'initier les travaux d'élaboration des nouveaux chapitres 4.X. « Préparation aux situations d'urgence sanitaire » et 4.Y « Gestion des foyers de maladie », en tenant compte de la structure des articles présentée dans le rapport de réunion de la Commission des animaux aquatiques de février 2021.

La Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport intermédiaire du Groupe *ad hoc* et l'état d'avancement des travaux d'élaboration du chapitre 4.X. Elle a été informée que le Groupe *ad hoc* prévoyait de se réunir à nouveau en mars 2022 afin de poursuivre la rédaction des projets de chapitre.

4.3. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à l'infection par les maladies listées par l'OIE

La Commission a été informée que le Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poisson à l'infection par les maladies listées par l'OIE serait à nouveau réuni afin qu'il poursuive ses travaux d'évaluation de la sensibilité des espèces au regard des critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles du chapitre 1.5. Le Groupe *ad hoc* envisage de se réunir à deux reprises en 2022 pour procéder aux évaluations de la sensibilité des espèces de poisson à l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise.

5. CENTRES DE RÉFÉRENCE DE L'OIE OU CHANGEMENTS D'EXPERTS

5.1. Évaluation des candidatures au statut de Centre de référence de l'OIE dans le domaine de la santé des animaux aquatiques ou changements d'experts

Des demandes de changement d'expert de plusieurs Laboratoires de référence de l'OIE ont été soumises à la Commission des animaux aquatiques, qui a recommandé l'acceptation des candidatures suivantes :

Infection par le virus du syndrome des points blancs et maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë

Dr Han-Ching Wang succèdera au Dr Grace Lo à l'International Centre for Scientific Development of Shrimp Aquaculture, National Cheng Kung University (NCKU), Tainan District, New Taipei City, au Taipei chinois.

Infection à Mikrocytos mackini

Dr Cathryn Abbot succèdera au Dr Gary Meyer à la the Pacific Biological Station, Nanaimo, British Colombia, au Canada.

5.2. Examen des rapports annuels d'activités de 2021 des Centres de référence de l'OIE

Tous les Laboratoires de référence de l'OIE sur les maladies des animaux aquatiques (37) et tous les Centres collaborateurs dans le domaine des animaux aquatiques (3) ont adressé leurs rapports annuels.

Conformément aux Procédures de désignation des Laboratoires de Référence de l'OIE adoptées (Procédures opératoire standard ou SOPs) (<https://www.oie.int/fr/ce-que-nous-proposons/reseau-dexpertise/laboratoires-de-refererence/>) et aux Procédures de désignation des Centre collaborateurs de l'OIE (<https://www.oie.int/fr/ce-que-nous-proposons/reseau-dexpertise/centres-collaborateurs/>), la Commission des animaux aquatiques a examiné tous les rapports reçus. Elle a évalué, en particulier, la performance de chacun des Centres de référence au regard de ses termes de références, dans l'intérêt des Membres de l'OIE.

La Commission a noté que les Centres de référence avaient contribué de façon significative en 2021, en dépit des difficultés générées par la pandémie de Covid-19. Elle a tenu à remercier les experts désignés pour leurs contributions précieuses à la mission de l'OIE. La Commission des animaux aquatiques a exprimé sa vive appréciation vis-à-vis de l'appui enthousiaste et de l'expertise fournie par les Centres de référence à l'OIE. En particulier, la Commission est reconnaissante envers les experts des Laboratoires de référence de lui avoir apporté un appui constant et des contributions essentielles dans le cadre de la révision des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique*.

Une institution hébergeant certains Laboratoires de référence de l'OIE a transmis, dans chacun des rapports soumis, des informations d'ordre général sur l'ensemble des maladies entrant dans son champ d'expertise, rendant ainsi difficile l'exploitation de l'information spécifique à chacune de ces maladies. Il est donc demandé aux experts que les informations communiquées dans leurs rapports l'année prochaine soient spécifiques à chacune des maladies

Un Laboratoire a rapporté avoir perdu son accréditation ISO 17025 sur le système de gestion de la qualité suite à la réorientation de ses activités en santé des animaux aquatiques vers la santé humaine, dans le cadre de la réponse de son pays à la pandémie de COVID-19. Le Laboratoire envisage d'obtenir à nouveau l'accréditation cette année. Conformément aux Procédures opératoire standard, le statut de ce Laboratoire sera temporairement suspendu pour une période n'excédant pas deux ans. Son statut sera rétabli sous réserve qu'il apporte la preuve de son accréditation (le certificat) avant l'achèvement de cette période de deux ans. Dans le cas contraire, le Laboratoire perdra son statut et devra, une fois son accréditation obtenue, soumettre une nouvelle candidature à la Commission pour qu'elle l'évalue.

La Commission a relevé que très peu de laboratoires avaient initié des travaux de validation des tests de diagnostic aux fins de leur normalisation par l’OIE. Elle a donc encouragé les laboratoires à être plus actifs dans ce domaine. La Commission a également noté que le modèle de rapport des Laboratoires était rédigé de façon à prendre en compte uniquement le développement et la validation de nouvelles méthodes de diagnostic mais pas les méthodes de diagnostic déjà existantes. Par conséquent, la Commission est convenue de réviser le modèle de rapport lors de sa prochaine réunion, en septembre, afin que les questions adressées soient plus pertinentes au regard des activités réelles des Laboratoires de référence, de la Stratégie pour la santé des animaux aquatiques et du futur système scientifique de l’OIE.

5.3. Évaluation des candidatures au statut de laboratoire de référence de l’OIE pour l’infection par le virus 1 iridescent des décapodes

La Commission des animaux aquatiques a examiné une candidature au statut de Laboratoire de référence de l’OIE pour l’infection par le virus 1 iridescent des décapodes et a recommandé son acceptation :

Laboratoire de référence de l’OIE pour l’infection par le virus 1 iridescent des décapodes

Aquatic Medicine Laboratory, Biology Division of Animal Health Research Institute (AHRI), Council of Aquaculture, dans le Taipei chinois.

Tel.: (+886-2) 2621.2111 ext. 203; (+886-2) 762.3039

Courriel: ctu@mail.nvri.gov.tw; yplu@mail.nvri.gov.tw; Website: www.nvri.gov.tw

Expert référent désigné: Dr Chien Tu

6. PROCHAINE RÉUNION

La prochaine réunion de la Commission des animaux aquatiques se tiendra du 14 au 21 septembre 2022.

.../Annexes

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

Réunions virtuelles, les 24 et 27 janvier, ainsi que du 16 au 23 février 2022

Liste des participants

MEMBRES DE LA COMMISSION

Dr Ingo Ernst (Président) Director Aquatic Pest and Health Policy Animal Division Department of Agriculture, Water and the Environment GPO Box 858 Canberra ACT 2601 AUSTRALIE Tel.: +61 2 6272 5615 ingo.ernst@awe.gov.au	Dr Kevin William Christison Department of Forestry, Fisheries and the Environment Directorate: Aquaculture Research and Development Private Bag X 2 Vlaeberg, 8018 AFRIQUE DU SUD KChristison@dff.e.gov.za	Dr Alicia Gallardo Lagno (Vice-Présidente) Senior adviser FARMAVET University of Chile Av. Santa Rosa 1175, La Pintana CHILI Tel.: +56 2 985609 agallardol@gmail.com
--	---	--

Dr Fiona Geoghegan

(Vice-Présidente)
Legislative Officer
European Commission
DG SANTE,
101 Rue Froissart,
Brussels 1000,
BELGIQUE
fiona.geoghegan@ec.europa.eu

Dr Prof. Hong Liu

Deputy Director
Animal and Plant Inspection and Quarantine
Technical Center
Shenzhen Customs District
General Administration of Customs,
1011 building of Fuqiang Road
Futianqu, Shenzhen City, Guangdong
province
RÉPUBLIQUE POPULAIRE DE CHINE
szc_liuhong@customs.gov.cn
709274714@qq.com

Dr Espen Rimstad

Professor in virology
Faculty of Veterinary Medicine
Department of Paraclinical Sciences
(PARAFAG)
Campus Ås
Universitetstunet 3, 1430 Ås
NORVÈGE
Espen.rimstad@nmbu.no

AUTRES PARTICIPANTS

Dr Edmund Peeler

Epidemiologist
Aquatic Pests and Pathogens, Barrack Road,
Weymouth
Dorset, DT4 8UB
ROYAUME UNI
Tel.: +44 (0)1305 206746
ed.peeler@cefas.co.uk

Dr Mark Crane

CSIRO Honorary Fellow
Research Group Leader | AAHL Fish
Diseases Laboratory
Australian Centre for Disease Preparedness
(ACDP) | CSIRO
5 Portarlington Road Geelong
VIC 3220
Private Bag 24 Geelong VIC 3220
AUSTRALIE
Tel.: +61 3 5227 5118
mark.anne.crane@gmail.com

SIÈGE DE L'OIE

Dr Gillian Mylrea

Cheffe
Service des normes
g.mylrea@oie.int

Dr Gounalan Pavade

Coordinateur scientifique, Service des
Sciences
g.pavade@oie.int

Dr Stian Johnsen

Chargé de mission
Service des Normes
s.johnsen@oie.int

Ms Sara Linnane

Agent scientifique – Normes internationales
Service des Sciences
s.linnane@oie.int

Dr Bernita Giffin

Coordinatrice scientifique pour la santé des
animaux aquatiques
Service des Normes
b.giffin@oie.int

Dr Benedetto Zangrilli

Coordinateur scientifique pour la santé
des animaux aquatiques
Service des Normes
b.zangrilli@oie.int

Ms Elizabeth Marier

Chargeée de mission
Service des Normes
e.marier@oie.int

[Retour à l'ordre du jour](#)

PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES

Textes proposés pour adoption lors de la Session générale de mai 2022

<i>Code aquatique</i>			
<i>Chapitre/Sujet</i>	<i>Statut</i>		
	<i>Septembre 2021</i>	<i>Février 2022</i>	<i>Mai SG 2022</i>
Guide de l'utilisateur	Examen de la version amendée des articles puis soumission d'une nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Définitions de « Autorité compétente », « Autorité vétérinaire » et « Services chargés de la santé des animaux aquatiques » figurant dans le Glossaire	Examen des commentaires du premier cycle de consultation puis soumission d'une nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Définitions de « Conditions élémentaires de sécurité biologique », « Plan de sécurité biologique », « Système de détection précoce » et « Surveillance passive » figurant dans le Glossaire	Examen des commentaires du premier cycle de consultation puis soumission d'une nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Inclusion de l'infection par le virus du tilapia lacustre (TiLV) dans le chapitre 1.3.	Nouvelle évaluation de l'infection par le TiLV en vue de son inclusion dans la liste du chapitre 1.3.	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 1.4. « Surveillance de la santé des animaux aquatiques »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Modèles d'article X.X.X4. à X.X.8. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies aux fins de la déclaration du statut indemne d'infection par [l'agent pathogène X]	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Marchandises dénuées de risque – Articles 9.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des crustacés	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 9.X. « Infection par le virus 1 iridescent des décapodes »	Examen de la version amendée du chapitre puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Marchandises dénuées de risque – Articles 10.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des poissons	Examen de la version amendée des articles puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 10.1. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique »	Examen de la version amendée des articles puis soumission d'une nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 10.7. « Infection par l'herpèsvirus de la carpe koi »	Examen de la version amendée des articles puis soumission d'une nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Espèces sensibles – Articles 11.1.1. et 11.1.2. du chapitre 11.1. « Infection par l'herpèsvirus de l'ormeau »	Examen du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission de la version amendée des articles aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Espèces sensibles – Articles 11.2.1. et 11.2.2. du chapitre 11.2. « Infection à <i>Bonamia exitiosa</i> »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption

Manuel aquatique

Chapitre/Sujet	Statut		
	Septembre 2021	Février 2022	Mai SG 2022
Chapitre 2.3.0. « Informations générales » (maladies des poissons)	Mise à jour de la section 2.5. et soumission de la version amendée aux Membres pour avis	Examen des commentaires	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 2.3.4. « Infection par des variants déletés dans la RHP du virus de l'anémie infectieuse du saumon ou aux variants RHP0 de ce virus »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation) puis nouvelle soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 2.3.6. « Infection par l'herpèsvirus de la carpe koï »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation) puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.1. « Infection par l'herpèsvirus de l'ormeau »	Examen du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> puis soumission de la version amendée des sections aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à <i>Bonamia exitiosa</i> »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation) puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption

Travaux en cours en vue d'une adoption en 2023 ou à une date ultérieure

Chapitre/Sujet	Code aquatique		
	Septembre 2021	Février 2022	Septembre 2022
Suivi des maladies émergentes et examen des actions à prendre	En cours		
Nouveau chapitre 4.X. sur la préparation aux situations d'urgence	Demande d'établir d'un Groupe <i>ad hoc</i>	Prise en compte du rapport de Groupe <i>ad hoc</i>	Examen de la proposition de chapitre 4.X. par la CAA
Nouveau chapitre 4.Y. sur la gestion des foyers de maladie	Nécessité d'établir un Groupe <i>ad hoc</i>	Élaboration, par le Groupe <i>ad hoc</i> , du projet de chapitre une fois que le chapitre 4.X aura été achevé.	Élaboration, par le Groupe <i>ad hoc</i> , du projet de chapitre une fois que le chapitre 4.X aura été achevé.
Marchandises dénuées de risques – Articles 8.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens		Examen des commentaires puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Article 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (Hépatopancréatite nécrosante) »		Examen des commentaires puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Espèces sensibles – Articles 9.4.1. et 9.4.2. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »		Examen des commentaires puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation))
Espèces sensibles – Maladies des poissons – Articles 10.X.1. et 10.X.2. des chapitres relatifs à : – l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise/ l'infection par le virus de la nécrose rénale et splénique – l'infection à <i>Aphanomyces invadans</i> (syndrome ulcératif épizootique).		Demande d'établir à nouveau un Groupe <i>ad hoc</i> pour l'évaluation de l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise et de l'infection par le virus de la nécrose rénale et splénique, planifiée en avril 2022	Examen du rapport du groupe <i>ad hoc</i>
Espèces sensibles Évaluation, si nécessaire, de la sensibilité de nouvelles espèces à certaines maladies précédemment étudiées	Selon les besoins		

Chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre » (en attente de l'adoption de son inclusion dans la liste des maladies)			Examen du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis
Espèces sensibles – Maladies des mollusques – Articles 11.X.1. et 11.X.2. des chapitres relatifs à : – l'infection à <i>Marteilia refringens</i> – l'infection à <i>Xenohaliotis californiensis</i> – l'infection à <i>Perkinsus marinus</i> – l'infection à <i>Perkinsus olseni</i>	Demande de la poursuite des évaluations par le Groupe <i>ad hoc</i>	Tenue de la prochaine réunion du groupe <i>ad hoc</i> en juin 2022	Examen du rapport du groupe <i>ad hoc</i>
Marchandises dénuées de risques – Maladies des mollusques – Articles 11.X.3.		Examen des commentaires puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Manuel aquatique			
Chapitre/Sujet	Statut		
	Septembre 2021	Février 2022	Septembre 2022
L'utilisation des méthodes de l'ADN environnemental à des fins de surveillance des maladies des animaux aquatiques	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires des Membres suivi de la mise en ligne du texte sur le site de l'OIE	
Niveaux de validation et système de notation des tests figurant dans le Tableau 4.1	Examen des commentaires suivi de leur envoi aux Laboratoires de référence pour expertise	Examen des commentaires des Laboratoires de référence	
Chapitre 2.2.0. « Informations générales » du Titre 2.2. Maladies des crustacés »			Examen du chapitre amendé et soumission aux Membres pour avis
Chapitre 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë »		Mise à jour, reformatage puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Chapitre 2.2.2. « Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse) »		Mise à jour et reformatage	Examen du projet de chapitre ainsi amendé et soumission aux Membres pour avis
Chapitre 2.2.3. « Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante »		Mise à jour, reformatage puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »		Mise à jour, reformatage puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Chapitre 2.2.6. Infection par le nodavirus de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (maladie des queues blanches)		Mise à jour et reformatage	Examen du projet de chapitre ainsi amendé et soumission aux Membres pour avis
Chapitre 2.2.X. Infection par le virus 1 iridescent des décapodes			Élaboration d'un projet de chapitre destiné à être examiné par les membres
Chapitre 2.3.2. Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique	Mise à jour, reformatage puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)
Chapitre 2.3.1. Infection à <i>Aphanomyces invadans</i> (syndrome ulcératif épizootique)	Mise à jour, reformatage puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen de la version du chapitre mise à jour puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)
Chapitre 2.3.7. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise »	Mise à jour, reformatage puis soumission de la nouvelle version aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)
Chapitre 2.3.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre » (en attente de son inclusion dans la liste des maladies)			Élaboration d'un projet de chapitre destiné à être examiné par les membres

Hiérarchisation des tâches à entreprendre avant mai 2024 selon leur degré de priorité

Code aquatique			
Chapitre/Sujet	Statut	Degré de priorité 1	Degré de priorité 2
Évaluations de la sécurité des marchandises (pour toutes les maladies)	Examen des nouveaux éléments de preuve scientifiques et mise à jour des normes si nécessaire	✓	
Chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OIE »	Examen des maladies nouvelles ou non en vue de leur inclusion ou de leur retrait de la Liste des maladies de l'OIE		En cours
Chapitre 4.2. « Zonage et compartimentation »	Modification du chapitre afin de l'axer uniquement sur le zonage		✓
Chapitre 4.3. « Application de la compartimentation »	Modification du chapitre afin qu'il fournisse de meilleures orientations et qu'il soit en ligne avec le chapitre 4.1. sur la sécurité biologique	✓	
Ajout d'un nouveau chapitre sur les animaux aquatiques d'ornement dans le Titre 5	Élaboration d'une nouvelle norme afin de faciliter les échanges commerciaux d'animaux aquatiques d'ornement	✓	
Ajout d'un nouveau chapitre sur le matériel génétique dans le Titre 5	Élaboration d'une nouvelle norme afin de faciliter les échanges commerciaux de matériel génétique	✓	
Mise à jour de la liste des espèces figurant dans les articles 9.X.1. et 9.X.2.	Maladies des crustacés restant à examiner: - Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (Peste de l'écrevisse) - Infection par le virus du syndrome des points blancs		Selon le degré d'avancement des travaux nécessaires à la mise à jour des évaluations de la sensibilité des espèces de poissons et de mollusques à l'ensemble des maladies listées par l'OIE
Manuel aquatique			
Chapitre/Sujet	Statut	Degré de priorité 1	Degré de priorité 2
Chapitres 2.2.X. relatifs aux maladies des crustacés	Mise à jour et reformatage des chapitres selon le nouveau modèle de chapitre (Infection par le virus de la myonécrose infectieuse, infection par le virus du syndrome de Taura, infection par le virus du syndrome des points blancs, Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune)	✓	
Chapitre 2.4.0. « Informations générales » du Titre 2.4. « Maladies des mollusques »	Examen et mise à jour du chapitre introductory sur les maladies des mollusques		✓
Chapitres 2.4.X. relatifs aux maladies des mollusques	Mise à jour et reformatage des chapitres selon le nouveau modèle de chapitre (pour toutes les maladies)		✓

[Retour à l'ordre du jour](#)

**ARTICLES 9.X.3. DESTINÉS AUX CHAPITRES SPÉCIFIQUES
AUX MALADIES DES AMPHIBIENS
(VERSIONS AVEC ET SANS LES MARQUES DE RÉVISION)**

CHAPITRE 8.1.

INFECTION À *Batrachochytrium dendrobatidis*

[...]

Article 8.1.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. dendrobatidis*

- 1) Il a été démontré que Les produits issus d'animaux aquatiques suivants énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisaient aux critères d'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 8.1.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.1.4., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *B. dendrobatidis*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. dendrobatidis* :
 - 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60 °C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. dendrobatidis* :
 - a) produits à base d'amphibiens 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 dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *B. dendrobatidis*) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits à base d'amphibiens cuits 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 de *B. dendrobatidis*) ;
 - c) produits à base d'amphibiens 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 de *B. dendrobatidis*) ;
 - 2) produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique (ayant subi été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100 °C 60 °C pendant au moins 30-cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. dendrobatidis* toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *B. dendrobatidis*) ;
 - 3) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.
- 2) Les Autorités compétentes doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.1.7. à 8.1.12. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. dendrobatidis* lorsqu'elles autorisent l'importation, ou le transit par leur territoire, de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 8.1.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 8.1.3.
- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation, ou le transit par son territoire, de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 8.1.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de transmission de *B. dendrobatidis*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 8.1.

INFECTION À *BATRACHOCHYTRIUM DENDROBATIDIS*

[...]

Article 8.1.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. dendrobatis*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *B. dendrobatis*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment d'exportation* au regard de l'infection à *B. dendrobatis* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. dendrobatis* ;
- 2) produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. dendrobatis* ;
- 3) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 8.2.

INFECTION À *BATRACHOCHYTRIUM SALAMANDRIVORANS*

[...]

Article 8.2.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans*

- 1) Il a été démontré que les produits issus d'animaux aquatiques suivants énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisaient aux critères d'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 8.2.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.1.4., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *B. salamandrivorans*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans* :
- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'eau au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui-inactive *B. salamandrivorans* ;
 - a) produits à base d'amphibiens 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 dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *B. salamandrivorans*) et présentés en conditionnement hermétique ;
 - b) produits à base d'amphibiens cuits 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 de *B. salamandrivorans*) ;
 - c) produits à base d'amphibiens 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 de *B. salamandrivorans*) ;
 - 2) produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique (ayant subi été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'eau au moins 100°C 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. salamandrivorans* toute combinaison de température et de temps dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation de *B. salamandrivorans*) ;
 - 3) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.
 - 2) Les Autorités compétentes doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.2.7. à 8.2.12. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans* lorsqu'elles autorisent l'importation, ou le transit par leur territoire, de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 8.2.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 8.2.3.
 - 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation, ou le transit par son territoire, de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 8.2.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de transmission de *B. salamandrivorans*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 8.2.

INFECTION À *BATRACHOCHYTRIUM SALAMANDRIVORANS*

[...]

Article 8.2.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrvorans*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *B. salamandrvorans*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment d'exportation* au regard de l'infection à *B. salamandrvorans* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'eau au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. salamandrvorans* ;
- 2) produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'eau au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. salamandrvorans* ;
- 3) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 8.3.

INFECTION PAR LES ESPÈCES DU GENRE *RANAVIRUS*

[...]

Article 8.3.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus*

- 1) Il a été démontré que les produits issus d'animaux aquatiques suivants énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisaient aux critères d'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 8.3.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.1.4., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait aux espèces du genre *Ranavirus*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus* :
- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui-inactive les espèces du genre *Ranavirus* ;
- a) produits à base d'amphibiens 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 dont l'équivalence a été démontrée en termes d'inactivation des espèces du genre *Ranavirus*) et présentés en conditionnement hermétique ;
- b) produits à base d'amphibiens cuits ayant subi un traitement thermique à 65 °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 des espèces du genre *Ranavirus*) ;
- c) produits à base d'amphibiens 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 des espèces du genre *Ranavirus*) ;
- d2) produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique (ayant subi été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 65°C à 100 °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 à un couple temps/température équivalent qui inactive les espèces du genre *Ranavirus*).
- 2) Les Autorités compétentes doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.3.7. à 8.3.12. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus* lorsqu'elles autorisent l'importation, ou le transit par leur territoire, de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 8.3.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 8.3.3.
- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1. lorsqu'elle envisage l'importation, ou le transit par son territoire, de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à une espèce non visée à l'article 8.3.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de transmission des espèces du genre *Ranavirus*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 8.3.

INFECTION PAR LES ESPÈCES DU GENRE *RANAVIRUS*

[...]

Article 8.3.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait aux espèces du genre *Ranavirus*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment d'exportation* au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive les espèces du genre *Ranavirus* ;
- 2) produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 65°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive les espèces du genre *Ranavirus*.

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

**ARTICLES 11.X.3. DESTINÉS AUX CHAPITRES SPÉCIFIQUES
AUX MALADIES DES MOLLUSQUES
(VERSIONS AVEC ET SANS MARQUES DE RÉVISION APPARENTES)**
(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.1.

INFECTION PAR L'HERPÈSVIRUS DE L'ORMEAU

[...]

Article 11.1.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau

- 4) Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.1.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à l'herpèsvirus de l'ormeau, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau :
 - 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de l'ormeau ;
 - a) produits à base d'ormeaux 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 dans un conditionnement hermétique ;
 - b2) produits à base d'ormeaux séchés par un procédé mécanique (c'est à dire ayant subi un traitement thermique à 100 °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 l'herpèsvirus de l'ormeau) ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de l'ormeau.
 - 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 11.1.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 11.1.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites par les articles 11.1.7. à 11.1.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau.
 - 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.1.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.1.

INFECTION PAR L'HERPÈSVIRUS DE L'ORMEAU

[...]

Article 11.1.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à l'herpèsvirus de l'ormeau, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment d'exportation* au regard de l'infection par l'herpèsvirus de l'ormeau :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'eau moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de l'ormeau ;
- 2) produits à base d'ormeaux séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'eau moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de l'ormeau.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.2.

INFECTION À *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Article 11.2.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. exitiosa*

4. Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.2.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *B. exitiosa*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. exitiosa* :
 - a) 1) chair d'huître à l'état congelé, et
 - b) 2) huîtres congelées en demi-coquille.
- 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 11.2.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 11.2.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites par les articles 11.2.7. à 11.2.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. exitiosa*.
- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.2.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection à *B. exitiosa*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.2.

INFECTION À *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Article 11.2.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. exitiosa*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *B. exitiosa*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *B. exitiosa* :

- 1) chair d'huître à l'état congelé, et
- 2) huîtres congelées en demi-coquille.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.3.

INFECTION À *BONAMIA OSTREAEE*

[...]

Article 11.3.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. ostreae*

4. Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.3.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *B. ostreae*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. ostreae* :
 - a)1) chair d'huître à l'état congelé, et
 - b)2) huîtres congelées en demi-coquille.- 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 11.3.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 11.3.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites dans les articles 11.3.7. à 11.3.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. ostreae*.
- 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.3.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection à *B. ostreae*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.3.

INFECTION À *BONAMIA OSTREAEE*

[...]

Article 11.3.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. ostreae*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *B. ostreae*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *B. ostreae* :

- 1) chair d'huître à l'état congelé, et
- 2) huîtres congelées en demi-coquille.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPTER 11.4.

INFECTION À *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

Article 11.4.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *M. refringens*

4. **Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.4.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *M. refringens*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *M. refringens* :**
- 1) **produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *M. refringens*.**
- 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 11.4.2. autres que ceux mentionnés au point 1 de l'article 11.4.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites par les articles 11.4.7. à 11.4.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *M. refringens*.**
- 3) **L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.4.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection à *M. refringens*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.**

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.4.

INFECTION WITH *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

Article 11.4.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *M. refringens*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *M. refringens*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment d'exportation* au regard de l'infection à *M. refringens*:

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *M. refringens*.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.5.

INFECTION À *PERKINSUS MARINUS*

[...]

Article 11.5.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. marinus*

4. Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.5.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *P. marinus*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. marinus* :
 - 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. marinus*.
 - 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 11.5.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 11.5.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites par les articles 11.5.7. à 11.5.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. marinus*.
 - 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.5.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection à *P. marinus*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.5.

INFECTION À *PERKINSUS MARINUS*

[...]

Article 11.5.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. marinus*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *P. marinus*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *P. marinus* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. marinus*.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.6.

INFECTION À *PERKINSUS OLSENI*

[...]

Article 11.6.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. olseni*

4. Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.6.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1., les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *P. olseni*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. olseni*:
 - 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. olseni*.
 - 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 11.6.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 11.6.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites par les articles 11.6.7. à 11.6.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. olseni*.
 - 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.6.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection à *P. olseni*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.6.

INFECTION À *PERKINSUS OLSENI*

[...]

Article 11.6.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. olseni*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *P. olseni*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *P. olseni*:

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. olseni*.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.7.

INFECTION À *XENOHALIOTIS CALIFORNIENSIS*

[...]

Article 11.7.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *X. californiensis*

4. Les produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères de l'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent, pour quelque usage que ce soit, l'importation ou le transit par leur territoire des de ces produits issus d'animaux aquatiques énumérés ci-dessous 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 de l'une des espèces visées à l'article 11.7.2. et que ces produits satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.1, les Autorités compétentes ne doivent imposer aucune condition mesure sanitaire ayant trait à *X. californiensis*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *X. californiensis* :
 - 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *X. californiensis*.
 - 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 11.7.2. autres que ceux énumérés au point 1 de l'article 11.7.3., les Autorités compétentes doivent exiger le respect des conditions prescrites par les articles 11.7.7. à 11.7.11. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *X. californiensis*.
 - 3) L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le 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 11.7.2., mais dont on peut raisonnablement s'attendre à ce qu'ils posent un risque en termes de propagation de l'infection à *X. californiensis*. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.

[...]

(VERSION SANS LES MARQUES DE RÉVISION APPARENTES)

CHAPITRE 11.7.

INFECTION À *XENOHALIOTIS CALIFORNIENSIS*

[...]

Article 11.7.3.

Mesures pour l'importation, ou le transit par le territoire, de produits issus d'animaux aquatiques indépendamment de l'usage auquel ils sont destinés et du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *X. californiensis*

Les *produits issus d'animaux aquatiques* énumérés ci-dessous ont été évalués comme satisfaisant aux critères d'évaluation de la sécurité des *produits issus d'animaux aquatiques* conformément à l'article 5.4.1. Lorsqu'elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* de ces *produits issus d'animaux aquatiques*, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune *mesure sanitaire* ayant trait à *X. californiensis*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment d'exportation* au regard de l'infection à *X. californiensis* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 121°C pendant au moins 3 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *X. californiensis*.

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPITRE 9.3.

INFECTION À *HEPATOBACTER PENAEI* (HÉPATOPANCRÉATITE NÉCROSANTE)

Article 9.3.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection à *Hepatobacter penaei* » (hépatopancréatite nécrosante) désigne une infection causée par *Candidatus Hepatobacter penaei*; appartenant à l'ordre des alpha-protéobactéries, cet *agent pathogène* est une bactérie intracellulaire obligatoire. ~~La maladie est communément dénommée « hépatopancréatite nécrosante ».~~

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

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPITRE 9.4.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HYPODERMIQUE ET HÉMATOPOÏTIQUE INFECTIEUSE S

Article 9.4.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » désigne une *infection* causée par le *penstyldensevirus penstylhamaparvovirus* 1 des décapodes; couramment désigné comme le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse; il s'agit d'un *agent pathogène* appartenant au genre *Penstyldensevirus Penstylhamaparvovirus* et à la famille des Parvoviridae.

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

Article 9.4.2.

Champ d'application

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

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPTER 2.2.1.

ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE

1. Scope

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) means infection with strains of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photorhabdus* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only *Vp*_{AHPND} has been demonstrated to cause AHPND.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

AHPND has a bacterial aetiology (Kondo *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). It is caused by specific virulent strains of *V. parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) that contain a ~70-kbp plasmid with genes that encode homologues of the *Photorhabdus* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within *Vp*_{AHPND} has been designated pVA1, and its size may vary slightly. Removal (or "curing") of pVA1 abolishes the AHPND-causing ability of *Vp*_{AHPND} strains.

Within a population of *Vp*_{AHPND} bacteria, natural deletion of the Pir^{vp} operon may occur in a few individuals (Lee *et al.*, 2015; Tinwongger *et al.*, 2014). This deletion is due to the instability caused by the repeat sequences or transposase that flank the Pir toxin operon. When the deletion occurs, it means that a *Vp*_{AHPND} strain will lose its ability to induce AHPND. However, if the Pir toxin sequence is used as a target for detection, then a colony that has this deletion will produce a negative result even though the colony was derived from an isolate of AHPND-causing *Vp*_{AHPND}. A recent report describes a naturally occurring deletion mutant of *Vp*_{AHPND} that does not cause a clinical manifestation of AHPND (Aranguren *et al.*, 2020a).

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.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

AHPND cannot be transmitted from infected samples that have been stored frozen (Tran *et al.*, 2013). Some *Vibrio* species are sensitive to freezing (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson & Thacker, 1973).

2.1.3. Survival and stability outside the host

*Vp*_{AHPND} is expected to possess similar properties to other strains of *V. parahaemolyticus* found in seafood that have been shown to survive up to 9 and 18 days in filtered estuarine water and filtered seawater at an ambient temperature of 28 ± 2°C (Karunasagar *et al.*, 1987).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to AHPND according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: f²leshy prawn (*Penaeus chinensis*).

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: kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

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; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). De la Pena *et al.* (2015) reported disease outbreaks in the Philippines occurring as late as 46–96 days after pond-stocking.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Gut, stomach, and hepatopancreas.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

In experimental challenges, *Macrobrachium rosenbergii* and *Cherax quadricarinatus* did not show clinical signs of the disease or histopathological changes induced by AHPND but tested positive by PCR assay. However, whether these species serve as reservoirs of infection or are resistant to AHPND needs further investigation (Powers *et al.*, 2021; Schofield *et al.*, 2020).

2.2.6. Vectors

No vector is known, although as *Vibrio* spp. are ubiquitous in the marine environment, the possibility that there are vector species could be expected.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

AHPND is characterised by sudden, mass mortalities (up to 100%) usually within 30–35 days of stocking grow-out ponds with PLs or juveniles (Hong *et al.*, 2016). Older juveniles may also be affected (de la Pena *et al.*, 2015).

In regions where AHPND is enzootic in farmed shrimp, evidence indicates a near 100% prevalence (Tran *et al.*, 2014).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

The onset of clinical signs and mortality can start as early as 10 days post-stocking. Clinical signs include a pale-to-white hepatopancreas (HP), significant atrophy of the HP, soft shells, guts with discontinuous, or no contents and 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, 2014).

2.3.3 Gross pathology

AHPND has three infection phases. In the acute phase, there is massive and progressive degeneration of the HP tubules from proximal to distal, with significant rounding and sloughing of the HP tubule epithelial cells into the lumen of the tubule, the HP collecting ducts and the posterior stomach and the absence of bacterial cells. In the terminal phase, the HP shows intra-tubular haemocytic inflammation and develops massive secondary bacterial infections that occur in association with the necrotic and sloughed HP tubule cells. Animals that survive an acute infection reach a chronic phase, in which they present with limited cellular changes in the hepatopancreas tubule and only a few tubules with epithelial necrosis accompanied by bacteria and inflammation. The chronic phase pathology resembles a septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) (Aranguren *et al.*, 2020a; NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

VpAHPND has been transmitted experimentally by immersion, feeding (*per os*) and reverse gavage (Dabu *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation.

2.3.5. Environmental factors

Water sources with low salinity (<20 ppt) seem to reduce the incidence of the disease. Peak occurrence seems to occur during the hot, dry season from April to July. Overfeeding, poor seed quality, poor water quality, poor feed quality, algal blooms or crashes are also factors that may lead to occurrences of AHPND in endemic areas (NACA, 2014).

2.3.6. Geographical distribution

The disease was initially reported in Asia in 2010. It has since been reported in the Americas (2013) and Africa (2017).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

Not available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Not available.

2.4.3. Immunostimulation

None known to be effective.

2.4.4. Breeding resistant strains

Not available.

2.4.5. Inactivation methods

Experimental studies have shown that *Vp_{AHPND}* could not be transmitted via frozen infected shrimp (Tran *et al.*, 2013). Similarly, other strains of *V. parahaemolyticus* are known to be sensitive to freezing, refrigeration, heating and common disinfectants (Muntada-Garriga *et al.*, 1995; Thomson & Thacker, 1973).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not available.

2.4.7. General husbandry

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, appropriate stocking density etc. are all well-established practices that reduce the impact of disease, including AHPND. An AHPND-tolerant line of *P. vannamei* was recently reported, but at present (2022) no genetically improved lines are commercially available (Aranguren *et al.*, 2020b).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Samples of moribund shrimp or shrimp that show clinical signs (see Section 2.3.2) should be selected for AHPND diagnosis. It is assumed that adults (broodstock) can carry strains of *Vp_{AHPND}* (Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013). Therefore, broodstock without clinical signs may also be selected for diagnostic testing.

3.2. Selection of organs or tissues

Samples may be taken from gut-associated tissues and organs, such as the hepatopancreas, stomach, midgut and hindgut. In the case of valuable broodstock, non-lethal faecal samples may be collected instead, however the utility of faecal samples compared with tissue samples has not been evaluated.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Samples other than gut-associated tissues and organs are not appropriate (NACA, 2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

3.4. Non-lethal sampling

Faecal matter may be collected from valuable broodstock for AHPND diagnosis. However, compared with tissue sampling, the relative utility of faecal samples for detecting AHPND-causing bacteria has not been evaluated.

3.5. 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 PCR detection and (iii) preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Lee *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

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

3.5.1. Samples for pathogen isolation

High quality samples are essential for successful pathogen isolation and bioassay. Sample quality depends mainly on the time since collection and time spent in storage. Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animals and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. Alternatively, samples can be preserved in DNAZol for PCR testing. If material cannot be fixed it may be frozen.

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Tissue samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridization can be preserved in Davidson's AFA fixative for histology (Joshi *et al.*, 2014a; 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Sirikharin *et al.*, 2015; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013).

3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for bacterial isolation or molecular detection.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology		+	+	NA		+	+	NA				
Cell culture												
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	2
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
In-situ hybridisation												
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively; NA = Not available.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

Not applicable.

4.2. Histopathology and cytopathology

The disease has three 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 (Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- 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 (NACA, 2012; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- iii) The chronic phase is characterised by only a few tubules with epithelial necrosis accompanied by bacteria and inflammation. This phase resembles a septic hepatopancreatic necrosis (SHPN) (Aranguren *et al.*, 2020b).

4.3. Cell culture for isolation

4.3.1. Enrichment of samples prior to DNA extraction

Preliminary enrichment culture for detection of *Vp_{AHPND}* 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.

4.3.2. Agent purification

Vp_{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.*, 2013). Confirmation of identification of *Vp_{AHPND}* may be undertaken by PCR analysis.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods have been developed that target the *Vp_{AHPND}* toxin genes. The AP3 method is a single-step PCR that targets the 12.7 kDa PirA^{VP} gene (Sirikharin *et al.*, 2015). It was validated for 100% positive and negative predictive value by testing 104 isolates of *Vp_{AHPND}* and non-pathogenic bacteria (including other *Vibrio* and non-*Vibrio* species) that had previously been tested by bioassay (Sirikharin *et al.*, 2015). Subsequently, Soto-Rodriguez *et al.* (2015), using 9 *Vp_{AHPND}* 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 *Vp_{AHPND}* 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 Section 4.3.1. *Enrichment of samples prior to DNA extraction*) is recommended.

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

In addition, real-time PCR methods, for example the *Vp_{AHPND}*-specific TaqMan real-time PCR developed by Han *et al.* (2015b), and an isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP) method developed by Koiwai *et al.* (2016) also have high sensitivity and can be used directly with tissue and environmental samples without an enrichment step.

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 Section 4.3). 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.

The following controls should be included in all *VpAHPND* 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 *VpAHPND*-affected shrimp tissue or DNA from an *VpAHPND*-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 use the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

4.4.1. Real-time PCR

This protocol is based on the method described by Han *et al.* (2015b). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Life Technologies) is used and extracted DNA is added to the real-time PCR mixture containing 0.3 µM of each primer and 0.1 µM probe to a final volume of 10 µl. Real-time PCR conditions consist of 20 seconds at 95°C, followed by 45 cycles of 3 seconds at 95°C and 30 seconds at 60°C. At the completion of the TaqMan real-time PCR assay, the presence of PirA DNA is demonstrated by the presence of specific amplicons, identified by software-generated characteristic amplification curves. No-template controls must have no evidence of specific amplicons. The primers and probe and target gene for the *VpAHPND*-specific real-time PCR are listed in Table 4.4.1.1.

Table 4.4.1.1. Primers and probe for the real-time PCR method for detection of *pirA* toxin gene

Primer/ probe name	Sequence (5'-3')	Target gene	Reference
VpPirA-F	TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG	pirA	Han <i>et al.</i> , 2015b
VpPirA-R	GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG		
VpPirA Probe	FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA		

4.4.2. Conventional PCR

One-step PCR detection of pVA1 plasmid

Two one-step PCR methods (AP1 and AP2) are described here for detection of the pVA1 plasmid in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.4.2.1.

Table 4.4.2.1. PCR primers for one-step PCR detection of pVA1 plasmid

Method name	Primers (5'-3')	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP1	AP1F: 5CCT-TGG-GTG-TGC-TTA-GAG-GAT-G AP1R: GCA-AAC-TAT-CGC-GCA-GAA-CAC-C	pVA1	700bp	Flegel & Lo (2014)
AP2	AP2F: TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G AP2R: CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G	pVA1	700bp	Flegel & Lo (2014)

Protocol for the AP1 and AP2 PCR methods

This protocol follows the method described by Flegel & Lo (2014). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP1/AP2F, 0.5 µl 10 µM AP1/AP2R, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 0.01–1 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 25–30 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 60 seconds with a final extension step at 72°C for 10 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C (<https://enaca.org/publications/health/disease-cards/ahpnd-detection-method-announcement.pdf>).

One-step PCR detection of PirA/PirB toxin genes

Four one-step PCR methods (AP3, TUMSAT-Vp3, VpPirA-284 and VpPirB-392) are described here for detection of Pir toxin genes in enrichment broth cultures. The primers, target gene and the size of the expected amplicons are listed in Table 4.4.2.3.

Table 4.4.2.2. PCR primers for one-step PCR detection of PirA and PirB toxin genes

Method name	Primers (5'-3')	Target gene	Expected amplicon size	Reference
AP3	AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA	<i>pirA^{Vp}</i>	333bp	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
TUMSA T-Vp3	TUMSAT-Vp3 F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA TUMSAT-Vp3 R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA	<i>pirA^{Vp}</i>	360bp	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
VpPirA-284	VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA	<i>pirA^{Vp}</i>	284bp	Han <i>et al.</i> , 2015a
VpPirB-392	VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA	<i>pirB^{Vp}</i>	392bp	Han <i>et al.</i> , 2015a

Protocol for the AP3 PCR method

This protocol follows the method described by Sirikharin *et al.* (2015). The PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 0.7 µl 50 mM MgCl₂, 0.4 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP3-F1, 0.5 µl 10 µM AP3-R1, 0.2 µl Taq DNA polymerase and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. For PCR a denaturation step of 94°C for 5 minutes is followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 53°C for 30 seconds and 72°C for 40 seconds with a final extension step at 72°C for 5 minutes and then the reaction mixture can be held at 4°C.

Protocol for the VpPirA-284 and VpPirB-392 PCR methods

This protocol follows the method described by Han *et al.* (2015a) and uses PuReTaq ready-to-go PCR beads (GE Healthcare). A 25 µl PCR reaction mixture is prepared with PuReTaq ready-to-go PCR beads. Each reaction contains 0.2 µM of each primer, 10 mM Tris/HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U of Taq DNA polymerase, and 1 µl of extracted DNA. For PCR a 3-minute denaturation step at 94°C is followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 7 minutes.

Protocol for the TUMSAT-Vp3 PCR method

This protocol follows the method described by Tinwongger *et al.* (2014). A 30 µl PCR mixture is prepared containing 1 µl DNA template, 10× PCR buffer, 0.25 mM dNTP mixture, 0.6 µM of each primer and 0.01 U Taq polymerase. PCR conditions consist of an initial preheating stage of 2 minutes at 95°C, followed by 30 cycles of 30 seconds denaturation at 95°C, 30 seconds annealing at 56°C and 30 seconds extension at 72°C.

AP4 nested PCR protocol for detection of Vp_{AHPND}

This protocol follows the method described by Dangtip *et al.* (2015). The first PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10× PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.5 µl 10 µM AP4-F1, 0.5 µl 10 µM AP4-R1, 0.3 µl of Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and approximately 100 ng of template DNA in a total volume of 25 µl made up with distilled water. The PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds and 72°C for 90 seconds with a final extension step at 72°C for 2 minutes and hold at 4°C.

The nested PCR reaction mixture consists of 2.5 µl 10x PCR mix, 1.5 µl 50 mM MgCl₂, 0.5 µl 10 mM dNTPs, 0.375 µl 10 µM AP4-F2, 0.375 µl 10 µM AP4-R2, 0.3 µl Taq DNA pol (5 units µl⁻¹) and 2 µl of the first PCR reaction in a total volume of 25 µl. The nested PCR protocol is 94°C for 2 minutes followed by 25 cycles of 94°C for 20 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds and hold at 4°C.

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.4.2.7. 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 4.4.2.3. Primers for the AP4, nested PCR method for detection of *PirA* and *PirB* toxin genes

Method name	Primers (5'-3')	Expected amplicon size	Reference
AP4 Step 1	AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA	1269	Dangtip <i>et al.</i> , 2015
AP4 Step 2	AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	230	

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 6× 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 4.4.2.1, 4.4.2.2 and 4.4.2.3) indicate a positive result.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Cruz-Flores *et al.* (2019) developed a multiplex real-time PCR-based SYBR green assay for simultaneous detection of *pirA*, *pirB*, 16S rRNA and 18S rRNA, and a duplex real-time PCR-based Taqman probe assay showing high specificity and sensitivity – limit of detection was 10 copies for both *pirA* and *pirB*.

A recombinase polymerase amplification assay was developed by Mai *et al.* (2021). This assay has a limit of detection of five copies of the *pirAB* gene and high specificity. A LAMP-based assay for AHPND detection developed by Koiwai *et al.* (2016) also shows high specificity and sensitivity.

4.5. Amplicon sequencing

The positive results obtained from conventional PCR described in 4.4.2 need to be confirmed by sequencing.

4.6. In-situ hybridisation

ISH is not currently available (December 2021).

4.7. Immunohistochemistry

An immunohistochemistry assay to detect AHPND was developed by Kumar *et al.*, (2019). However, the assay requires further validation.

4.8. Bioassay

*Vp*_{AHPND} has been transmitted experimentally by immersion and by reverse gavage (Joshi *et al.*, 2014b; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013), simulating natural horizontal transmission via oral routes and co-habitation. Thus, following isolation and purification of a bacterium that is suspected to cause AHPND, a bioassay can be performed to confirm the presence of the causative agent. The immersion procedure is carried out by immersing 15 shrimp for 15 minutes, with aeration, in a suspension (150 ml clean artificial seawater) of 2×10^8 cells of the cultured bacterium per ml. Following this initial 15-minute period, the shrimp and the inoculum are transferred to a larger tank with a volume of clean artificial seawater to make the final concentration of the bacterium 2×10^6 cells ml⁻¹. Shrimp are monitored at 6- to 8-hour intervals. Dead shrimp can be processed for *Vp*_{AHPND} PCR and sequence analysis. Moribund or surviving shrimp are processed for histology, bacterial re-isolation, PCR and sequence analysis. A positive bioassay is indicated by the detection of characteristic histological lesions and *Vp*_{AHPND} by PCR and amplicon sequence analysis.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (I-ELISA) for AHPND detection developed by Mai *et al.* (2020) showed high sensitivity (the limit of detection was 0.008 ng µl⁻¹ for PirA^{vp} and 0.008 ng µl⁻¹ for PirB^{vp}) and specificity.

4.10. Other methods

None.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR (Han *et al.*, 2015b) is recommended for demonstrating freedom from AHPND in an apparently healthy population.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision-making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status³

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with AHPND shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by any of the real-time or conventional PCR methods recommended in Table 4.1
- ii) Histo- or cytopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality

³ For example transboundary commodities.

- ii) A positive result by real-time PCR
- iii) A positive result by conventional PCR

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}), however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Conventional PCR	Diagnosis	Clinically diseased and apparently healthy shrimp	AHPND causing and non-causing bacterial isolates	<i>Penaeus vannamei</i>	100	100	Bioassay	Sirikharin <i>et al.</i> , 2015
Conventional PCR	Diagnosis	Clinically diseased and apparently healthy shrimp	AHPND causing and non-causing bacterial isolates	NA	100 ¹	100	Bioassay	Tinwongger <i>et al.</i> , 2014
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased animals	Hepato-pancreas	<i>Penaeus vannamei</i>	100	NA	Bioassay and histopathology	Han <i>et al.</i> 2015b

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, NA= Not available,
PCR: = polymerase chain reaction.

¹100% sensitivity for TUMSAT-Vp3 primer set

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity NA= Not available,
PCR: = polymerase chain reaction.

7. References

- ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., KANRAR S., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020a). A mutant of *Vibrio parahaemolyticus* pirAB_{VP} (+) that carries binary toxin genes but does not cause acute hepatopancreatic necrosis disease. *Microorganisms*, **8**, 1549.
- CRUZ-FLORES R., MAI H.N & DHAR A.K. (2019). Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of *Photobacterium* Insect-Related (Pir) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Mol. Cell. Probes*, **43**, 20–28.
- DABU I.M., LIM J.J., ARABIT P.M.T., ORENSE S.J.A.B., TABARDILLO J.A., CORRE V.L. & MANINGAS M.B.B. (2017). The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines. *Aquacult. Res.*, **48**, 792–799.
- DANGTIP S., SIRIKHARIN R., SANGUANRUT P., THITAMADEE S., SRITUNYALUCKSANA K., TAENGCHAIYAPHUM S., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG 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 PENA L.D., CABILLON N.A.R., CATEDRAL D.D., AMAR E.C., USERO R.C., MONOTILLA W.D., CALPE A.T., FERNANDEZ D.D. & 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.
- 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-Pacific, Bangkok, Thailand.
- GOMEZ-GIL B., SOTO-RODRÍGUEZ S., LOZANO R. & BETANCOURT-LOZANO M. (2014). Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00055-14.
- GOMEZ-JIMENEZ S., NORIEGA-OROZCO L., SOTELO-MUNDO R.R., CANTU-ROBLES V.A., COBIAN-GUEMES A.G., COTA-VERDUGO R.G., GAMEZ-ALEJO L.A., DEL POZO-YAUNER L., GUEVARA-HERNANDEZ E., GARCIA-OROZCO K.D., LOPEZ-ZAVALA A.A. & OCHOA-LEYVA A. (2014). High-quality draft genomes of two *Vibrio parahaemolyticus* strains aid in understanding acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimps in Mexico. *Genome Announc.*, **2**, e00800-14.
- HAN J.E., TANG K.F.J., TRAN L.H. & LIGHTNER D.V. (2015a). *Photobacterium* insect related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **113**, 33–40.
- HAN J.E., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (2015b). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, **442**, 12–15.
- HONG X.P., XU D., ZHUO Y., LIU H.Q. & LU L.Q. (2016). Identification and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates and immune responses of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **39**, 1085–1097.
- JOSHI J., SRISALA J., SAKAEW W., PRACHUMWAT A., SRITUNYALUCKSANA K., FLEGEL T.W. & THITAMADEE S. (2014a). Identification of bacterial agent(s) for acute hepatopancreatic necrosis syndrome, a new emerging shrimp disease. *Suranaree J. Sci. Technol.* Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/140283.pdf>.
- JOSHI J., SRISALA J., TRUONG V.H., CHEN I.T., NUANGSAENG B., SUTHIENKUL O., LO C.F., FLEGEL T.W., SRITUNYALUCKSANA K. & THITAMADEE S. (2014b). Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, **428–429**, 297–302.
- KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I., VENUGOPAL M.N. & NAGESHA C.N. (1987). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine and sea water and in association with clams. *Syst. Appl. Microbiol.*, **9**, 316–319.
- KOIWAI K., TINWONGGER S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2016). Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease strain of *Vibrio parahaemolyticus* using loop-mediated isothermal amplification. *J. Fish Dis.*, **39**, 603–606.
- KONDO H., TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R. & HIRONO I. (2014). Draft genome sequences of six strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease shrimp in Thailand. *Genome Announc.*, **2**, e00221-14.
- KONDO H., VAN P.T., DANG L.T. & HIRONO I. (2015). Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. *Genome Announc.*, **3**, e00978-15.

KUMAR V., BELS L.D., COUCK L., BARUAH K., BOSSIER P. & BROECK W.V.D. (2019). PirABVP Toxin Binds to Epithelial Cells of the Digestive Tract and Produce Pathognomonic AHPND Lesions in Germ-Free Brine Shrimp. *Toxins*, **11**, 717.

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 A.H., 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.

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.

MAI N.H., ARANGUREN L.F.C., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2021). Development of a Recombinase Polymerase Amplification (RPA) assay for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) detection in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Mol. Cell. Probes*, **57**, 101710.

MAI H.N., CRUZ-FLORES R. & DHAR A.K. (2020). Development of an indirect Enzyme Linked Immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against *Photorhabdus* insect related toxins, PirA^{Vp} and PirB^{Vp} released from *Vibrio* spp. *J. Microbiol. Methods*, **176**, 106002.

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. *Lett. Appl. Microbiol.*, **20**, 225–227.

NACA (2014). Acute hepatopancreatic necrosis disease card (updated June 2014). Published by the Network of Aquaculture Centres in Asia-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.

POWERS Q.M., ARANGUREN L.F., FITZSIMMONS K.M., McLAIN J.E. & DHAR A.K. (2021). Crayfish (*Cherax quadricarinatus*) susceptibility to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *J. Invertebr. Pathol.*, **186**, 107554.

SCHOFIELD P.J., NOBLE B.L., ARANGUREN CARO L.F., MAI H.N., PADILLA T.J., MILLABAS J. & DHAR A.K. (2020). Pathogenicity of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) on the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and Pacific White Shrimp, *Penaeus vannamei*, at various salinities. *Aquac. Res.*, **52**, 1480–1489.

SIRIKHARIN R., TAENGCHAIYAPHUM S., SANGUANRUT P., CHI T.D., MAVICHAK R., PROESPRAIWONG P., NUANGSAENG B., THITAMADEE S., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, Pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, **10**, e0126987. doi:10.1371/journal.pone.0126987.

SOTO-RODRIGUEZ S.A., GOMEZ-GIL B., LOZANO-OLVERA R., BETANCOURT-LOZANO M. & MORALES-COVARRUBIAS M.S. (2015). Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in northwestern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 1689–1699.

THOMSON W.K. & THACKER C.L. (1973). Effect of temperature on *Vibrio parahaemolyticus* in oysters at refrigerator and deep freeze temperatures. *Can. Inst. Food Sci. Tech. J.*, **6**, 156–158.

TINWONGGER S., PROESPRAIWONG P., THAWONSUWAN J., SRIWANAYOS P., KONGKUMNERD J., CHAWEEPAC T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2014). AHPND/EMS: From the academic science perspective to the production point of view. *Aquaculture Asia Pacific*, **10**, 14–18.

TRAN L., NUNAN L., REDMAN R.M., MOHNEY L.L., PANTOJA C.R., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (2013). 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 Announc.*, **2**, e00816-14.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for acute hepatopancreatic necrosis disease (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the OIE Reference Laboratory for any further information on
acute hepatopancreatic necrosis disease

NB: FIRST ADOPTED IN 2017; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH *HEPATOBACTER PENAEI* (NECROTISING HEPATOPANCREATITIS)

1. Scope

Infection with *Candidatus Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent *H. penaei*, an obligate intracellular bacterium of the Order *α-Proteobacteria*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Hepatobacter penaei is a pleomorphic, Gram-negative, intracytoplasmic bacterium (Nunan *et al.*, 2013). It is a member of the *α-Proteobacteria* (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). More recently it has been suggested that it belongs to the *Holosporaceae* family within the *Rickettsiales* (Leyva *et al.*, 2018). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism ($0.25 \times 0.9 \mu\text{m}$), whereas the helical form ($0.25 \times 2\text{--}3.5 \mu\text{m}$) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of *H. penaei* associated with North and South American outbreaks suggests that the isolates are either identical or very closely related subspecies (Loy *et al.*, 1996). Recently analysis based on the 16S rRNA confirm the high similarity among different *H. penaei* isolates in the Americas (99–100%) (Aranguren & Dhar, 2018).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Hepatobacter penaei-infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine. *Hepatobacter penaei* frozen at -20°C to -70°C and -80°C have been shown to retain infectivity in experimental transmission trials with *Penaeus vannamei* (Crabtree *et al.*, 2006; Frelier *et al.*, 1992). Flash freezing *H. penaei* at -70°C to -80°C does not significantly affect the infectivity (Aranguren *et al.*, 2010; Crabtree *et al.*, 2006).

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code* (*Aquatic Code*) include: whiteleg shrimp (*P. vannamei*)

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *H. penaei* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguiensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*) (Avila-Villa *et al.*, 2012; Bekavac *et al.*, 2022).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Infection with *H. penaei* has been demonstrated in postlarvae, juveniles, adults and broodstock of *P. vannamei* (Aranguren *et al.*, 2006).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The target tissue is the hepatopancreas: infection with *H. penaei* has been reported in all hepatopancreatic cell types (Lightner 2012). *Hepatobacter penaei* is also present in the faeces (Brinez et al., 2003).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of *P. vannamei* populations that survive infection with *H. penaei* may carry the intracellular bacteria for life and transmit it to other populations by horizontal transmission (Aranguren et al., 2006; Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

2.2.6. Vectors

No vectors are known in natural infections.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Infection with *H. penaei* results in the mortalities approaching 100% in *P. vannamei*, 5.6–15% in *P. duorarum*, and 5–17% in *P. aztecus* (Aguirre-Guzman et al., 2010).

The prevalence was reported as 0.77% in cultured *P. vannamei* and 0.43 in cultured *P. stylirostris* in Peru (Lightner & Redman, 1994), 5–86.2% in Mexico (Ibarra-Gamez et al., 2007), and 0.6–1.3% in *P. vannamei* in Belize, Brazil, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua and Venezuela (Morales-Covarrubias et al., 2011).

NHP-affected broodstock ponds in Colombia reported mortalities of up to 85%, while non NHP-affected broodstock ponds in the same farm experienced mortalities of 40–50% (Aranguren et al., 2006)

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

A wide range of gross signs can be used to indicate the possible presence of 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 epicomensals 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. (Lightner, 1996; Loy et al., 1996).

2.3.3 Gross pathology

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. Gross signs are not specific, but shrimp with acute infection with *H. penaei* show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance including pale discolouration of the hepatopancreas with further size reduction.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Horizontal transmission of *H. penaei* can be through cannibalism or by contaminated water (Aranguren et al., 2006; 2010; Frelier et al., 1993; Gracia-Valenzuela et al., 2011; Vincent et al., 2004). *Hepatobacter penaei* in faeces shed into pond water has also been suggested as a source of contamination (Aranguren et al., 2006; Briñez et al., 2003; Morales-Covarrubias et al., 2006). *Hepatobacter penaei*-positive broodstock females produce postlarvae that were also *H. penaei*-positive, which suggests that a transmission from broodstock to progeny can occurs (Aranguren et al., 2006).

2.3.5. Environmental factors

The occurrence of infection with *H. penaei* in farms may increase during long periods of high temperatures (>29°C) and high salinity (20–38 ppt) (Morales-Covarrubias, 2010). In the months when temperatures are high during the day and low at night, high prevalence and mortality (>20%) are observed (Morales-Covarrubias, 2010).

2.3.6. Geographical distribution

Hepatobacter penaei appears to have a Western Hemisphere distribution in both wild and cultured penaeid shrimp (Aguirre-Guzman *et al.*, 2010; Del Rio-Rodriguez *et al.*, 2006). In the Western Hemisphere, *H. penaei* is commonly found in cultured penaeid shrimp in the Americas (Aranguren *et al.*, 2010; Frelier *et al.*, 1992; Ibarra-Gomez *et al.*, 2007; Morales-Covarrubias, 2010; Morales-Covarrubias *et al.*, 2011). *Hepatobacter penaei*, was introduced into Africa from North America via movement of infected *P. vannamei* broodstock, however NHP was later eradicated by fallowing (Lightner *et al.*, 2012).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

Early detection (initial phase) of clinical infection with *H. penaei* is important for successful treatment because of the potential for cannibalism to amplify and transmit the disease. Shrimp starvation and cannibalism of infected shrimp, and positive conditions for *H. penaei* enaei multiplication, are important factors for the spread of *H. penaei* in *P. vannamei*. Preventive measures include raking, tilling, and removing sediments from the bottom of the ponds, prolonged drying (through exposure to sunlight) of ponds and water distribution canals for several weeks, disinfection of fishing gear and other farm equipment using calcium hypochlorite, extensive liming of ponds and the use of ponds liners. The use of specific pathogen-free (SPF) broodstock is an effective preventive measure. NHP, particularly in the initial phase, can be treated by using antibiotics in medicated feeds. *Hepatobacter penaei* is sensitive to oxytetracycline (Lightner & Redman, 1994).

2.4.1. Vaccination

No scientifically confirmed reports.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. Breeding resistant strains

One population from Latin America that has been selected for several generations for resistance to Taura syndrome virus in the presence of infection with *H. penaei*, seems to be more resistant to NHP disease than the Kona line under experimental conditions (Aranguren *et al.*, 2010)

2.4.5. Inactivation methods

The use of hydrated lime ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) to treat the bottom of ponds during pond preparation before stocking can help reduce infection with *H. penaei*.

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Disinfection of eggs and larvae is a good management practice and is recommended for its potential to reduce *H. penaei* contamination of spawned eggs and larvae (and contamination by other disease agents).

2.4.7. General husbandry

The prevalence and severity of infection with *H. penaei* may be increased by rearing shrimp in relatively crowded or stressful conditions. Some husbandry practices have been successfully applied to the prevention of infection with *H. penaei*. Among these has been the application of PCR to pre-screening of wild or pond-reared broodstock.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

Suitable specimens for testing for infection with *H. penaei* are the following life stages: postlarvae (PL), juveniles and adults.

3.2. Selection of organs or tissues

Hepatobacter penaei infects most enteric tissue. The principal target tissue for *H. penaei* is the hepatopancreas (Lightner, 2012).

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Hepatobacter penaei does not replicate in the midgut, caeca, connective tissue cells, the gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, and lymphoid organ parenchymal cells. Samples of pleopods or haemolymph are not recommended for *H. penaei* detection by PCR.

3.4. Non-lethal sampling

Faeces may be collected and used for testing (usually by PCR, when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Brinez *et al.*, 2003; Frelier *et al.*, 1993; Lightner, 1996). Faeces samples have not been validated to the same level as hepatopancreas samples.

3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0 *General information (diseases of crustaceans)*

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternate storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples of hepatopancreas or faeces for PCR testing should be preserved in 70–95% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen.

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 5.3 of Chapter 2.2.0.

3.5.4. Samples for other tests

No scientifically confirmed reports.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL or specimens up to 0.5 g can be pooled to obtain the minimum amount of material for *H. penaei* molecular detection.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of

assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts						+	+	NA				
Histopathology						++	++	NA				
Cell culture												
Real-time PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
In-situ hybridisation					+	++	++	NA	+	++	++	NA
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

Wet mount squash examination of hepatopancreas tissue is generally conducted to detect presumptive infection with *H. penaei*. The hepatopancreas may be atrophied and have any of the following characteristics: soft and watery; fluid filled centre; pale colour with or without black stripes (melanised tubules). Hepatopancreatic tubules show deformity at the distal portion; multifocal melanisation initially at the distal portion of the tubule and, later on, in the medial and proximal portion; reduced or absence of lipid droplets (Lightner, 2012).

4.2. Histopathology and cytopathology

Histological methods can be useful for indicating acute and chronic infection with *H. penaei*.

Initial infection with *H. penaei* is difficult to diagnose using routine H&E histological methods. Therefore molecular methods are recommended for initial *H. penaei* detection (e.g. by PCR or application of *H. penaei*-specific DNA probes or *in-situ* hybridisation [ISH] of histological sections).

Acute 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 into the tubular lumen. The tubular epithelial cell lipid content is variable.

The transitional phase of infection with *H. penaei* is characterised by haemocytic inflammation of the intertubular spaces in response to necrosis, cytolysis, and sloughing of hepatopancreas tubule epithelial cells. The hepatopancreas tubule epithelium is markedly atrophied, resulting in the formation of large oedematous (fluid filled or 'watery') areas in the hepatopancreas. Tubule epithelial cells within multifocal encapsulation are typically atrophied and reduced from simple columnar to cuboidal morphology. They contain little or no stored lipid vacuoles, markedly reduced or no secretory vacuoles and masses of bacteria. At this phase haemocyte nodules are observed in the presence of masses of bacteria in the centre of the nodule.

In the chronic phase of 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.

4.3. Cell culture for isolation

Hepatobacter penaei has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist (Vincent & Lotz, 2007).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods including PCR and real-time PCR have been developed that target several *H. penaei* genes including 16S rRNA and Flg E genes (Aranguren & Dhar, 2018; Aranguren *et al.*, 2010; Loy *et al.*, 1996).

DNA extraction

A general DNA extraction method may be used to extract DNA from the hepatopancreatic tissue of putatively infected shrimp. The amount of template DNA in a 10–25 µl PCR reaction volume should be in the range of 10–100 ng of total DNA.

4.4.1. Real-time PCR

Real-time PCR methods for detection of *H. penaei* have the advantages of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real-time PCR is ~100 copies of the target sequence from the *H. penaei* genome (Aranguren & Dhar, 2018; Aranguren *et al.*, 2010; Vincent & Lotz, 2005).

Protocol 1

The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for *H. penaei* based on the 16S rRNA gene generally follows the method used in Aranguren *et al* (2010).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from the 16S, rRNA gene of *H. penaei* (GenBank U65509) (Loy & Frelier, 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,Ntetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *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 DNA, and water in a reaction volume of 25 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iii) 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.
- iv) 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 and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay. A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, purified bacteria, or DNA extracted from *H. penaei*-infected hepatopancreas.

Protocol 2

Another real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for *H. penaei* is based on the flagella gene (flagella hook protein, flgE) (Aranguren & Dhar 2018).

- i) The PCR primers and TaqMan probe were selected from the Flg E gene of *H. penaei* (GenBank JQAJ01000001.1) (Aranguren & Dhar, 2018). The primers and TaqMan probe were designed by the Primer Express software version 3.0 (Applied Biosystems). The upstream (NHP FlgE3qF) and downstream (FlgE3qR) primer sequences are: 5'-AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC-3'; and 5'-CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT-3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5'-CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC-3', is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,Ntetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) *The real-time PCR reaction mixture contains:* The amplification reactions were conducted as follows: 0.5 µM of each primer, 0.1 µM TaqMan probe, 1× TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies), 5–50 ng DNA template and HPLC water in a reaction volume of 10 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iii) The real-time PCR profile consists of 20 seconds at 95°C followed by 40 cycles of 1 second at 95°C and 20 seconds at 60°C. Amplification detection and data analysis for real-time PCR assays are carried out with the StepOnePlus real-time PCR system (Life Technologies).
- iv) 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 and also to rule out reagent contamination with the specific target of the assay. A positive control should also be included, and this can be plasmid DNA containing the target sequence, or DNA extracted from *H. penaei*-infected hepatopancreas.

4.4.2. Conventional PCR

Hepatopancreas may be assayed for *H. penaei* using PCR. Two different PCR methods have been developed for *H. penaei* detection using 16S rRNA gene and Flg E gene separately.

Protocol 1

The PCR based on 16S rRNA is based on Aranguren *et al.* (2010). 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) fragment corresponding to the 16S rRNA of *H. penaei*. The PCR method outlined below generally follows the method described in Aranguren *et al.* (2010).

- i) The following controls should be included when performing the PCR assay a) known *H. penaei* negative tissue sample; b) a known *H. penaei* positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.

- ii) The PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iii) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl⁻¹), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- iv) 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.

Protocol 2

The PCR based on flagella gene (flagella hook protein, flgE) is based on Aranguren & Dhar (2018). Primers designated as NHP FlgE 1143F (5'-AGG CAA ACA AAC CCT TG-3') and the NHP FlgE 1475R (5'- GCG TTG GGA AAG TT-3') amplify a 333-base pair (bp) fragment corresponding to the Flg E of *H. penaei*.

- i) The following controls should be included when performing the PCR assay a) known *H. penaei* negative tissue sample; b) a known *H. penaei* positive sample (hepatopancreas); and c) a 'no template' control.
- ii) The PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Bead (RTG beads, GE Healthcare) is used for all amplification reactions described here.
- iii) The optimised PCR conditions (5–50 ng DNA) (final concentrations in 25 µl total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 µM each), dNTPs (200 µM each), Taq polymerase (0.1 U µl⁻¹), magnesium chloride (1.5 mM) in 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl.
- iv) The cycling parameters are: initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and a final extension at 72°C for 5 minutes followed by 4°C infinite hold.

Note: The conditions should be optimised for each thermal cycler using known positive controls.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

4.5. Amplicon sequencing

PCR products may be cloned and sequenced or sequenced directly when necessary to confirm infection with *H. penaei* or to identify false positives or nonspecific amplification (Aranguren *et al.*, 2010; Aranguren & Dhar, 2018; Vincent & Lotz, 2005).

4.6. In-situ hybridisation

The ISH method of Loy & Frelier (1996) and Lightner (1996) provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for *H. penaei* detection and diagnosis of infection that employ classical histological methods (Lightner, 1996; Morales-Covarrubias, 2010). The ISH assay of routine histological sections of acute, transition and chronic phase lesions in hepatopancreas with a specific DIG-labelled DNA probe to *H. penaei* 16S rRNA provides a definitive diagnosis of infection with *H. penaei* (Lightner, 1996; Loy & Frelier, 1996; Morales-Covarrubias *et al.*, 2006). Pathognomonic *H. penaei* positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the DNA probes. (See Chapter 2.2.4 *Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus* for details of the ISH method, and Chapter 2.2.0 Section B.5.3.ii for detailed information on the use of Davidson's AFA fixative.)

4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) tests using monoclonal antibodies (MAbs) to *H. penaei*, according to the methods described in Bradley-Dunlop *et al.* (2004), are available for *H. penaei* detection.

4.8. Bioassay

Confirmation of infection with *H. penaei* may be accomplished by bioassay of suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the intracellular bacteria (Aranguren *et al.*, 2010; 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 *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 infection with *H. penaei* and unusual mortalities.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Serological tests are 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 *H. penaei*.

4.10. Other methods

No scientifically confirmed reports.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR are the recommended test for surveillance to demonstrate freedom from infection with *H. penaei* in apparently healthy populations as described in Section 4.4.1 and 4.4.2.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁴

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR
- ii) Positive result by conventional PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

⁴ For example transboundary commodities.

- i) Positive result by two different probe-based real-time PCR tests targeting different region of the *H. penaei* genome
- ii) Positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting different region of the *H. penaei* genome and amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2. Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *H. penaei* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with *H. penaei* infection
- ii) Histopathology consistent with *H. penaei* infection
- iii) Positive result by real-time PCR
- iv) Positive result by conventional PCR
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *H. penaei* is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) A positive result by two different probe-based real-time PCR tests targeting different regions of the *H. penaei* genome
- ii) A positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting different regions of the *H. penaei* genome and amplicon sequencing
- iii) Histopathology consistent with *H. penaei* and positive *in-situ* hybridisation test

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *H. penaei* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with *H. penaei*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,
PCR = polymerase chain reaction, ND = Not determined.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,
PCR: = polymerase chain reaction.

7. 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., BRÍNEZ 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. & DHAR ARUN K. (2018). Detection and quantification of *Hepatobacter penaei* bacteria (NHPB) by new PCR and real-time quantitative PCR assays. *Dis. Aquat. Org.*, **131**, 49–57.
- ARANGUREN L.F., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, **307**, 187–192.
- 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*. *Sci. World J.*, **2012**, 979381, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356760/>
- BEKAVAC A., BECK A., DRAGIČEVIĆ P., DRAGUN Z., MAGUIRE I., IVANKOVIĆ D., FIKET Ž., GRAČAN R., HUDINA S. (2022). Disturbance in invasion? Idiopathic necrotizing hepatopancreatitis in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) in Croatia. *J. Fish Dis.*, **45**, 261–276.
- BRADLEY-DUNLOP D.J., PANTOJA C. & LIGHTNER D.V. (2004). Development of monoclonal antibodies for detection of necrotizing hepatopancreatitis in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 233–240.
- BRÍNEZ 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.*, **55**, 69–72.
- 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-RODRIGUEZ 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**, 606–609.
- FRELIER P.F., LOY J.K. & KRUPPENBACH B. (1993). Transmission of necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *J. Invertebr. Pathol.*, **61**, 44–48.
- FRELIER P.F., 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 YEPIZ-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-GAMEZ J.C., GALAVÍZ-SILVA L. & MOLINA-GARZA Z.J. (2007). Distribution of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) in cultured white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Mexico. *Cienc. Mar.*, **33**, 1–9.

KROL R.M., HAWKINS W.E. & OVERSTREET R.M. (1991). Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J. Invertebr. Pathol.*, **57**, 362–370.

LEYVA J.M., MARTINEZ-PORCHAS M., HERNANDEZ-LOPEZ J., VARGAS-ALBORES F. & T. GOLLAS-GALVAN (2018). Identifying the causal agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp: Multilocus sequence analysis approach *Aquaculture Res.*, 1–8.

LIGHTNER D.V. (ed.) (1996). A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 304 p.

LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1994). An epizootic of necrotizing hepatopancreatitis in cultured penaeid shrimp (Crustacea: Decapoda) in northwestern Peru. *Aquaculture*, **122**, 9–18.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., 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.

LOY J.K., DEWHIRST F.E., WEBER W., FRELIER P.F., GARBAR T.L., TASCA S.I & TEMPLETON J.W. (1996). Molecular phylogeny and *in situ* detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3439–3445.

LOY J.K. & FRELIER P.F. (1996). Specific, nonradioactive detection of the NHP bacterium in *Penaeus vannamei* by *in situ* hybridization. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 324–331.

LOY J.K., FRELIER P.F., VARNER P. & TEMPLETON J.W. (1996). Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 117–122.

MORALES-COVARRUBIAS M.S. (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: 978-607-17-0436-8. 1-180.

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., RUIZ-LUNA A., MOURA-LEMUS A.P., SOLÍS MONTIEL V.T. & CONROY G. (2011). Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de latinoamérica. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, **XXI**, 434–446.

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**, 1407–1409.

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.

*
* * *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis)

(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis).

NB: FIRST ADOPTED IN 2012; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPTER 2.2.4.

INFECTION WITH INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV), Family *Parvoviridae*, subfamily *Hamaparvovirinae*, Genus *Penstylhamaparvovirus* with IHHNV (*Decapod penstylhamaparvovirus 1*) as the Type species (Penez *et al.*, 2020).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

IHHNV is the smallest of the known penaeid shrimp viruses. The virion is a 20–22 nm, non-enveloped icosahedron, with a density of 1.40 g ml⁻¹ in CsCl that contains linear single-stranded DNA with an estimated 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 NC_002190).

At least two distinct genotypes of IHHNV have been identified (Tang *et al.*, 2003): Type 1 is from the Americas and East Asia (principally the Philippines) and Type 2 is from South-East Asia. These genotypes are infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon*. Two sequences homologous to part of the IHHNV genome are found embedded in the genome of penaeids. These were initially described as Type 3A from East Africa, India and Australia, and Type 3B from the western Indo-Pacific region including Madagascar, Mauritius and Tanzania (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Tissues containing the IHHNV-homologous sequences (also known as endogenous viral elements; Taengchaiyaphum *et al.*, 2021) in the *P. monodon* genome are not infectious to susceptible host species (Lightner *et al.*, 2009; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

IHHNV is believed to be the most stable virus of the known penaeid shrimp viruses. Infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1987; Lightner *et al.*, 2009).

2.1.3. Survival and stability outside the host

No data.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHHNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code* (*Aquatic Code*) are: yellowleg shrimp (*Penaeus californiensis*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern white shrimp (*P. setiferus*), blue shrimp (*P. stylirostris*), and white leg shrimp (*P. vannamei*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with IHHNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*). Evidence is lacking for this species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is IHHNV,

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: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), western white shrimp (*P. occidentalis*), kuruma prawn (*P. japonicus*), green tiger prawn (*P. semisulcatus*), *Hemigrapsus penicillatus*, Argentine stiletto shrimp (*Artemesia longinaris*), Cuata swimcrab (*Callinectes arcuatus*), Mazatlan sole (*Achirus mazatlanus*), yellowfin mojarra (*Gerres cinereus*), tilapias (*Oreochromis* sp.), Pacific piquitinga (*Lile stolifera*) and blackfin snook (*Centropomus medius*).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

IHHNV has been detected in all life stages (i.e. eggs, larvae, postlarvae, juveniles and adults) of *P. vannamei*. Nauplii produced from infected broodstock have a high prevalence of infection with IHHNV (Motte et al., 2003).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

IHHNV targets gills, haematopoietic nodules and haemocytes, ventral nerve cord and ganglia, antennal gland tubule epithelial cells, lymphoid organ, parenchymal cells, connective tissue cells and ovaries (Chayaburakul, 2005; Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of *P. stylirostris* and *P. vannamei* populations that survive IHHNV infection may carry the virus subclinically and infect their progeny or other populations by vertical and horizontal transmission (Bell & Lightner, 1984; Lightner, 1996; Motte et al., 2003).

2.2.6. Vectors

IHHNV was found in wild crabs (*Hemigrapsus penicillatus*, *Neohelice granulata*), but there were no clinical signs. Adults of *Macrobrachium rosenbergii* are carriers of IHHNV without apparent signs. Although the mussel *Mytilus edulis* is an important reservoir of IHHNV (Wei et al., 2017), its capacity to transmit virus is unknown.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

The effects of infection with IHHNV varies among shrimp species and populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with IHHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon*, infection with IHHNV results in a more subtle, chronic disease, runt-deformity syndrome (RDS), in which high mortalities are unusual, but where growth suppression and cuticular deformities are common (Kalagayan et al., 1991; Sellars et al., 2019).

Infection with IHHNV interferes with normal egg, larval, and postlarval development. When broodstock are used from wild or farmed stocks where the disease is enzootic, hatching success of eggs may be reduced, and survival and culture performance of the larval and postlarval stages lowered (Motte et al., 2003).

In the past, stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults showed persistently high mortality rates due to infection with IHHNV. However, selected lines of *P. stylirostris* do not show mortality and appear to be tolerant to this virus. *Penaeus vannamei* and *P. monodon* stocks infected with IHHNV show poor and highly disparate growth and cuticular deformities, particularly bent rostrums and deformed sixth abdominal segments (Jagadeesan et al., 2019; Sellars et al., 2019).

In regions where the virus is enzootic in wild stocks, the prevalence of IHHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja et al., 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias et al., 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan et al., 2001); from 51 to 63% in *P. vannamei* collected from the Pacific coasts of Ecuador, Colombia and Panama (Motte et al., 2003), and from 6 to 63% in *P. vannamei*

broodstock and 49.5% in post-larvae from Mexico (Fernando *et al.*, 2016). In farms where IHHNV is present, its prevalence can range from very low to 100%, but high prevalence is typical (Aly *et al.*, 2021; Chayaburakul *et al.*, 2004; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

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 indicative of infection with IHHNV (see Section 2.3.3 *Gross pathology: Infection with IHHNV in Penaeus vannamei*). However, this clinical sign is not always apparent in shrimp populations chronically infected with IHHNV.

In acute disease, *P. stylirostris* may present behavioural changes (see Section 2.3.3 *Gross pathology: Infection with IHHNV in Penaeus stylirostris*) but with RDS, no consistent behavioural changes have been reported for affected shrimp.

2.3.3. Gross pathology

Infection with IHHNV in Penaeus stylirostris

Infection with IHHNV may result in acute disease with very high mortalities in juveniles. Vertically infected larvae and early postlarvae do not become diseased, but in approximately 35-day-old or older juveniles, gross signs of the disease may be observed, followed by mass mortalities. In horizontally infected juveniles, the incubation period and severity of the disease is somewhat size- or age-dependent, with young juveniles always being the most severely affected. Infected adults seldom show signs of the disease or mortalities (Bell & Lightner, 1984; 1987; Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983). Gross signs are non-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 infected 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* and individuals become more bluish. In *P. stylirostris* and *P. monodon* with terminal-phase infection with IHHNV, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Lightner *et al.*, 1983).

Infection with IHHNV in Penaeus vannamei

RDS, a chronic form of infection with IHHNV, occurs in *P. vannamei*. 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 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 populations of juvenile *P. vannamei* and *P. stylirostris* free from infection with IHHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Lightner, 1996; Primavera & Quinitio, 2000).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission of IHHNV can be by horizontal or vertical. Horizontal transmission has been demonstrated by cannibalism or by contaminated water (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 1983), and vertical transmission via infected eggs (Motte *et al.*, 2003).

2.3.5. Environmental factors

The replication rate of IHHNV at high water temperatures was significantly reduced in a study in which viral replication was compared in *P. vannamei* experimentally infected and held at 24°C and 32°C. After a suitable incubation period, shrimp held at 32°C had approximately 10² times lower viral load than shrimp held at 24°C (Montgomery-Brock *et al.*, 2007).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with IHHNV has been reported from cultured shrimp in most of the major shrimp-culturing regions of the world including Asia, Oceania, North and South America and the Middle East.

IHHNV homologous sequences have been found within the genome of *P. monodon* from East Africa, Australia, and the western Indo-Pacific region (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). These sequences do not represent viral DNA (refer Section 2.1.1 *Aetiological agent*).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

None available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports.

2.4.4. Breeding resistant strains

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 (Lightner, 1996). However, lines of *P. stylirostris* bred for resistance to infection with IHHNV (Tang *et al.*, 2000) do not have increased resistance to other diseases, such as white spot syndrome virus (WSSV), so their use has been limited. In some stocks a genetic basis for IHHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

2.4.5. Inactivation methods

IHHNV is a stable shrimp virus; infected tissues remain infectious after repeated cycles of freeze–thawing and after storage in 50% glycerine (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 2009).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

IHHNV is transmitted vertically by the transovarian route (Motte *et al.*, 2003). Disinfection of eggs and larvae is good management practice (Chen *et al.*, 1992) that may reduce IHHNV contamination of spawned eggs and larvae but is not effective for preventing transovarian transmission of IHHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.7. General husbandry

Some husbandry practices have been successful in preventing the spread of IHHNV. Among these has been the application of PCR pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Motte *et al.*, 2003), as well as the development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 2005). The latter has proven to be the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with IHHNV (Lightner, 2005).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples that are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Infection with IHHNV may be below detection limits in spawned eggs and larval stages, so these life stages are not suitable for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHHNV.

3.2. Selection of organs or 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, 1996; Lightner & Redman, 1998). Hence, whole shrimp (e.g. larvae or postlarvae) or tissue samples containing the aforementioned target tissues are suitable for most tests using molecular methods.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut or its caeca) are inappropriate samples for detection of IHHNV (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998). Shrimp eyes contain PCR inhibitors and their use should be avoided.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used for testing when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Lightner, 1996; Lightner & Redman, 1998).

3.5. 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.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section B.2.2 of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

3.5.4. Samples for other tests

Not relevant.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger shrimp should be processed and tested individually. Small life stages such as PL can be pooled to obtain the minimum amount of material for virus isolation or molecular detection.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

- +++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology						++	++	NA		++	++	NA
Cell culture												
Real-time PCR	++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	+	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						+	+	1		++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction;

LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

No reliable methods have been developed for direct microscopic pathology.

4.2. Histopathology and cytopathology

Presumptive acute infections in *P. stylirostris* can be readily diagnosed using routine haematoxylin and eosin (H&E) stained sections whereas chronic infection are much more difficult to diagnose using these staining methods. For diagnosis of chronic infections and confirmation of acute infections however, the use of molecular methods is required for IHHNV detection (e.g. by PCR or application of IHHNV-specific DNA probes to dot-blot hybridisation tests or *in-situ* hybridisation [ISH] of histological sections).

Histological demonstration of prominent intranuclear, Cowdry type A inclusion bodies provides a provisional diagnosis of infection with IHHNV. 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, 1996), intranuclear inclusion bodies within chromatin-margined, 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 4.6 *In-situ hybridisation*) of such sections with a DNA probe specific to IHHNV provides a definitive diagnosis of infection with IHHNV (Lightner, 1996a; 2011; Lightner & Redman, 1998a).

The use of Davidson's fixative (containing 33% ethyl alcohol [95%], 22% formalin [approximately 37% formaldehyde], 11.5% glacial acetic acid and 33.5% distilled or tap water) is highly recommended for all routine histological studies of shrimp (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 1996a). To obtain the best results, dead shrimp should not be used. Only live, moribund, or compromised shrimp should be selected for fixation and histological examination. Selected shrimp are killed by injection of fixative directly into the hepatopancreas; the cuticle over the cephalothorax and abdomen just lateral to the dorsal midline is opened with fine-pointed surgical scissors to enhance fixative penetration (the abdomen may be removed and discarded), the whole shrimp (or cephalothorax) is immersed in fixative for 24 to 48 hours, and then transferred to 70% ethyl alcohol for storage. After transfer to 70% ethyl alcohol, fixed specimens may be transported by wrapping in cloth or a paper towel saturated with 70% ethyl alcohol and packed in leak-proof plastic bags.

4.3. Cell culture for isolation

IHHNV has not been grown *in vitro*. No crustacean cell lines exist.

4.4. Nucleic acid amplification

There are multiple geographical variants of IHHNV, some of which are not detected by all of the available methods. Two primer sets, 392F/R and 389F/R, are the most suitable for detecting all the known genetic variants of IHHNV (Tang *et al.*, 2000; 2007). However, these tests also detect non-infectious endogenous viral elements (EVE) within the *P. monodon* genome (previously known as types 3A and 3B), which are inserted into the genome of certain stocks of *P. monodon* from the western Indo-Pacific, East Africa, Australia and India (Saksmerprome *et al.*, 2011; Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). As these PCR methods may result in positive test results in uninfected *P. monodon*, positive results should be confirmed by a method that detects IHHNV but not the IHHNV-related EVEs.

PCR primers have been developed that can detect the IHHNV sequence but do not amplify IHHNV-related EVEs 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 IHHNV), but not the non-infectious EVEs within the *P. monodon* genome (Tang & Lightner, 2006; Tang *et al.*, 2007). Primer set MG831F/R reacts only with non-infectious EVEs within the *P. monodon* genome (Tang *et al.*, 2007). Hence, confirmation of unexpected positive or negative PCR results for IHHNV with a second primer set, or use of another diagnostic method (i.e. histology, bioassay, ISH) is highly recommended.

4.4.1. Real-time PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Real-time PCR methods have been developed for the detection of IHHNV (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). A highly sensitive SYBR Green real-time PCR targeting a segment of the IHHNV genome that is less susceptible to endogenisation was developed (Encinas-Garcia *et al.*, 2015). More recently, a TaqMan real-time assay capable of differentiating endogenous virus element from infectious form of IHHNV in *P. monodon* has been reported (Cowley *et al.*, 2018). The real-time PCR method using TaqMan chemistry described below for IHHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The upstream (IHHNV1608F) and downstream (IHHNV1688R) 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', is synthesised and labelled with FAM on the 5' end and TAMRA on the 3' end.
- ii) Preparation of DNA template: DNA extracted from tissues or haemolymph that was 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. Commercial 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.
- iii) The real-time PCR reaction mixture contains: TaqMan Fast virus 1-step Master Mix (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 20 µl. For optimal results, the reaction mixture should be vortexed and mixed well.
- iv) The cycling profile is: initial denaturation of 20 seconds at 95°C, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 1 second and annealing/extension at 60°C for 20 seconds.

4.4.2. Conventional PCR

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Several one-step PCR methods (Krabssetsve *et al.*, 2004; Nunan *et al.*, 2000; Shike *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2000; 2007), and a number of commercial PCR kits are available for IHHNV detection. Nested methods are also available.

Table 4.4.2.1. Recommended primer sets for one-step PCR detection of IHHNV

Primer	Product	Sequence (5'-3')	G+C%/Temp.	GenBank & References	Specificity
389F	389 bp	CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA	50%/72°C	AF218266	All genetic variants of IHHNV
389R		GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	and IHHNV-related EVEs
77012F	356 bp	ATC-GGT-GCA-CTA-CTC-GGA	50%/68°C	AF218266	Not given in the reference
77353R		TCG-TAC-TGG-CTG-TTC-ATC	55%/63°C	(Nunan <i>et al.</i> , 2000)	
392F	392 bp	GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA	50%/68°C	AF218266	All genetic variants of IHHNV and IHHNV-related EVEs
392R		ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG	50%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2000)	
309F	309 bp	TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A	36%/68°C	AF218266	IHHNV <u>but not</u> IHHNV-related EVEs
309R		TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A	40%/69°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	
MG831F	831 bp	TTG-GGG-ATG-CAG-CAA-TAT-CT	45%/58°C	DQ228358	IHHNV-related EVEs <u>but not</u> IHHNV
MG831R		GTC-CAT-CCA-CTG-ATC-GGA-CT	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 of the IHHNV genome. Primers 77012F/77353R are from a region in between the nonstructural and 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). However, recent minor modifications including the sources of the reagents and the use of an automated DNA extraction instrument are acceptable. The modifications include DNA extraction method, choice of primers (Table 4.4.2.1), and the volume of reaction. These slightly modified methods have been validated in accordance with Chapter 1.1.2 *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases* and do not affect the diagnostic performance of the assay.

- i) Use as a template, the extraction of DNA templates is the same as that described above. Use 1–5 µl of extracted DNA as a template per 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 10 µM in distilled water.
- iv) 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 followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and final extension at 72°C for 5 minutes.
- v) Prepare a 'Master Mix' consisting of water and primers.
- vi) For a 25 µl reaction mix, add 24 µl Master Mix to each tube and then add 1 µl of the DNA template to be tested.
- vii) Vortex each tube, spin quickly to bring down all liquid. Insert tubes into the thermal cycler and start the PCR program.
- viii) After PCR, run 6–10 µl of the sample in a 1.5% agarose gel (containing SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent to stain the DNA). Look for the 389 bp band (if using primers 389F and 389R) or for the 356 bp band (if using primers 77012F and 77353R). Bands are not always seen, as it is necessary to have at least 10 ng DNA µl⁻¹ to see DNA in a gel. A 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.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays and real-time isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) assay are available to detect and confirm IHHNV infection (Arunrut *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2015), however, they are currently not recommended as they are not sufficiently validated.

4.5. Amplicon sequencing

PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHHNV, 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 non-infectious IHHNV-related EVEs in the host genome (Tang & Lightner, 2006).

4.6. *In-situ* hybridisation

Direct detection methods using DNA probes specific for IHHNV are available in dot-blot and ISH formats. The ISH method uses a DIG-labelled DNA probe for IHHNV and generally follows the methods outlined in Mari *et al.* (1993) and Lightner (1996).

Gene probe and PCR methods provide greater diagnostic specificity and sensitivity than traditional techniques 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 dot-blot hybridisation test.

4.7. Immunohistochemistry

Not relevant.

4.8. Bioassay

If SPF shrimp are available, the following bioassay method is based on Tang *et al.* (2000), is suitable for IHHNV diagnosis.

- i) For bioassay, feed the minced shrimp tissue suspected of being infected with IHHNV to the indicator shrimp species (e.g. SPF *P. vannamei* and *P. stylirostris* at the PLs or juvenile stage) at 10% of their body weight twice daily for 1 days.
- ii) For the following, the indicator shrimp were maintained on a pelletised ration.
- iii) Examine moribund shrimp grossly or by using the methods described above. There may be no apparent mortality during the experimental period.
- iv) If at 30 days after feeding there are still no moribund shrimp and all test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

Known IHHNV positive and negative control groups should be included in the bioassay.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

None has been successfully developed.

4.10. Other methods

Not available.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Conventional PCR and/or real-time PCR are the recommended test for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHHNV in apparently healthy populations as described in Sections 4.4.1 and 4.4.2.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁵

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by conventional PCR
- ii) Positive result by real-time PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting non-overlapping regions of the viral genome and amplicon sequencing
- ii) Histopathology consistent with IHHNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by real-time PCR
- iii) Histopathology consistent with IHHNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by conventional PCR and amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with IHHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with the disease as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Positive result by conventional PCR
- iii) Positive result by real-time PCR
- iv) Histopathology consistent with IHHNV infection
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with IHHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and conventional PCR targeting a non-overlapping region of the genome and amplicon sequencing
- ii) Histopathological changes characteristic of infection with IHHNV with a positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by real-time PCR

⁵ For example transboundary commodities.

- iii) Histopathological changes characteristic of infection with IHHNV or positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHHNV by conventional PCR and amplicon sequencing

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IHHNV is provided in Table 6.3.1. This information can be used for the design of surveys for infection with IHHNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

- DSe = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,
PCR: = polymerase chain reaction.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

- DSe = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,
PCR: = polymerase chain reaction.

7. References

- ALY S.M., MANSOUR S.M., THABET R.Y. & MABROK M. (2021). Studies on infectious myonecrosis virus (IMNV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Dis. Aquat. Org.*, **143**, 57–67.
- ARUNRUT N., PROMBUN P., SAKSMERPROME V., FLEGEL T. W. & KIATPATHOMCHAI W. (2011). Rapid and sensitive detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J. Virol. Methods*, **171**, 21–25.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1984). IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHHN disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHHN virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.
- CHAYABURAKUL K., LIGHTNER D.V., SRIURAIRATTANA S., NELSON K.T. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2005). Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 191–200.

CHAYABURAKUL K., NASH G., PRATANIPAT P., SRIURARAIRATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.

CHEN S.N., CHANG P.S. & Kou G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Folks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.

COWLEY J.A., RAO M., COMAN G.J. & COWLEY J. (2018). Real-time PCR tests to specifically detect Infectious hypodermal and haemopoietic necrosis virus (IHHNV) lineages and an IHHNV endogenous viral element (EVE) integrated in the genome of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Dis. Aquat. Org.*, **129**, 145–158.

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.

ENCINAS-GARCIA T., MENDOZA-CANO F., ENRÍQUEZ-ESPINOZA T., LUKEN-VEGA L., VICHIDO-CHÁVEZ R. & SÁNCHEZ-PAZ A. (2015). An improved validated SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for the detection of the *Penaeus stylostris* densovirus in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **212**, 53–58.

FERNANDO M.C., ENRIQUEZ-ESPINOZA T., VALENZUELA-CASTILLO A., ENCINAS-GARCIA T. & SÁNCHEZ-PAZ A. (2016). High Occurrence of the Decapod Penstyldensovirus (PstDV1) Detected in Postlarvae of *Penaeus vannamei* Produced in Commercial Hatcheries of Mexico. *EcoHealth*, **13**, 591–596.

JAGADEESAN V., EZHIL PRAVEENA P., OTTA S.K. & JITHENDRAN K.P. (2019). Classical runt deformity syndrome cases in farmed *Penaeus vannamei* along the east coast of India. In: BRAQCON 2019: World Brackishwater Aquaculture Conference, Jithendran K.P., Saraswathy R., Balasubramanian C.P., Kumaraguru Vasagam K.P., Jayasankar V., Raghavan R., Alavandi S.V. & Vijayan K.K., eds. Journal of Coastal Research, Special Issue No. 86, pp. 107–111. Coconut Creek (Florida), ISSN 0749-0208.

KALAGAYAN G., GODIN D., KANNA R., HAGINO G., SWEENEY J., WYBAN J. & BROCK J. (1991). IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.*, **22**, 235–243.

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. (ED.) (1996). 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. (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., MOHNEY L.L., WILLIAMS R.R. & REDMAN R.M. (1987). Glycerol tolerance of IHHN virus of penaeid shrimp. *J. World Aquac. Soc.*, **18**, 196–197.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. In: Shellfish Safety and Quality, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, 384–424.

LIGHTNER D.V. & REDMAN R.M. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.

LIGHTNER D.V., REDMAN R.M. & BELL T.A. (1983). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.*, **42**, 62–70.

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.

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., 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 stylostris* 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 Aquacult. Soc.*, **32**, 330–334.

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.

PENZES J.J., SODERLUND-VENERMO M., CANUTI M., EIS-HUBINGER A.M., HUGHES J., COTMORE S.F. & HARRACH B. (2020). Reorganizing the family *Parvoviridae*: a revised taxonomy independent of the canonical approach based on host association. *Arch. Virol.*, **165**, 2133–2146. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04632-4>

PRIMAVERA, J.H. & QUINTIO E.T. (2000). Runt-deformity syndrome in cultured giant tiger prawn *Penaeus monodon*. *J. Crust. Biol.*, **20**, 796–802.

SAKSMERPROME V., JITRAKORN S., CHAYABURAKUL K., LAIPHROM S., BOONSUA K. & FLEGEL T.W. (2011). Additional random, single to multiple genome fragments of *Penaeus stylostris* densovirus in the giant tiger shrimp genome have implications for viral disease diagnosis. *Virus Res.*, **160**, 180–190.

SELLARS M.J., COWLEY J.A., MUSSON D., RAO M., MENZIES M.L., COMAN G. J. & MURPHY B.S. (2019). Reduced growth performance of Black Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Aquaculture*, **499**, 160–166.

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 Brevidensovirus. *Virology*, **277**, 167–177.

SUN Z.F., HU C. Q., REN C. H. & SHEN Q. (2006). Sensitive and rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimps by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **131**, 41–46.

TAENGCHAIYAPHUM S., BUATHONGKAM P., SUKTHAWORN S., WONGKHALUANG P., SRITUNYALUCKSANA K. & FLEGEL T.W. (2021). Shrimp Parvovirus Circular DNA Fragments Arise From Both Endogenous Viral Elements and the Infecting Virus. *Front. Immunol.*, **12**, 729528. doi: 10.3389/fimmu.2021.729528.

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 stylostris* 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. (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. (2003). Geographic variations among infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) isolates and characteristics of their infection. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 91–99.

WEI Y.W., FAN D.D. & CHEN J. (2017). The mussel *Mytilus edulis* L. as an important reservoir of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *Aquaculture Res.*, **48**, 1346–1350.

XIA X.X., YU Y.X., HU L.H., MANFRED W. & PAN Y.J. (2015). Rapid detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) by real-time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Arch. Virol.*, **160**, 987–994.

*
* *

NB: There are OIE Reference Laboratories for infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS INFECTIOUS HYPODERMAL AND HAEMATOPOIETIC NECROSIS;
MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPTER 2.3.1.

INFECTION WITH APHANOMYCES INVADANS (EPIZOOTIC ULCERATIVE SYNDROME)

1. Scope

Infection with *Aphanomyces invadans* means all infections caused by the oomycete fungus *A. invadans* of the Genus *Aphanomyces* and Family *Leptolegniaceae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Infection with *A. invadans* is most commonly known as epizootic ulcerative syndrome (EUS) (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 1986). It has also been known as red spot disease (RSD) (McKenzie & Hall, 1976), mycotic granulomatosis (MG) (Egusa & Masuda, 1971; Hanjavanit, 1997) and ulcerative mycosis (UM) (Noga & Dykstra, 1986). The disease is caused by the oomycete *Aphanomyces invadans*.

Infection with *Aphanomyces invadans* is a seasonal epizootic condition of great importance in wild and farmed freshwater and estuarine fish. It is clinically characterised by the presence of invasive, non-septate hyphae in skeletal muscle, usually leading to a granulomatous response. Infections with *A. invadans* have spread widely since the first outbreak in 1971 in Japan and to date a high degree of genetic homogeneity is observed for this species based on publicly available genome sequences (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2009; European Food Safety Authority [EFSA] 2011a; Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018; Lilley *et al.*, 2003). Other pathogenic viruses (mostly rhabdoviruses), bacteria (mainly *Aeromonas hydrophila*), fungi, oomycetes and parasites are routinely co-isolated from *A. invadans*-infected fish (Iberahim *et al.*, 2018).

Aphanomyces invadans is within a group of organisms commonly known as the water moulds. Although long-regarded as fungi because of their characteristic filamentous growth, this group, the Oomycota, is not considered a member of the Eumycota (true fungi) but is classified with diatoms and brown algae in a group called the Heterokonta or Stramenopiles within the Kingdom Chromista (Cavalier-Smith & Chao 2006; Tsui *et al.*, 2009). Junior synonyms of *A. invadans* include *Aphanomyces piscicida* and *Aphanomyces invaderis*.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

There is limited published data on the stability of the pathogen in host tissues. It is not clear whether the pathogen continues to grow for some time following the death of the host (Oidtmann, 2012).

Aphanomyces invadans cultures can be maintained for extended periods in glucose phosphate broth (6 weeks at 10°C), agar slopes and sodium phosphate buffer (over 6 months at 20°C) (Lilley *et al.*, 1998).

2.1.3. Survival and stability outside the host

How *A. invadans* survives outside the host is unclear (Oidtmann, 2012). It is assumed that the motile zoospores, which are released from an infected fish, will encyst when unsuccessful in finding a suitable substrate to grow on (Oidtmann, 2012). Encysted zoospores of *A. invadans* are capable of releasing a new zoospore generation instead of germinating in a process called repeated zoospore emergence (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 2009). There is no suitable method to recover or isolate the encysted zoospore from affected fish ponds (Afzali *et al.*, 2013). How long the encysted spore can survive in water or on a non-fish substrate is unclear. In an *in-vitro* experiment, the encysted zoospore survived for at least 19 days (Lilley *et al.*, 2001).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Table 2.1. Fish species susceptible to infection with Aphanomyces invadans

Family	Scientific name	Common Name
Alestidae	<i>Brycinus lateralis</i>	striped robber
	<i>Hydrocynus vittatus</i>	tigerfish
	<i>Micralestes acutidens</i>	silver robber
Ambassidae	<i>Ambassis agassizii</i>	chanda perch
Apogonidae	<i>Glossamia aprion</i>	mouth almighty
Ariidae	<i>Arius sp.</i>	fork-tailed catfish
Belonidae	<i>Strongylura kreffti</i>	long tom
Centrarchidae	<i>Lepomis macrochirus</i>	bluegill
	<i>Micropterus salmoides</i>	largemouth black bass
Channidae	<i>Channa marulius</i>	great snakehead fish
	<i>Channa striatus</i>	striped snakehead
Cichlidae	<i>Coptodon rendalli</i>	redbreast tilapia
	<i>Oreochromis andersoni</i>	three-spotted tilapia
	<i>Oreochromis macrolepis</i>	greenhead tilapia
	<i>Sargochromis carlottae</i>	rainbow bream
	<i>Sargochromis codringtonii</i>	green bream
	<i>Sargochromis giardi</i>	pink bream
	<i>Serranochromis angusticeps</i>	thinface largemouth
	<i>Serranochromis robustus</i>	Nembwe
	<i>Tilapia sparrmanii</i>	banded tilapia
Clariidae	<i>Clarias gariepinus</i>	sharptooth African catfish
	<i>Clarias ngamensis</i>	blunt-toothed African catfish
	<i>Clarius batrachus</i>	walking catfish
Clupeidae	<i>Alosa sapidissima</i>	American shad
	<i>Brevoortia tyrannus</i>	Atlantic menhaden
	<i>Nematalosa erebi</i>	bony bream
Cyprinidae	<i>Barbus paludinosus</i>	straightfin barb
	<i>Barbus poecilii</i>	dashtail barb
	<i>Barbus thamalakanensis</i>	Thamalakane barb
	<i>Barbus unitaeniatus</i>	longbeard barb
	<i>Carassius auratus</i>	goldfish
	<i>Catla catla</i>	catla
	<i>Cirrhinus mrigala</i>	mrigal
	<i>Esomus sp.</i>	flying barb
	<i>Labeo cylindricus</i>	red-eye labeo
	<i>Labeo lunatus</i>	upper Zambezi labeo
	<i>Labeo rohita</i>	rohu
	<i>Puntius gonionotus</i>	silver barb
	<i>Puntius sophore</i>	pool barb
Eleotridae	<i>Rohtee sp.</i>	keti-Bangladeshi
	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	sleepy cod
	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	marble goby

Family	Scientific name	Common Name
Gobiidae	<i>Glossogobius giuris</i>	bar-eyed goby
	<i>Glossogobius sp.</i>	goby
	<i>Tridentiger obscurus obscurus</i>	dusky tripletooth goby
Helostomatidae	<i>Helostoma temmincki</i>	kissing gourami
Hepsetidae	<i>Hepsetus odoe</i>	African pike
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	black bullhead
	<i>Ameiurus nebulosus</i>	black bullhead
	<i>Amniataba percoides</i>	striped grunter
	<i>Ictalurus punctatus</i>	channel catfish
Kurtidae	<i>Kurtus gulliveri</i>	nursery fish
Latidae	<i>Lates calcarifer</i>	barramundi or sea bass
Lutjanidae	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	mangrove jack
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia splendida</i>	rainbow fish
Mormyridae	<i>Marcusenius macrolepidotus</i>	bulldog
	<i>Petrocephalus catostoma</i>	churchill
Mugilidae	<i>Mugilidae (Mugil spp.; Liza spp.)</i>	mullets
	<i>Mugil cephalus</i>	grey mullet or striped mullet
	<i>Mugil curema</i>	white mullet
	<i>Myxus petardi</i>	mullet
Osmeroidei	<i>Plecoglossus altivelis</i>	ayu
Osphronemidae	<i>Colisa lalia</i>	dwarf gourami
	<i>Osphronemus goramy</i>	giant gourami
	<i>Trichogaster pectoralis</i>	snakeskin gourami
	<i>Trichogaster trichopterus</i>	three-spot gourami
Osteoglossidae	<i>Scleropages jardini</i>	saratoga
Percichthyidae	<i>Maccullochella ikei</i>	freshwater cod
	<i>Maccullochella peelii</i>	Murray cod
	<i>Macquaria ambigua</i>	golden perch
	<i>Macquaria novemaculeata</i>	Australian bass
Platycephalidae	<i>Platycephalus fuscus</i>	dusky flathead
Psettodidae	<i>Psettodes sp.</i>	spiny turbot
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	rainbow trout
Scatophagidae	<i>Scatophagus argus</i>	spotted scat
	<i>Selenotoca multifasciata</i>	striped scat
Schilbeidae	<i>Schilbe intermedius</i>	silver catfish
	<i>Schilbe mystus</i>	African butter catfish
Sciaenidae	<i>Bairdiella chrysoura</i>	drums or croakers
	<i>Pogonias cromis</i>	black drum
Sillaginæ	<i>Sillago ciliata</i>	sand whiting
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	wells catfish
Soleidae	<i>Aseraggodes macleayanus</i>	narrow banded sole
Sparidae	<i>Acanthopagrus australis</i>	yellowfin sea bream
	<i>Acanthopagrus berda</i>	black bream
	<i>Archosargus probatocephalus</i>	sheepshead
Synbranchidae	<i>Fluta alba</i>	swamp eel
Terapontidae	<i>Anabas testudineus</i>	climbing perch
	<i>Bidyanus bidyanus</i>	silver perch
	<i>Leiopotherapon unicolor</i>	spangled perch
	<i>Scortum barcoo</i>	Barcoo Grunter

Family	Scientific name	Common Name
	<i>Therapon sp.</i>	therapon
Toxotidae	<i>Toxotes chatareus</i>	common archer fish
	<i>Toxotes lorentzi</i>	primitive archer fish

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility [under study]

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *A. invadans* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: [under study]

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Subadult and adult fish are usually described as the susceptible life stages to natural outbreaks of EUS (FAO, 2009). However, there are reports of infection with *A. invadans* being found in early life stages (fish fry or fish larvae) (Baldock *et al.*, 2005; EFSA 2011a). While the size of the fish does not determine an EUS outbreak (Cruz-Lacierda & Shariff, 1995), younger fish seem to be more prone to EUS compared with adult fish (Gomo *et al.*, 2016; Pagrut *et al.*, 2017).

An experimental injection of *A. invadans* into the yearling life stage of Indian major carp, catla, rohu and mrigal, revealed resistance to *A. invadans* (Pradhan *et al.*, 2007), even though they are naturally susceptible species. Experimental infections demonstrated that goldfish are susceptible (Hatai *et al.*, 1977; 1994), but common carp (Wada *et al.*, 1996), Nile tilapia (Khan *et al.*, 1998) and European eel, (Oidtmann *et al.*, 2008) are considered resistant.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

During the course of an infection with *A. invadans*, the free-swimming zoospore attaches to the skin of a fish host, encysts and germinates to develop hyphae invading and ramifying through host tissues (Kiryu *et al.*, 2003; Lilley *et al.*, 1998). The hyphal invasion and associated pathology are not confined to the region of dermal ulcers. The hyphae readily invade the body cavity and produce mycotic granulomas in all the visceral organs (Vishwanath *et al.*, 1998). In fish either suspected or confirmed to be infected with *Aphanomyces invadans*, hyphae have also been observed in kidney, liver, spleen, pancreatic tissue, gut, parietal peritoneum, swim bladder, gonads, spinal cord, meninges, vertebrae, inter-muscular bones, the mouth region, and the orbits (Chinabut & Roberts, 1999; Vishwanath *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1996).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

There is no information to indicate that fish can be lifelong carriers of *A. invadans*. Generally, most infected fish die during an outbreak. Although some fish with mild or moderate infections could recover, they are unlikely to be lifelong carriers of *A. invadans*.

2.2.6. Vectors

No data available.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

The prevalence of infection with *A. invadans* in the wild and in aquaculture farms may be high (20–90%), in endemic areas with high levels of mortality observed. Mortality patterns appear to be seasonal and can vary substantially (Herbert *et al.*, 2019).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Fish usually develop red spots or small-to-large ulcerative lesions on the body. The occurrence of skin lesions and ultimately mortality varies according to fish species. Fish presenting with lesions are usually weak, appear darker in colour, have a reduced appetite, are immobile and may float at the surface of the water. Generally infected fish are encountered in shallow water and present a retarded ability to escape capture occasionally followed by short lived bouts of hyperactivity characterised by jerky movements (Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018).

2.3.3 Gross pathology

Early-stage lesions or mildly infected fish are characterised by red spots observed on the lateral body surface, head, operculum or caudal peduncle of the infected fish. Scales of infected fish are often protruding or lost. In severe cases, swollen haemorrhagic areas, massive inflammation and large deep ulcers exposing the underlying necrotic muscle tissue are observed (Huchzermeyer *et al.*, 2018; Iberahim *et al.*, 2018). In advanced stages of the disease, the severity of the disease results in death of the fish (Hawke *et al.*, 2003; Iberahim *et al.*, 2018)

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Aphanomyces invadans has an aseptate fungal-like mycelia structure. This oomycete has two typical zoospore forms. The primary zoospore consists of round cells that develop inside the sporangium. The primary zoospore is released to the tip of the sporangium where it forms a spore cluster. It quickly transforms into the secondary zoospore, which is a reniform, laterally biflagellate cell and can swim freely in the water. The secondary zoospore remains motile for a period that depends on the environmental conditions and presence of the fish host or substratum. Typically, the zoospore encysts and germinates to produce new hyphae, although further tertiary generations of zoospores may be released from cysts (repeated zoospore emergence or polyplanatism) (Lilley *et al.*, 1998). The *A. invadans* zoospores can be horizontally transmitted from one fish to another through the water supply. It is believed that only the secondary zoospores or free-swimming stage zoospores are capable of attaching to the damaged skin of fish and germinating into hyphae. If the secondary zoospores cannot find the susceptible species or encounter unfavourable conditions, they can encyst in the pond environment. The cysts may wait for conditions that favour their transformation into tertiary generations of zoospores that are also in the free-swimming stage. The encysting property of *A. invadans* may play an important role in the cycle of outbreaks in endemic areas.

2.3.5. Environmental factors

Under natural conditions, infection with *A. invadans* has been reported at water temperatures in the range 10–33°C (Bondad-Reantaso *et al.* 1992; Hawke *et al.* 2003) often associated with massive rainfall (Bondad-Reantaso *et al.*, 1992). These conditions favour sporulation of *A. invadans* (Lumanlan-Mayo *et al.*, 1997), and temperatures of 17–19°C have been shown to delay the inflammatory response of fish to oomycete infection (Catap & Munday, 1998, Chinabut *et al.*, 1995). In some countries, outbreaks occur in wild fish first and then spread to fish ponds. Normally, a bath infection of *A. invadans* in healthy susceptible fish species does not result in clinical signs of disease. The presence of other pathogens (viruses, bacteria or ectoparasites, skin damage, water temperature (between 18 and 22 °C), low pH (6.0–7.0) and low oxygen concentration in the water have all been hypothesised as predisposing factors for infection or factors influencing the expression of the disease (Oidtmann, 2012; Iberahim *et al.*, 2018).

Movements of live ornamental fish from countries from which infection with *A. invadans* is confirmed may spread the disease as was the case with the outbreak in Sri Lanka (Balasuriya, 1994). Flooding also caused the spread of infection with *A. invadans* in Bangladesh and Pakistan (Lilley *et al.*, 1998). Once an outbreak occurs in rivers/canals, the disease can spread downstream as well as upstream where the susceptible fish species exist.

Aphanomyces invadans grows best at 20–30°C; it does not grow *in-vitro* at 37°C. Water salinity over 2 parts per thousand (ppt) can stop spread of the agent. Under laboratory conditions the optimal growth temperature range for *A. invadans* is 19–22°C, while under natural conditions *A. invadans* seems to be more robust (Hawke *et al.*, 2003)

2.3.6. Geographical distribution

Infection with *A. invadans* was first reported in farmed freshwater ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Asia in 1971 (Egusa & Masuda, 1971). It was later reported in estuarine fish, particularly grey mullet (*Mugil cephalus*) in eastern Australia in 1972 (Fraser *et al.*, 1992; McKenzie & Hall, 1976). Infection with *A. invadans* has extended its range into South-East and South Asia, and into West Asia (Lilley *et al.*, 1998; Tonguthai, 1985). Outbreaks of ulcerative disease in menhaden (*Brevoortia tyrannus*) in North America had the same aetiological agent as the disease observed in Asia (Blazer *et al.*, 1999; Lilley *et al.*, 1997a; Vandersea *et al.*, 2006). The first confirmed outbreaks of infection with *A. invadans* on the African continent occurred in 2007, and were connected to the Zambezi-Chobe river system (Andrew *et al.*, 2008; FAO, 2009; Huchzermeyer & Van der Waal, 2012; McHugh *et al.*, 2014). In 2010 and 2011, infection with *A. invadans* appeared in wild freshwater fish in Southern Africa and in wild brown bullhead fish in North America. Infection with *A. invadans* has been reported from more than 20 countries in four continents: North America, Southern Africa, Asia and Australia.

For recent information on distribution at the country level consult the OIE WAHIS interface (https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en).

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

There is no protective vaccine available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

There is no effective treatment for *A. invadans*-infected fish in the wild and in aquaculture ponds.

2.4.3. Immunostimulation

Experimentally infected snakehead fish fed a vitamin-supplemented feed exhibited clinical signs of infection with *A. invadans* but had higher survival than controls (Miles *et al.*, 2001).

2.4.4. Breeding resistant strains

No data available.

2.4.5. Inactivation methods

To minimise fish losses in infected fish ponds water exchange should be stopped and lime or hydrated lime and/or salt should be applied (Lilley *et al.*, 1998). Preparing fish ponds by sun-drying and liming are effective disinfection methods for *A. invadans* (EFSA 2011b; Kumar *et al.*, 2020; Oidtmann, 2012). Similar to other oomycetes or water moulds, general disinfection chemicals effectively destroy *A. invadans* that might contaminate farms, fish ponds or fishing gear (Ibrahim *et al.*, 2018).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Routine disinfection of fish eggs and larvae against water moulds is effective against *A. invadans*. It should be noted that there is no report of the presence of *A. invadans* in fish eggs or larvae.

2.4.7. General husbandry

Control of *A. invadans* in natural waters is probably impossible. In outbreaks occurring in small, closed water bodies or fish ponds, treating water with agricultural limes and improving water quality, together with removal of infected fish, is often effective in reducing mortalities and controlling the disease. Preventing entry of water from *A. invadans*-infected water bodies into fish ponds can prevent spread of the disease into farms. Sodium chloride or salt and agricultural lime are safe and effective chemicals for treating or preventing the spread of *A. invadans*.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

Scoop net, cast net or seine net represent the best choices for catching diseased fish in natural waters or in fish ponds (FAO 2009).

Fish with characteristic EUS-like lesions should be sampled from affected populations

3.2. Selection of organs or tissues

The motile zoospore plays an important role in the spread of the disease. Once the motile spore attaches to the skin of the fish, the spore will germinate under suitable conditions and its hyphae will invade the fish skin, muscular tissue and reach the internal organs. Fish skeletal muscle is the target organ and exhibits major clinical signs of infection with *A. invadans* with mycotic granulomas (Ibrahim *et al.*, 2018). Samples should not be taken from the middle of large lesions as these are likely to be devoid of visible and viable hyphae. Instead, samples should be taken from the leading edge of the infected area or lesion and where possible, multiple samples should be taken from an infected individual to obtain viable hyphae. Fungal hyphae can be seen in tissue squash mounts and histological sections at the leading edge of the infected area. Attempting to culture *A. invadans* from severe ulcers is often constrained because of contaminating bacteria, but still should be attempted. PCR on tissue taken from the leading edge of the ulcer also should be attempted.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Samples should not be taken from the middle of large lesions as these are likely to be devoid of visible and viable hyphae.

3.4. Non-lethal sampling

None available.

3.5. Preservation of samples for submission

Fish specimens should be transported to the laboratory live or in ice-cooled boxes for further diagnosis. Samples must not be frozen since the fungus is killed by freezing. Fish collected from remote areas should be anaesthetised and can be fixed in normal 10% formalin or 10% phosphate-buffered formalin for at least 1–2 days. The fixed specimens are then transferred to double-layer plastic bags with formalin-moistened tissue paper.

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation depends strongly on the quality of samples (time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples use alternative storage methods only after consultation with the receiving laboratory. Multiple samples should be taken from each lesion to increase the chances of obtaining viable hyphae.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1.

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

Standard methods for histopathology can be found in Chapter 2.3.0.

3.5.4. Samples for other tests

None

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity are available. However, smaller life stages (e.g. fry) can be pooled to provide a minimum amount of material for testing.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

Ratings for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ = Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.

++ = Methods are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.

+ = Methods are suitable, but performance or operational characteristics may limit application under some circumstances.

Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Squash mounts					+	+	+	1	+	+	+	1
Histopathology					++	++	++	1	++	++	++	1
Cytopathology												
Cell or artificial media culture					++	++	++	1	+	+	+	1
Real-time PCR												
Conventional PCR					++	++	++	1	++	++	++	1
Amplicon sequencing ⁴									+++	+++	+++	1
In-situ hybridisation									++	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Other antigen detection methods ³												
Other method ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (Chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

Diagnosis of infection with *A. invadans* in clinically affected fish may be achieved by histopathology, oomycete isolation or polymerase chain reaction amplification.

4.1. Squash mounts

Aphanomyces invadans can be detected using microscopic examination of squash preparations prepared as follows:

- i) Remove ulcer surface using a sharp scalpel blade.
- ii) Cut the muscular tissue at the edge of the ulcer.
- iii) Place the pieces of tissue on a cutting board then make thin slices using a sharp scalpel blade.
- iv) Place the thinly sliced tissue between two glass slides and squeeze gently with fingers.
- v) Remove one of the glass slides and cover the tissue with a cover-slip. View under a light microscope to find the nonseptate hyphae structure of *A. invadans* (12–25 µm in diameter).

4.2. Histopathology and cytopathology

Aphanomyces invadans can be detected using microscopic examination of fixed sections, prepared as follows:

- i) Sample only live or moribund specimens of fish with clinical lesions.
- ii) Take samples of skin/muscle (<1 cm³), including the leading edge of the lesion and the surrounding tissue.
- iii) Fix the tissues immediately in 10% formalin. The amount of formalin should be 10 times the volume of the tissue to be fixed.

4.2.1. Histological procedure

Standard methods for processing are provided in chapter 2.3.0. H&E and general fungus stains (e.g. Grocott's stain) will demonstrate typical granulomas and invasive hyphae.

4.2.2 Histopathological changes

Early lesions are caused by erythematous dermatitis with no obvious oomycete involvement. *Aphanomyces invadans* hyphae are observed growing in skeletal muscle as the lesions progress from a mild chronic active dermatitis to a severe locally extensive necrotising granulomatous dermatitis with severe floccular degeneration of the muscle. The oomycete elicits a strong inflammatory response and granulomas are formed around the penetrating hyphae.

4.3. Cell culture for isolation

4.3.1. Isolation of *Aphanomyces invadans* from internal tissues

The following are two methods of isolation of *A. invadans* adapted from Lilley *et al.* (1998) and Willoughby & Roberts (1994).

Method 1: Moderate, pale, raised, dermal lesions are most suitable for oomycete isolation attempts. Remove the scales around the periphery of the lesion and sear the underlying skin with a red-hot spatula so as to sterilise the surface. Using a sterile scalpel blade and sterile fine-pointed forceps, cut through the stratum compactum underlying the seared area and, by cutting horizontally and reflecting superficial tissues, expose the underlying muscle. Ensure the instruments do not make contact with the contaminated external surface and thereby contaminate the underlying muscle. Using aseptic techniques, carefully excise pieces of affected muscle, approximately 2 mm³, and place on a Petri dish containing glucose/peptone (GP) agar (see Table 4.1) with penicillin G (100 units ml⁻¹) and streptomycin (100 µg ml⁻¹). Seal plates, incubate at room temperature or at 25°C and examine daily. Repeatedly transfer emerging hyphal tips on to fresh plates of GP agar with antibiotics until cultures are free of contamination.

Method 2: Lesions located on the flank or tail of fish <20 cm in length can be sampled by cutting the fish in two using a sterile scalpel and slicing a cross-section through the fish at the edge of the lesion. Flame the scalpel until red-hot and use this to sterilise the exposed surface of the muscle. Use a small-bladed sterile scalpel to cut out a circular block of muscle (2–4 mm³) from beneath the lesion and place it in a Petri dish of GP medium (see Table 4.1) with 100 units ml⁻¹ penicillin G and 100 µg ml⁻¹ streptomycin. Instruments should not contact the contaminated external surface of the fish. Incubate inoculated medium at approximately 25°C and examine under a microscope (preferably an inverted microscope) within 12 hours. Repeatedly transfer emerging hyphal tips to plates of GP medium with 12 g litre⁻¹ technical agar, 100 units ml⁻¹ penicillin G and 100 µg ml⁻¹ streptomycin until axenic cultures are obtained. The oomycete isolate can also be maintained at 25°C on GY agar (see Table 4.1) and transferred to a fresh GY agar tube once every 1–2 weeks (Hatai & Egusa, 1979).

4.3.2. Identification of *Aphanomyces invadans*

Aphanomyces invadans does not produce any sexual structures and should thus not be diagnosed by morphological criteria alone. However, the oomycete can be identified to the genus level by inducing sporogenesis and demonstrating typical asexual characteristics of *Aphanomyces* spp., as described in Lilley et al., 1998. *Aphanomyces invadans* is characteristically slow-growing in culture and fails to grow at 37°C on GPY agar (Table 4.1). Detailed temperature-growth profiles are given in Lilley & Roberts (1997). *A. invadans* can be identified by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the rDNA of *A. invadans*.

4.3.3. Inducing sporulation in *Aphanomyces invadans* cultures

The induction of asexual reproductive structures is necessary for identifying oomycete cultures as members of the genus *Aphanomyces*. To induce sporulation, place an agar plug (3–4 mm in diameter) of actively growing mycelium in a Petri dish containing GPY broth and incubate for 4 days at approximately 20°C. Wash the nutrient agar out of the resulting mat by sequential transfer through five Petri dishes containing autoclaved pond water (Table 4.1), and leave overnight at 20°C in autoclaved pond water. After about 12 hours, the formation of achlyoid clusters of primary cysts and the release of motile secondary zoospores should be apparent under the microscope.

Table 4.1. Media for isolation, growth and sporulation of *Aphanomyces invadans* cultures

GP (glucose/peptone) medium	GPY (glucose/peptone/ yeast) broth	GPY agar	GY agar	Autoclaved pond water
3 g litre ⁻¹ glucose	GP broth +	GPY broth +	1% glucose,	Sample pond/lake
1 g litre ⁻¹ peptone	0.5 g litre ⁻¹ yeast extract	12 g litre ⁻¹ technical agar	0.25% yeast extract, 1.5% agar	water known to support oomycete growth. Filter through Whatman 541 filter paper.
0.128 g litre ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O				Combine one part pond water with two parts distilled water and autoclave. pH to 6–7.
0.014 g litre ⁻¹ KH ₂ PO ₄				
0.029 g litre ⁻¹ CaCl ₂ .2H ₂ O				
2.4 mg litre ⁻¹ FeCl ₃ .6H ₂ O				
1.8 mg litre ⁻¹ MnCl ₂ .4H ₂ O				
3.9 mg litre ⁻¹ CuSO ₄ .5H ₂ O				
0.4 mg litre ⁻¹ ZnSO ₄ .7H ₂ O				

Agent purification

Maintaining *A. invadans* in the axenic culture is necessary. As it is characteristically slow-growing, it easily becomes contaminated with other micro-organisms, such as bacteria and other fast-growing oomycetes and fungi. Attempts to purify or isolate *A. invadans* from contaminated cultures usually fail.

4.4. Nucleic acid amplification

4.4.1. Real-time PCR

No real-time PCR methods for detecting *A. invadans* in fish tissues are available.

4.4.2. Conventional PCR

DNA preparation from *A. invadans* isolate

DNA is extracted from an actively growing colony of *A. invadans* culture in GY broth at about 4 days or when young mycelia reach 0.5–1.0 cm in diameter. The mycelia are transferred to sterile 100-mm Petri dishes, washed twice with PBS and then placed on tissue paper for liquid removal. Hyphal tips (~50–

250 mg) are excised with a sterile scalpel blade and transferred to a 1.5 ml microcentrifuge tube for DNA extraction. Commercial DNA extraction kits have been used successfully (Phadee *et al.*, 2004b; Vandersea *et al.*, 2006).

DNA preparation from *A. invadans*-infected tissue

Small pieces of *A. invadans*-infected tissue (25–50 mg) are suitable for DNA extractions (Phadee *et al.*, 2004a).

Diagnostic PCR technique

Three published techniques are specific to *A. invadans*.

Method 1

The species-specific forward primer site is located near the 3' end of the SSU (small subunit) gene and a species-specific reverse primer site is located in the ITS1 region for Ainvad-2F (5'-TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG-3') and Ainvad-ITSR1 (5'-GGC-TAA-GGT-TTC-AGT-ATG-TAG-3'). The PCR mixture contained 25 pM of each primer, 2.5 mM each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U of Platinum *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA (either from an *Aphanomyces* isolate or from infected tissue) for a total volume of 50 μ l. DNA is amplified in a thermocycle machine under the following cycle conditions: 2 minutes at 95°C; 35 cycles, each consisting of 30 seconds at 95°C, 45 seconds at 56°C, 2.5 minutes at 72°C; and a final extension of 5 minutes at 72°C. The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 234 bp (Vandersea *et al.*, 2006).

Method 2

The species-specific primer sites are located in the ITS1 and ITS2 regions. The forward primer is ITS11 (5'-GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC-3') and the reverse is ITS23 (5'-CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA-3'). The PCR mixture contains 0.5 μ M of each primer, 0.2 mM each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 U of *Taq* DNA polymerase and 20 ng of genomic DNA (from an *Aphanomyces* isolate) for a total volume of 25 μ l. The DNA is amplified under the following cycle conditions: 5 minutes at 94°C; 25 cycles, each consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 65°C, 1 minute at 72°C; and a final extension of 5 minutes at 72°C. The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 550 bp. PCR amplification using the DNA template from the infected tissue is similar to the above protocol except that 5 ng of the DNA template is used for 35 cycles (Phadee *et al.*, 2004b).

Method 3

The species-specific primer sites are located in the ITS1 and ITS2 regions. The forward primer is BO73 (5'-CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC-3') and the reverse is BO639 (5'-ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). The PCR mixture contains 0.6 μ M of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM MgCl₂, 0.625 units of *Taq* DNA polymerase, and approximately 5 ng of genomic DNA (or 2.5 μ l of DNA template extracted from 25 mg of infected tissue and suspended in 100 μ l buffer) in a 50 μ l reaction volume (Oidtmann *et al.*, 2008). The DNA is amplified under the following cycle conditions: 96°C for 5 minutes; 35 cycles of 1 minute at 96°C, 1 minute at 58°C and 1 minute at 72°C; followed by a final extension at 72°C for 5 minutes (Oidtmann, pers. comm.). The PCR product is analysed by agarose gel electrophoresis and the target product is 564 bp.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None

4.5. Amplicon sequencing

Nucleotide sequencing of all conventional PCR amplicons (Section 4.4.2) is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. *Aphanomyces invadans*-specific sequences will share a high degree of nucleotide similarity to one of the published reference sequences for *A. invadans* (Genbank accession AF396684)

4.6. *In-situ* hybridisation

A fluorescent peptide nucleic acid *in-situ* hybridisation (FISH) technique has demonstrated a high specificity for *A. invadans*. The technique can directly detect the mycelia-like structure of the oomycete in thinly sliced tissues of affected organs of susceptible fish. The fluorescein (FLU) probe designed to hybridise the small subunit of the rRNA *A. invadans* (bp 621 to 635; GenBank acc. AF396684) is 5'-FLU-GTA-CTG-ACA-TTT-CGT-3' or Ainv-FLU3.

The *A. invadans*-affected tissue is fixed and hybridised as soon as possible after the fish are collected to minimise RNA degradation. Tissue (~20 mg) is dissected from the periphery of the lesions with sterile scalpel blades and placed in individual wells of a 24-well microtitre plate. One ml ethanol-saline fixative (44 ml of 95% ethanol, 10 ml of deionised H₂O, and 6 ml of 25 × SET buffer [3.75 M NaCl, 25 mM EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid), 0.5 M Tris/HCl, pH 7.8]) containing 3% polyoxyethyl-enesorbitan monolaurate (Tween 20) is added to enhance tissue permeabilisation. The microtitre plate is gently agitated at room temperature on an orbital shaker (30 rpm) for 1.5 hours. The fixed tissues are rinsed (twice for 15 minutes each time) with 0.5 ml of hybridisation buffer (5 × SET, 0.1% [v/v] Igpal-CA630 and 25 µg ml⁻¹ poly[A]) containing 3% Tween 20. The hybridisation buffer is removed, and the tissues are resuspended in 0.5 ml of hybridisation buffer containing 3% Tween 20 and 100 nM Ainv-FLU3 probe. "No-probe" control specimens are incubated with 0.5 ml of hybridisation buffer/3% Tween 20. All tissues are incubated at 60°C for 1 hour in the dark. Following incubation, the tissues are rinsed twice with 1 ml of pre-warmed (60°C) 5 × SET buffer containing 3% Tween 20 to remove residual probe. The tissue specimens are mounted onto poly-L-lysine-coated microscope slides. One drop of the light anti-fade solution is placed on the specimens, which are then overlaid with a cover-slip. Analyses are performed by light and epifluorescence microscopy. The camera and microscope settings for epifluorescent analyses are held constant so that comparative analyses of relative fluorescence intensity can be made between probed and non-probed specimens. The fluorescent oomycete hyphae appear as green fluorescence against the dark tissue background. The above detailed protocols are published by Vandersea *et al.* (2006). Using the FISH technique, *A. invadans* can be visualised very well in thinly sliced tissue compared with freshly squashed tissue.

4.7. Immunohistochemistry

None

4.8. Bioassay

Fish can be experimentally infected by intramuscular injection of 0.1 ml suspension of 100+ motile zoospores into fish susceptible to infection with *A. invadans* at 20°C. Histological growth of aseptate hyphae, 12–25 µm in diameter, should be demonstrated in the muscle of fish sampled after 7 days, and typical mycotic granulomas should be demonstrated in the muscle of fish sampled after 10–14 days.

4.9. Antibody or antigen detection methods

Polyclonal antibodies against *A. invadans* or *Aphanomyces* saprophyte showed cross-reactivity to each other using protein gel electrophoresis and Western blot analysis and immunohistochemistry. (Lilley *et al.*, 1997b). However, a specific monoclonal antibody against *A. invadans* developed later was found to have high specificity and high sensitivity to *A. invadans* using immunofluorescence. This monoclonal antibody could detect *A. invadans* hyphae at the early stage of infection (Miles *et al.*, 2003).

A monoclonal antibody-based flow-through immunoassay was developed by Adil *et al.* (2013). This assay was found to have high analytical (0.007 mg ml⁻¹) and diagnostic specificity comparable to PCR.

4.10. Other methods

Serological methods for detection and identification of *A. invadans* in diseased specimens are not practical. If necessary, the monoclonal antibody offers a better specificity and sensitivity than polyclonal antibody for serological detection or identification of *A. invadans* in diseased specimens or in pathogen isolates.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

The test for targeted surveillance to declare freedom from infection with *A. invadans* is examination of target populations for gross signs of infection with *A. invadans*. Surveys should be conducted during seasons that favour clinical manifestation of infection with *A. invadans* or when water temperatures are in the range 18–25°C.

Using the gross sign test for targeted surveillance, a large sample of the fish population should be examined live with a sample size sufficient to meet survey design assumptions as described in Chapter 1.4 of the Aquatic Code.

If fish show gross signs consistent with infection with *A. invadans*, they should be categorised as suspect fish, and the location/farm/compartment/zone should be considered suspect. Suspect specimens should be further tested using the methods listed under presumptive diagnosis followed by confirmative diagnosis as described in the Table 4.1.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (6.1) or presence of clinical signs (6.2) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for suspect and confirmed cases have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁶

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy populations

The presence of infection with *A. invadans* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Observation of clinical signs consistent with infection with *A. invadans*
- ii) A positive result obtained by any of the diagnostic techniques described in Section 4.

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy populations

The presence of infection with *A. invadans* is considered to be confirmed if one or more of the following criteria is met:

- i) Histopathology consistent with infection with *A. invadans* and positive result by PCR and amplicon sequencing
- ii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and positive result for *in-situ* hybridisation
- iii) Artificial media culture and positive result by PCR and sequencing of the amplicon

6.2 Clinically affected animals

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with *A. invadans* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with infection with *A. invadans* as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) Positive result by a recommended molecular detection test
- iii) Histological changes consistent with infection with *A. invadans*
- iv) Visual observation (direct or by microscopy) of *A. invadans*
- v) Culture and isolation of *A. invadans*

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

⁶ For example transboundary commodities.

The presence of infection with *A. invadans* is considered to be confirmed if one or more of the following criteria is met:

- i) Visualisation of hyphae under squash mounts and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- ii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- iii) Histopathological changes consistent with infection with *A. invadans* and positive result for *in-situ* hybridisation
- iv) Artificial media culture and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon
- v) Positive result for *in-situ* hybridisation and a positive result by PCR and sequencing of the amplicon

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *A. invadans* is provided in Table 6.3.1. (note: no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with *A. invadans*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data is only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

- DSe: = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

- DSe: = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

7. References

- ADIL B., SHANKAR K.M., NAVEEN KUMAR B.T., PATIL R., BALLYAYA A., RAMESH K.S., POOJARY S.R., BYADGI O.V. & SIRIYAPPAGOUDE P. (2013). Development and standardization of a monoclonal antibody-based rapid flow-through immunoassay for the detection of *Aphanomyces invadans* in the field. *J. Vet. Sci.*, **14**, 413–419.
- AFZALI S.F., HASSAN M.D., ABDUL-RAHIM A.M., SHARIFFOUR I. & SABRI J. (2013). Isolation and identification of *Aphanomyces* species from natural water bodies and fish farms in Selangor, Malaysia. *Malaysian Appl. Biol.*, **42**, 21–31.
- ANDREW T., HUCHZERMAYER K., MBEHA B. & NENGU S. (2008). Epizootic ulcerative syndrome affecting fish in the Zambezi river system in Southern Africa. *Vet. Rec.*, **163**, 629–632.
- BALDOCK F.C., BLAZER V., CALLINAN R., HATAI K., KARUNASAGAR I., MOHAN C.V. & BONDAD-REANTASO M.G. (2005). Outcomes of a short expert consultation on epizootic ulcerative syndrome (EUS): Re-examination of causal factors, case definition and nomenclature. In: Diseases in Asian Aquaculture V, Walker P., Lester R. & Bondad-Reantaso M.G., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, 555–585.

BALASURIYA L.K.S.W. (1994). Epizootic ulcerative syndrome in fish in Sri Lanka, country status report. In: Proceeding of the ODA Regional Seminar on Epizootic Ulcerative, Robert R.J., Campbell B. & MacRae I.H., eds. Aquatic Animal Health Research Institute, Bangkok, Thailand, pp 39–47.

BLAZER V.S., VOGELBEIN W.K., DENSMORE C.L., MAY E.B., LILLEY J.H. & ZWERNER D.E. (1999). Aphanomyces as a cause of ulcerative skin lesions of menhaden from Chesapeake Bay tributaries. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 340–349.

BONDAD-REANTASO M.G., LUMANLAN S.C., NATIVIDAD J.M. & PHILLIPS M.J. (1992). Environmental monitoring of the epizootic ulcerative syndrome (EUS) in fish from Munoz, Nueva Ecija in the Philippines. In: Diseases in Asian Aquaculture 1, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 475–490.

CATAP E.S. & MUNDAY B.L. (1998). Effects of variations of water temperature and dietary lipids on the expression of experimental epizootic ulcerative syndrome (EUS) in sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fish Pathol.*, **33**, 327–335.

CAVALIER-SMITH T. & CHAO E.E.Y. (2006). Phylogeny and Megasystematics of Phagotrophic Heterokonts (Kingdom Chromista). *J. Mol. Evol.*, **62**, 388–420.

CHINABUT S. & ROBERTS R.J. (1999). Pathology and Histopathology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). Aquatic Animal Health Research Institute, Department of Fisheries, Royal Thai Government, Bangkok, Thailand, 33 pp. ISBN 974-7604-55-8.

CHINABUT S., ROBERTS R.J., WILLOUGHBY G.R. & PEARSON M.D. (1995) Histopathology of snakehead, *Channa striatus* (Bloch), experimentally infected with the specific *Aphanomyces* fungus associated with epizootic ulcerative syndrome (EUS) at different temperatures. *J. Fish Dis.*, **18**, 41–47.

CRUZ-LACIERDA E.R. & SHARIFF M. (1995). Experimental transmission of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in snakehead, *Ophicephalus striatus*. *Dis. Asian Aquac.*, **II**, 327–336. DIEGUEZ-URIBEONDO J., GARCIA M.A., CERENIUS L., KOZUBÍKOVÁ E., BALLESTEROS I., WINDELS C., WEILAND J., KATOR H., SÖDERHÄLL K. & MARTÍN M.P. (2009). Phylogenetic relationships among plant and animal parasites, and saprotrophs in *Aphanomyces* (Oomycetes). *Fungal Genetics and Biology*, **46**, 365–376.

EGUSA S. & MASUDA N. (1971). A new fungal disease of *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **6**, 41–46.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY EFSA (2011a). Scientific Opinion on Epizootic Ulcerative Syndrome. *EFSA J.*, **9**, 2387.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2011b). Report of the technical hearing meeting on Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS). *EFSA Support. Publ.*, **8**, 1–16.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1986). Report of the expert consultation on ulcerative fish diseases in the Asia-Pacific region (TCP/RAS/4508). Bangkok, August 1986. FAO, Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2009). Report of the international emergency disease investigation task force on a serious fish disease in Southern Africa, 18–26 May 2007, FAO, Rome, Italy, 70 pp.

FRASER G.C., CALLINAN R.B. & CALDER L.M. (1992). *Aphanomyces* species associated with red spot disease: an ulcerative disease of estuarine fish from eastern Australia. *J. Fish Dis.*, **15**, 173–181.

GOMO C., HANYIRE T., MAKAYA P. & SIBANDA S. (2016). Outbreak of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Seranochromis robustus fish spesies in Darwendale dam, Zimbabwe. *African J. Fish. Sci.*, **4**, 204–205.

HANJAVANIT C. (1997). Mycotic granulomatosis found in two species of ornamental fishes imported from Singapore. *Mycoscience*, **38**, 433–436.

HATAI K. & EGUSA S. (1979). Studies on pathogenic fungus of mycotic granulomatosis III. Development of the medium for MG-fungus. *Fish Pathol.*, **13**, 147–152.

HATAI K., EGUSA S., TAKAHASHI S. & OOE K. (1977). Study on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis – I. Isolation and pathogenicity of the fungus from cultured-ayu infected with the disease. *Fish Pathol.*, **12**, 129–133.

HATAI K., NAKAMURA K., AN RHA S., YUASA K. & WADA S. (1994). *Aphanomyces* infection in dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Fish Pathol.*, **29**, 95–99.

HAWKE J.P., GROOTERS A.M. & CAMUS A.C. (2003). Ulcerative Mycosis Caused by *Aphanomyces invadans* in Channel Catfish, Black Bullhead, and Bluegill from Southeastern Louisiana. *J. Aquat. Anim. Health.*, **15**, 120–127.

HERBERT B., JONES J.B.B., MOHAN C.V. V. & PERERA R.P.P. (2019). Impacts of epizootic ulcerative syndrome on subsistence fisheries and wildlife. *Rev. Sci. Tech.*, **38**, 459–475.

HUCHZERMAYER C.F., HUCHZERMAYER K.D.A., CHRISTISON K.W., MACEY B.M., COLLY P.A., HANG'OMBE B.M. & SONGE M.M. (2018). First record of epizootic ulcerative syndrome from the Upper Congo catchment: An outbreak in the Bangweulu swamps, Zambia. *J. Fish Dis.*, **41**, 87–94.

HUCHZERMAYER K.D.A. & VAN DER WAAL B.C.W. (2012). Epizootic ulcerative syndrome: Exotic fish disease threatens Africa's aquatic ecosystems. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **83**, 1–6.

IBERAHIM N.A., TRUSCH F. & VAN WEST P. (2018). *Aphanomyces invadans*, the causal agent of Epizootic Ulcerative Syndrome, is a global threat to wild and farmed fish. *Fungal Biol. Rev.*, **44**, 1–13.

KHAN M.H., MARSHALL L., THOMPSON K.D., CAMPBELL R.E. & LILLEY J.H. (1998). Susceptibility of five fish species (Nile tilapia, rosy barb, rainbow trout, stickleback and roach) to intramuscular injection with the Oomycete fish pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **18**, 192–197.

KIRYU Y., SHIELDS J.D., VOGELBEIN W.K., KATOR H. & BLAZER V.S. (2003). Infectivity and pathogenicity of the oomycete *Aphanomyces invadans* in Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*. *Dis. Aquat. Org.*, **54**, 135–146.

KUMAR P., SARKAR P., STEFI RAJU V., MANIKANDAN V., GURU A., ARSHAD A., ELUMALAI P. & AROCKIARAJ J. (2020). Pathogenicity and Pathobiology of Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) Causing Fungus *Aphanomyces invadans* and Its Immunological Response in Fish. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, **28**, 358–375.

LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H., PHILLIPS M.J., FALLIS A., LILLEY J.H., CALLINAN R.B., CHINABUT S., KANCHANAKHAN S., MACRAE I.H. & PHILLIPS M.J. (1998). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) technical handbook. Bangkok: The Aquatic Animal Health Research Institute.

LILLEY J.H., HART D., PANYAWACHIRA V., KANCHANAKHAN S., CHINABUT S., SÖDERHÄLL K. & CERENIUS L. (2003). Molecular characterization of the fish-pathogenic fungus *Aphanomyces invadans*. *J. Fish Dis.*, **26**, 263–275.

LILLEY J.H., HART D., RICHARDS R.H., ROBERTS R.J., CERENIUS L. & SODERHALL K. (1997a). Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish kills. *Vet. Rec.*, **140**, 653–654.

LILLEY J.H., PETCHINDA T. & PANYAWACHIRA V. (2001). *Aphanomyces invadans* zoospore physiology: 4. *In vitro* viability of cysts. *The AAHRI Newsletter*, **10**, 1–4.

LILLEY J.H. & ROBERTS R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. *J. Fish Dis.*, **20**, 135–144.

LILLEY J.H., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (1997b). Characterization of *Aphanomyces invadans* by electrophoretic and Western blot analysis. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 187–197.

LUMANLAN-MAYO S.C., CALLINAN R.B., PALIBARE J.O., CATAP E.S. & FRASER, G.C. (1997). Epizootic ulcerative syndrome (EUS) in rice-fish culture systems: an overview of field experiments 1993–1995. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, The Philippines, 129–138.

McHUGH K.J., CHRISTISON K.W., WEYL O.L.F. & SMIT N.J. (2014). Histological Confirmation of Epizootic Ulcerative Syndrome in Two Cyprinid Species from Lake Liambezi, Zambezi Region, Namibia. *African Zool.*, **49**, 311–316.

MCKENZIE R.A. & HALL W.T.K. (1976). Dermal ulceration of mullet (*Mugil cephalus*). *Aust. Vet. J.*, **52**, 230–231.

MILES D.J.V., POLCHANA J., LILLEY J.H., KANCHANAKHAN S., THOMPSON K.D. & ADAMS A. (2001). Immunostimulation of striped snakehead *Channa striata* against epizootic ulcerative syndrome. *Aquaculture*, **195**, 1–15.

MILES D.J.C., THOMPSON K.D., LILLEY J.H. & ADAMS A. (2003). Immunofluorescence of the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*, using a monoclonal antibody. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 77–84.

NOGA E.J. & DYKSTRA M.J. (1986). Oomycete fungi associated with ulcerative mycosis in menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe). *J. Fish Dis.*, **9**, 47–53.

OIDTMANN B. (2012). Review of biological factors relevant to import risk assessments for epizootic ulcerative syndrome (*Aphanomyces invadans*). *Transbound. Emerg. Dis.*, **59**, 26–39.

OIDTMANN B., STEINBAUER GEIGER S. & HOFFMANN R.W. (2008). Experimental infection and detection of *Aphanomyces invadans* in European catfish, rainbow trout and European eel. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 185–207.

PAGRUT N.K., GANGULY S., JAISWAL V. & SINGH C. (2017). An overview on epizootic ulcerative syndrome of fishes in India: A comprehensive report. *J. Entomol. Zool. Stud.*, **5**, 1941–1943.

PHADEE P., KURATA O. & HATAI K. (2004a). A PCR method for the detection of *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **39**, 25–31.

PHADEE, P., KURATA, O., HATAI K., HIRONO I. & AOKI T. (2004b). Detection and identification of fish-pathogenic *Aphanomyces piscicida* using polymerase chain reaction (PCR) with species-specific primers. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 220–230.

PRADHAN P.K., MOHAN C.V., SHANKAR K.M., KUMAR B.M. & DEVARAJA G. (2007). Yearlings of Indian major carps resist infection against the epizootic ulcerative syndrome pathogen, *Aphanomyces invadans*. *Current Science*, **92**, 1430–1434.

TONGUTHAI K. (1985). A preliminary account of ulcerative fish diseases in the Indo-Pacific region (a comprehensive study based on Thai experiences). National Inland Fisheries Institute, Bangkok, Thailand, 39 pp.

TSUI C.K.M., MARSHALL W., YOKOYAMA R., HONDA D., LIPPMEIER J.C., CRAVEN K.D., PETERSON P.D. & BERBEE M.L. (2009). Labyrinthulomycetes phylogeny and its implications for the evolutionary loss of chloroplasts and gain of ectoplasmic gliding. *Mol. Phylogen. Evol.*, **50**, 129–140.

VANDERSEA M.W., LITAKER R.W., YONNISH B., SOSA E., LANDSBERG J.H., PULLINGER C., MOON-BUTZIN P., GREEN J., MORRIS J.A., KATOR H., NOGA E.J. & TESTER P.A. (2006). Molecular assays for detecting *Aphanomyces invadans* in ulcerative mycotic fish lesions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 1551–1557.

VISHWANATH T., MOHAN C. & SHANKAR K. (1998). Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS), associated with a fungal pathogen, in Indian fishes: histopathology – ‘a cause for invasiveness’. *Aquaculture*, **165**, 1–9.

WADA S., AN RHA S., KONDOW T., SUDA H., HATAI K. & ISHII H. (1996). Histopathological comparison between ayu and carp artificially infected with *Aphanomyces piscicida*. *Fish Pathol.*, **31**, 71–80.

WILLOUGHBY L.G. & ROBERTS R.J. (1994). Improved methodology for isolation of the *Aphanomyces* fungal pathogen of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asian fish. *J. Fish Dis.*, **17**, 541–543.

*
* *

NB: There is currently (2022) no OIE Reference Laboratories for infection with *Aphanomyces invadans* (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS EPIZOOTIC ULCERATIVE SYNDROME;
MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2013.

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPTER 2.3.2.

INFECTION WITH EPIZOOTIC HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with epizootic haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent *epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV) of the Genus *Ranavirus* of the Family *Iridoviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

EHNV is a species of the genus *Ranavirus* in the Family *Iridoviridae* (Chinchar *et al.*, 2005). In addition to fish, ranaviruses have been isolated from healthy or diseased frogs, salamanders and reptiles in America, Europe and Australia (Chinchar, 2002; Drury *et al.*, 2002; Fijan *et al.*, 1991; Hyatt *et al.*, 2002; Speare & Smith, 1992; Whittington *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 1968; Zupanovic *et al.*, 1998). Ranaviruses have large (150–180 nm), icosahedral virions, a double-stranded DNA genome 150–170 kb, and replicate in both the nucleus and cytoplasm with cytoplasmic assembly (Chinchar *et al.*, 2005).

Since the recognition of disease due to EHNV in Australia in 1986, similar systemic necrotising iridovirus syndromes have been reported in farmed fish. These include catfish (*Ictalurus melas*) in France (European catfish virus, ECV) (Pozet *et al.*, 1992), sheatfish (*Silurus glanis*) in Germany (European sheatfish virus, ESV) (Ahne *et al.*, 1989; 1990), turbot (*Scophthalmus maximus*) in Denmark (Bloch & Larsen, 1993), and cod (*Gadus morhua*) in Denmark (Cod iridovirus, CodV) (Ariel *et al.*, 2010). EHNV, ECV, ESV, and CodV share >98% nucleotide identity across concatenated sequences across the RNR- α , DNAPol, RNR- β , RNase II and MCP gene regions (Ariel *et al.*, 2010).

EHNV and ECV can be differentiated using genomic analysis (Ahne *et al.*, 1998; Holopainen *et al.*, 2009; Hyatt *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 1996; 1997; Marsh *et al.*, 2002). This enables epidemiological separation of disease events in finfish in Australia (EHNV) and Europe (ECV), and differentiation of these from ranavirus occurrences in amphibians.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

EHNV can persist in frozen fish tissues for more than 2 years (Langdon, 1989) and frozen fish carcasses for at least a year (Whittington *et al.*, 1996).

2.1.3. Survival and stability outside the host

EHNV is resistant to drying and remained infective for 97 days at 15°C and 300 days at 4°C in water (Langdon, 1989). For these reasons, it is presumed that EHNV would persist for months to years on a fish farm in water and sediment, as well as on plants and equipment.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with EHNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code* (*Aquatic Code*) are:

Family	Scientific name	Common name
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Northern pike
Galaxiidae	<i>Galaxias olidus</i>	Mountain galaxias
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i>	Black bullhead
Melanotaeniidae	<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	Crimson spotted rainbow fish
Percidae	<i>Perca fluviatilis</i>	European perch
	<i>Sander lucioperca</i>	Pike-perch
Percichthyidae	<i>Macquaria australasica</i>	Macquarie perch
Poeciliidae	<i>Gambusia holbrooki</i>	Eastern mosquito fish
	<i>Gambusia affinis</i>	Mosquito fish
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Terapontidae	<i>Bidyanus bidyanus</i>	Silver perch

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with EHNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: none known.

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: Atlantic salmon (*Salmo salar*), freshwater catfish (*Tandanus tanaeus*), golden perch (*Macquaria ambigua*), Murray cod (*Maccullochella peelii*) and purple spotted gudgeon (*Mogurnda adspersa*).

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Natural infections and disease have been limited to European perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Australia. The disease is more severe in European perch and in juveniles compared with adult fish (Whittington *et al.*, 2010). There are no descriptions of infection of eggs or early life stages of any other fish species.

For the purposes of Table 4.1, larvae and fry up to approximately 5 g in weight may be considered to be early life stages, fingerlings and grower fish up to 500 g may be considered to be juveniles, and fish above 500 g may be considered to be adults.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Target organs and tissues infected with the virus are kidney, spleen and liver. It is not known if EHNV can be detected in gonadal tissues, ovarian fluid or milt or whether these tissues are suitable for surveillance of broodstock.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Rainbow trout: The high case fatality rate and low prevalence of infection with EHNV in natural infections in rainbow trout means that the recruitment rate of carriers is likely to be very low (<2%) (Whittington *et al.*, 1994). EHNV has been detected in growout fish but histopathological lesions consistent with infection with EHNV indicated an active infection rather than a carrier state (Whittington *et al.*, 1999). Anti-EHNV serum antibodies were not detected in fingerlings during or after an outbreak but were detected in a low proportion of growout fish, hence, it is uncertain whether these were survivors of the outbreak (Whittington *et al.*, 1994; 1999). There are data for European stocks of rainbow trout in experimental infections where potential carriers were identified (Ariel & Bang Jensen, 2009).

European perch: EHNV was isolated from 2 of 40 apparently healthy adult European perch during epizootics in juveniles in Victoria, Australia (Langdon & Humphrey, 1987), but as the incubation period extends for up to 28 days (Whittington & Reddacliff, 1995), these fish may have been in the preclinical phase.

2.2.6. Vectors

Birds are potential vectors for EHNV, it being carried in the gut, on feathers, feet and the bill (Whittington *et al.*, 1996).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Rainbow trout: It appears that under natural farm conditions EHNV is poorly infective but once infected, most fish succumb to the disease has a high case fatality rate. Infection with EHNV may be present on a farm without causing suspicion because the mortality rate may not rise above the usual background rate. Infection with EHNV has most often been reported in young fingerlings <125 mm fork length with daily mortality of less than 0.2% and total mortality of up to 4%. However, rainbow trout of all ages may be susceptible, although infection has not yet been seen in broodstock (Whittington *et al.*, 1994; 1999). There is a low direct economic impact because of the low mortality rate. Differences in susceptibility between European and Australian stocks of rainbow trout may exist (Ariel & Bang Jensen, 2009).

European perch: There is a very high rate of infection and mortality in natural outbreaks that, over time, leads to loss in wild fish populations (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1996). Experimental bath inoculation with as few as 0.08 TCID₅₀ ml⁻¹ was lethal, and doses too low to be detected by virus isolation in BF-2 cells were fatal by intraperitoneal inoculation (Whittington & Reddacliff, 1995). Differences in susceptibility between European and Australian stocks of European perch may exist (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Moribund fish may have loss of equilibrium, flared opercula and may be dark in colour (Reddacliff & Whittington, 1996). Clinical signs are usually more obvious in fingerlings and juvenile fish than adults of both rainbow trout and European perch. There may be clinical evidence of poor husbandry practices, such as overcrowding and suboptimal water quality, manifesting as skin, fin and gill lesions (Reddacliff & Whittington, 1996).

2.3.3 Gross pathology

There may be no gross lesions in affected fish. A small proportion of fish may have enlargement of kidney, liver or spleen. There may be focal white to yellow lesions in the liver corresponding to areas of necrosis (Reddacliff & Whittington, 1996).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Rainbow trout: EHNV has spread between rainbow trout farms by transfer of infected fingerlings and probably transport water (Langdon *et al.*, 1988; Whittington *et al.*, 1994; 1999). The low prevalence of infection in rainbow trout means that active infection can easily go unrecognised in a population and be spread by trading fish. There are no data on possible vertical transmission of EHNV on or within ova, and disinfection protocols for ova have not been evaluated. EHNV has not yet been isolated from ovarian tissues or from broodstock. Annual recurrence in farmed rainbow trout may be due to reinfection of successive batches of fish or from wild European perch present in the same catchment.

European perch: The occurrence of infection with EHNV in European perch in widely separated river systems and impoundments suggested that EHNV was spread by translocation of live fish or bait by recreational fishers (Whittington *et al.*, 2010).

The route of infection is unknown. European perch and rainbow trout are susceptible to immersion exposure. The virus infects a range of cell types including hepatocytes, haematopoietic cells and endothelial cells in many organs (Reddacliff & Whittington, 1996). Virus is shed into water from infected tissues and carcasses as they disintegrate.

2.3.5. Environmental factors

Rainbow trout: Outbreaks appear to be related to poor husbandry, particularly overcrowding, inadequate water flow and fouling of tanks with feed. Damage to skin may provide a route of entry for EHNV. Outbreaks have been seen on farms at water temperatures ranging from 11 to 20°C (Whittington *et al.*, 1994; 1999). The incubation period after intraperitoneal inoculation was 3–10 days at 19–21°C compared with 14–32 days at 8–10°C (Whittington & Reddacliff, 1995).

European perch: Natural epizootics of infection with EHNV affecting juvenile and adult European perch occur mostly in summer (Langdon & Humphrey, 1987; Langdon *et al.*, 1986; Whittington *et al.*, 1994). It has been assumed that the disease in juvenile fish is related to the annual appearance of large numbers of non-immune young fish and their subsequent exposure to the virus while schooling in shallow waters; adults are uncommonly involved in these outbreaks. It is possible that environmental temperature is the trigger for outbreaks as juvenile fish feed in warm shallow waters on planktonic fauna, whereas adults

feed on benthic invertebrates and larger prey in deeper cooler water (Whittington & Reddacliff, 1995). Experimentally, the incubation period ranged from 10 to 28 days at 12–18°C compared with 10–11 days at 19–21°C, and adult perch were refractory to infection at temperatures below 12°C (Whittington & Reddacliff, 1995). European stocks of European perch also displayed temperature-dependent susceptibility (Ariel & Bang Jensen, 2009).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with EHNV has been reported from rainbow trout farms within two river catchments in New South Wales, Australia (Whittington *et al.*, 2010). Infection with EHNV is endemic in south-eastern Australia, with a discontinuous distribution (Whittington *et al.*, 2010).

See WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

Not available.

2.4.1. Vaccination

None available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

None available.

2.4.3. Immunostimulation

None available.

2.4.4. Breeding resistant strains

There has been no formal breeding programme for resistant strains of susceptible species. However, experimental trials using a bath exposure have shown that European perch from water bodies in New South Wales, Australia with previous EHNV infections showed lower mortality compared with European perch from neighbouring and distant water bodies in Australia that have no previous history of EHNV (Becker *et al.*, 2016).

2.4.5. Inactivation methods

EHNV is susceptible to 70% ethanol, 200 mg litre⁻¹ sodium hypochlorite or heating to 60°C for 15 minutes (Langdon, 1989). Data for the inactivation of amphibian ranavirus may also be relevant: 150 mg/litre chlorhexidine and 200 mg/litre potassium peroxymonosulphate were effective after 1 minute contact time (Bryan *et al.*, 2009). If it is first dried, EHNV in cell culture supernatant is resistant to heating to 60°C for 15 minutes (Whittington *et al.*, 2010).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not tested.

2.4.7. General husbandry

Disease control in rainbow trout at the farm level relies on reducing the impact of infection by maintaining low stocking rates and adequate water quality. Investigations on one rainbow trout farm indicated that ponds with high stocking rates and low water flow, and thus poorer water quality, may result in higher levels of clinical disease compared with ponds on the same farm with lower stocking rates and higher water flow (Whittington *et al.*, 1994). The mechanism of protection may be through maintenance of healthy integument (Whittington *et al.*, 1994).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in Sections 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples which are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Clinical inspections should be carried out during a period when water temperature is conducive to development of clinical disease (see Section 2.3.5). All production units (ponds, tanks, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows:

- i) The most susceptible species (e.g. rainbow trout and European perch) should be sampled preferentially. Other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample lots or populations with a history of abnormal mortality, potential exposure events or where there is evidence of poor water quality or husbandry. If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.
- iii) If weak, abnormally behaving or freshly dead fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the fish selected should include normal appearing, healthy fish collected in such a way that all parts of the farm as well as all year classes are proportionally represented in the sample.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with EHNV should be collected. Ideally fish should be collected while alive, however recently dead fish can also be selected for diagnostic testing. It should be noted however, that there will be a significant risk of contamination with environmental bacteria if the animals have been dead for some time.

3.2. Selection of organs or tissues

Liver, anterior kidney and spleen from individual fish are pooled (Jaramillo *et al.*, 2012).

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Inappropriate tissues include gonads, gonadal fluids, milt and ova, ~~since because~~ there is no evidence of reproductive tract infection.

3.4. Non-lethal sampling

~~No~~ Non-lethal samples (blood, fin, gill, integument or mucous) are unsuitable for testing EHNV.

3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

For recommendations on transporting samples for virus isolation to the laboratory, see Section B.2.4 of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

~~Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen. Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish).~~

3.5.3. Samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

~~Tissue samples for histopathology should be fixed immediately after collection in 10% neutral buffered formalin. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 2.2 of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish).~~

3.5.4. Samples for other tests

Not recommended for routine diagnostic testing.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger fish should be processed and tested individually. Small life stages such as fry or specimens can be pooled to provide the minimum amount of material needed for testing. If pooling is used, it is recommended to pool organ pieces from a maximum of five fish.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection-pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations-animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

The designations used in the Table indicate:

Ratings against for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against-for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability, cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

Key:

- +++ = Most suitable-Methods —are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Suitable-Method(s) are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Less suitable-Methods —are suitable, but performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities, repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology					++	++	++	1				
Cytopathology												
Cell culture	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2	±±	±±	±±	2
Immunohistochemistry					+	+	+	1				
Real-time PCR	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2	±±	±±	±±	2
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1	±±	±±	±±	1
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	3-1
In-situ hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA			+	1								
Ag-ELISA	+	+	+	1	+	+	+	1				
Other antigen detection methods ³												
Other method ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification;

Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively.

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Wet mounts

Not applicable.

4.2. Histopathology and cytopathology

Light microscopy: routine methods can be used for tissue fixation, such as in 10% buffered neutral formalin, paraffin embedding, preparation of 4–10 µm sections and staining with H&E to demonstrate tissue necrosis and basophilic intracytoplasmic inclusion bodies. These inclusion bodies are indicative but not confirmatory for infection with EHNV. Formalin-fixed paraffin-embedded sections can also be stained using an immunoperoxidase method (see below) to identify EHNV antigen associated with necrotic lesions.

Acute focal, multifocal or locally extensive coagulative or liquefactive necrosis of liver, haematopoietic kidney and spleen are commonly seen in routine haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections of formalin-fixed material. A small number of basophilic intracytoplasmic inclusion bodies may be seen, particularly in areas immediately surrounding necrotic areas in the liver and kidney. Necrotic lesions may also be seen in heart, pancreas, gastrointestinal tract, gill and pseudobranch (Reddacliff & Whittington, 1996).

Affected tissues (e.g. kidney, liver and spleen) contain cells exhibiting necrosis. Cells contain conspicuous cytoplasmic inclusions that are rarefied areas of the cytoplasm in which the viruses are assembled. ~~Within the cytoplasm, aggregates (paracrystalline arrays) of large (175 nm ± 6 nm) nonenveloped icosahedral viruses are apparent; single viruses are also present. Complete viruses (containing electron dense cores) bud/egress from the infected cells through the plasma membrane.~~ The nuclei of infected cells are frequently located peripherally and are distorted in shape.

4.3. Cell culture for isolation

4.3.1. Preparation of fish tissues for virus isolation

A simple method for preparation of fish tissues for cell culture and ELISA has been validated (Whittington & Steiner, 1993) (see sampling Section 3).

- i) Freeze tubes containing tissues at –80°C until needed.
- ii) Add 0.5 ml of homogenising medium (minimal essential medium Eagle, with Earle's salts with glutamine) [MEM] with 200 International Units [IU] ml⁻¹ penicillin, 200 µg ml⁻¹ streptomycin and 4 µg ml⁻¹ amphotericin B) to each tube. Grind tissue to a fine mulch with a sterile fitted pestle.
- iii) Add another 0.5 ml of homogenising medium to each tube and mix with a pestle.
- iv) Add three sterile glass beads to each tube (3 mm diameter) and close the lid of the tube.
- v) Vortex the suspension vigorously for 20–30 seconds and place at 4°C for 2 hours.
- vi) Vortex the suspension again as above and centrifuge for 10 minutes at 2500 **g** in a benchtop microcentrifuge.
- vii) Transfer the supernatant, now called clarified tissue homogenate, to a fresh sterile tube. Homogenates may be frozen at –80°C until required for virus isolation and ELISA.

4.3.2. Cell culture/artificial media

EHNV ~~grows~~ replicates well in many fish cell lines including BF-2 (bluegill fry ATCC CCL 91), FHM (fathead minnow; ATCC CCL 42), EPC (*epithelioma papulosum cyprini* [Cinkova *et al.*, 2010]), and CHSE-214 (Chinook salmon embryo cell line; ATCC CRL 1681) at temperatures ranging from 15 to 22°C (Crane *et al.*, 2005). Incubation temperatures of 20°C or 24°C result in higher titres than 15°C; 22°C and BF-2 EPC or CHSE-214 cells are recommended to maximise titres, which might be important for the detection of low numbers of viruses in fish tissues (Ariel *et al.*, 2009). BF-2 cells are preferred by the OIE Reference Laboratory with an incubation temperature of 22°C. The procedure for BF-2 cells is provided below. A procedure for CHSE-214 cells is provided under immunoperoxidase staining below (Section 4.7). The identity of viruses in cell culture is determined by immunostaining, ELISA, immuno-electron microscopy, PCR or other methods.

4.3.3. Cell culture technical procedure

Samples: tissue homogenates.

Cells are cultured (in flasks, tubes or multi-well plates) with growth medium (MEM + 10% fetal calf bovine serum [FCBS] with 100 IU ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 2 µg ml⁻¹ amphotericin B). The cells are incubated until almost confluent at 22°C, which can take up to 4 days depending on the seeding rate. Medium is changed to a maintenance medium (MEM with 2% FCBS and 100 IU ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin and 2 µg ml⁻¹ amphotericin B) on the day of inoculation. A 1/10 dilution using homogenising medium is made of single or pooled homogenates. Each culture is inoculated with 100 µl of sample per ml of culture medium. This represents a final 1/100 dilution of a 0.1 mg ml⁻¹ tissue homogenate. A further 1/10 dilution is made representing a final 1/1000 dilution, and two cultures are inoculated. No adsorption step is used. As an alternative, two to three cultures can be inoculated directly with 10 µl undiluted homogenate per ml of culture medium. Note that a high rate of cell toxicity or contamination often accompanies the use of a large undiluted inoculum. The cultures are incubated at 22°C in an incubator for 6 days. Cultures are read at days 3 and day 6. Cultures are passed at least once to detect samples with low levels of virus. On day 6, the primary cultures (P1) are frozen overnight at -20°C, thawed, gently mixed and then the culture supernatant is inoculated onto fresh cells as before (P2), i.e. 100 µl P1 supernatant per ml culture medium. Remaining P1 supernatants are transferred to sterile 5 ml tubes and placed at 4°C for testing by ELISA or PCR or another means to confirm the cause of cytopathic effect (CPE) as EHV. P2 is incubated as above, and a third pass is conducted if necessary.

4.3.4. Interpretation of results

CPE is well developed and consists of focal lysis surrounded by rounded granular cells. This change extends rapidly to involve the entire monolayer, which detaches and disintegrates. Cell cultures can be tested for EHV DNA using real-time PCR and conventional PCR with sequence analysis as described in Section 4.4. Antigen can be detected using immunocytochemistry in cell cultures with polyclonal antibodies and protocol available from the reference laboratory.

Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

4.4. Nucleic acid amplification

Although several conventional PCR or quantitative real-time PCR methods have been described (Jaramillo *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2007; Stilwell *et al.*, 2018) none has been validated according to OIE guidelines for primary detection of EHV. However, identification of ranavirus at genus and species level is possible using several published PCR strategies. Samples can be screened by real-time PCR, but as the assays described are not specific for EHV, identification of EHV by conventional PCR and amplicon sequencing must be undertaken on any samples screening positive by real-time PCR. For testing by conventional PCR, two PCR assays using MCP primers are used with amplicon sequencing required to differentiate EHV from ECV, FV3 and BIV (Marsh *et al.*, 2002). Alternatively, PCR of the DNA polymerase gene and neurofilament triplet H1-like protein genes can be used (Holopainen *et al.*, 2011) (this method is not described in this chapter).

Samples: virus from cell culture or direct analysis of tissue homogenate.

4.4.1. Real-time PCR

Tissue samples can be homogenised by manual pestle grinding or by bead beating (Rimmer *et al.*, 2012). Commercially available nucleic acid extraction kits (e.g. spin columns, magnetic beads) may be used to extract DNA directly from tissues and from tissue homogenates and cell culture supernatants. Depending on the number of samples to be tested, in the OIE Reference Laboratory, nucleic acids are extracted with either the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) or MagMAX-96 Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. A negative extraction control, consisting of extraction reagents only, is included when test samples are extracted.

The ranavirus real-time screening protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Pallister *et al.*, 2007 is as follows; Template (2 µl) is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM for each primer, 250 nM for probe, and molecular grade water. After 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 95 °C for 10 minutes, PCR amplification consists of 45 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds.

Alternative real-time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHV and other ranaviruses. The assay described by Jaramillo *et al.*

(2012) uses SYBR Green detection chemistry and the assay described by Stilwell *et al.* (2018) was designed to detect multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

Table 4.4.1.1. Ranavirus primer and probe sequences

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
RANA CON F	5'-CTC-ATC-GTT-CTG-GCC-ATC-A-3'	
RANA CON R Probe	5'-TCC-CAT-CGA-GCC-GTT-CA-3'	Pallister <i>et al.</i> , 2007
RANA CON Pr Primer	5'-6FAM-CAC-AAC-ATT-ATC-CGC-ATC-MGB-3'	
C1096 Primer	GAC-TGA-CCA-ACG-CCA-GCC-TTA-ACG	Jaramillo <i>et al.</i> , 2012
C1097 Primer	GCG-GTG-GTG-TAC-CCA-GAG-TTG-TCG	
RanaF1 RanaR1 Probe	CCA-GCC-TGG-TGT-ACG-AAA-ACA ACT-GGG-ATG-GAG-GTG-GCA-TA	Stilwell <i>et al.</i> , 2018
RanaP1	6FAM-TGG-GAG-TCG-AGT-ACT-AC-MGB	

4.4.2. Conventional PCR

PCR and restriction endonuclease analysis (REA): technical procedure

Amplified product from PCR assay MCP-1 digested with PflM I enables differentiation of EHV and BIV from FV3 and ECV. Amplified product from PCR assay MCP-2 digested with Hinc II, Acc I and Fnu4H I (individually) enables differentiation of EHV and BIV from each other and from FV3 and ECV.

Preparation of reagents

EHNV-purified DNA and BIV-purified DNA PCR control reagents are supplied by the reference laboratory in freeze-dried form. Reconstitute using 0.5 ml of Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and allow the vial to stand at RT for 2 minutes. Mix the vial very gently. For routine use, as a PCR control, it is recommended that working stocks be prepared as a 1/10 dilution in TE buffer (pH 8.0). Aliquots of 250 µl should be stored at -20°C. Each aliquot is sufficient for at least 50 reactions (1 to 5 µl added to cocktail) and has a minimum shelf life of 6 months from date of diluting.

Primers M151 and M152 (MCP-1, 321 bp), M153 and M154 (MCP-2, 625 bp) are supplied in working strength (100 ng µl⁻¹) and should be stored at -20°C. Primers can also be ordered from commercial suppliers. For primer sequences, refer to Table 4.4.2.1.

Table 4.4.2.1. MCP-1 and MCP-2 primer sequences

PCR assay	Primer	Sequence (5'-3')	Product size	Gene location
MCP-1	M151	AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA	321 bp	266–586
	M152	CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT		
MCP-2	M153	ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC	625 bp	842–1466
	M154	CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

PCR cocktail

Amplification reactions in a final volume of 50 µl (including 5 µl DNA sample) contain 2.5 µl (250 ng) of each working primer, 200 µM of each of the nucleotides dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 5 µl of 10 × PCR buffer (66.6 mM Tris/HCl, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 2.5 mM MgCl₂, 1.65 mg ml⁻¹ BSA, 10 mM beta-mercaptoethanol) and 2 U Taq polymerase. Instructions on preparation of 10 × PCR buffer are included in Table 4.4.2.2.

Table 4.4.2.2. 10 × PCR buffer preparation

Ingredients	Amount	Final concentration in 50 µl PCR mix
Tris	4.050 g	66.6 mM
Ammonium sulphate	1.100 g	16.6 mM
BSA (albumin bovine fraction V fatty acid free)	0.825 g	1.65 mg ml ⁻¹
Magnesium chloride	1.25 ml	2.5 mM
TE buffer (sterile)	50 ml	

NOTE: alternative commercial buffers may also be used.

Two negative controls are included, one comprising PCR cocktail only and the second containing 5 µl TE buffer.

The MCP-1 and MCP-2 reactions have the following profile: 1 cycle of denaturation at 94°C for 3 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 50°C for 30 seconds and extension at 72°C for 1 minute; a final extension of 72°C for 5 minutes, and cooling to 4°C.

NOTE: the annealing temperature may be increased to 60 or 62°C to reduce nonspecific amplification when the assay is used to test fish tissues.

PCR results are assessed by electrophoresis in 2% agarose gels stained with ~~ethidium bromide~~ containing SYBRTM Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent. EHNV PCR control DNA (1/10 working stock) should give a result similar in intensity to the 10–3 band in both cases.

The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable.

4.5. Amplicon sequencing

Amplicons generated using the MCP-1 and/or MCP-2 primers sets can be sequenced. Amplicons should be gel-purified and sequenced using both the forward and reverse primer. Consensus sequence, generated after analysis of the quality of the sequence chromatograms, can then be compared to reference sequences, for example by BlastN search of the NCBI database.

4.6. *In-situ* hybridisation

Not applicable

4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (immunoperoxidase stain)

Samples: formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections.

Technical procedure

The following protocol is intended for the qualitative demonstration of EHNV antigens in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (Reddacliff & Whittington, 1996). It assumes that antigens may have become cross linked and therefore includes a protease digestion step that may be omitted if unfixed

samples are examined. A commercial kit (DAKO® LSAB K0679) with peroxidase-labelled streptavidin and a mixture of biotinylated anti-rabbit/anti-mouse/anti-goat immunoglobulins as link antibodies is used for staining. Other commercially supplied reagents are also used. For convenience these are also supplied by DAKO⁷. The primary affinity purified rabbit anti-EHNV antibody (Lot No. M708) is supplied freeze-dried by the OIE Reference Laboratory.

- i) Cut 5 µm sections and mount on SuperFrost® Plus G/Edge slides (Menzel-Glaser, HD Scientific Cat. No. HD 041300 72P3). Mark around the section with a diamond pencil to limit the spread of reagents.
- ii) Deparaffinise the section:
 - Preheat slides in a 60°C incubator for 30 minutes.
 - Place slides in a xylene bath and incubate for 5 minutes. Repeat once. Note that xylene replacements can be used without deleterious effects.
 - Tap off excess liquid and place slides in absolute ethanol for 3 minutes. Repeat once.
 - Tap off excess liquid and place slides in 95% ethanol for 3 minutes. Repeat once.
 - Tap off excess liquid and place slides in distilled or deionised water for 30 seconds.
- iii) Expose antigens using a protease treatment. Flood slide with proteinase K (5–7 µg ml⁻¹) and incubate for 20 minutes (ready-to-use solution, DakoCytomation Cat. No. S3020). Rinse slide by immersing three times in water. Place in a PBST bath for 5 minutes (PBS pH 7.2, 0.05% [v/v] Tween 20). Tap off the excess wash solution and carefully wipe around the section.
- iv) Perform the immunostaining reaction using the Universal DAKO LSAB®+ Kit, Peroxidase (DakoCytomation Cat No. K0679). Ensuring the tissue section is completely covered, add the following reagents to the slide. Avoid drying out.
- v) 3% hydrogen peroxide: cover the section and incubate for 5 minutes. Rinse gently with PBST and place in a fresh wash bath.
- vi) Primary antibody (affinity purified rabbit anti-EHNV 1:/1500 Lot No. M708) and negative control reagent (non-immune rabbit serum at a dilution of 1/1500) on a second slide. Cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- vii) Biotin-labelled secondary link antibody: Link—cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- viii) Streptavidin peroxidase: cover the section and incubate for 15 minutes. Rinse slides.
- ix) Substrate-chromogen solution: cover the section and incubate for 5 minutes. Rinse slides gently with distilled water.
- x) Counterstain by placing slides in a bath of DAKO® Mayer's Haematoxylin for 1 minute (Lillie's Modification, Cat. No. S3309). Rinse gently with distilled water. Immerse 10 times into a water bath. Place in distilled or deionised water for 2 minutes.
- xi) Mount and cover-slip samples with an aqueous-based mounting medium (DAKO® Faramount Aqueous Mounting Medium Cat. No. S3025).

Interpretation of results

EHNV antigen appears as a brown stain in the areas surrounding degenerate and necrotic areas in parenchymal areas. There should be no staining with negative control rabbit serum on the same section.

Availability of test and reagents: antibody reagents and test protocols are available from the OIE Reference Laboratory.

4.8. Bioassay

Not applicable.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

⁷ Dako Cytomation California Inc., 6392 via Real, Carpinteria, CA 93013, USA, Tel.: (+1-805) 566 6655, Fax: (+1-805) 566 6688; Dako Cytomation Pty Ltd, Unit 4, 13 Lord Street, Botany, NSW 2019, Australia, Fax: (+61-2) 9316 4773; Visit www.dakocytomation.com for links to other countries.

An antigen ELISA for detection of EHNV and an EHNV antibody detection ELISA have been described (Whittington & Steiner, 1993). The same antibodies are suitable for immunohistochemistry on fixed tissues and for detection of ranavirus antigen in cell culture. Reagents and protocols are available from the reference laboratory. It should be noted that polyclonal antibodies used in all related methods (immunoperoxidase, antigen-capture ELISA and immunoelectron microscopy) cross-react with all known ranaviruses except Santee Cooper ranaviruses (Ahne *et al.*, 1998; Cinkova *et al.*, 2010; Hedrick *et al.*, 1992; Hyatt *et al.*, 2000).

4.10. Other methods

Neutralising antibodies have not been detected in fish or mammals exposed to EHNV. Indirect ELISA for detection of antibodies induced following exposure to EHNV has been described for rainbow trout and European perch (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington & Reddacliff, 1995). The sensitivity and specificity of these assays in relation to a standard test are not known and interpretation of results is difficult. Protocols and specific anti-immunoglobulin reagents required to conduct these tests are available from the reference laboratory.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

Real-time PCR is the most appropriate method of screening healthy fish populations for EHNV; however, the available methods are not specific for EHNV. Any real-time PCR positive samples should be tested by conventional PCR and sequence analysis to distinguish ranaviruses.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE Reference Laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status⁸

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with EHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result for EHNV based on virus isolation in cell cultures;
- ii) Positive real-time or conventional PCR result;
- iii) Positive EHNV antigen ELISA.

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with EHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) EHNV-typical CPE in cell culture followed by identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon;
- ii) A positive result in tissue samples by real-time PCR and identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon.

⁸ For example transboundary commodities.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for a single disease; however, they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with EHNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Histopathology consistent with EHNV;
- ii) EHNV-typical CPE in cell cultures;
- iii) Positive real-time or conventional PCR result.

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with EHNV is considered to be confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.2.1, at least one of the following criteria is met:

- i) EHNV-typical CPE in cell culture followed by identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon;
- ii) A positive result in tissue samples by real-time PCR and identification of EHNV by conventional PCR and sequence analysis of the amplicon.

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods and testing is being undertaken that will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with EHNV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with EHNV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased fish (multiple species) from disease outbreaks and experimental infections	Pool of kidney, liver and spleen from individual fish	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>), river blackfish (<i>Gadopsis marmoratus</i>), golden perch (<i>Macquaria ambigua</i>), trout cod (<i>Maccullochella macquariensis</i>), freshwater catfish (<i>Tandanus tandanus</i>), Macquarie perch (<i>Macquaria australasica</i>) rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	94.3%* (n= 105)	100% (n= 441)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Jaramillo <i>et al.</i> , (2012)
Real-time PCR	Diagnosis	Clinically diseased fish (multiple species) from disease outbreaks and	Pool of kidney, liver and spleen from individual fish	European perch (<i>Perca fluviatilis</i>), river blackfish (<i>Gadopsis marmoratus</i>), golden perch (<i>Macquaria ambigua</i>), trout cod (<i>Maccullochella macquariensis</i>), freshwater catfish (<i>Tandanus tandanus</i>),	95%* (n=106)	100% (n=80)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
		experimental infections		Macquarie perch (<i>Macquaria australasica</i>) rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)				

DSe: = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study; PCR: = polymerase chain reaction. Note: these assays detect multiple ranaviruses in addition to EHNV that infect amphibian hosts. *A positive result requires characterisation using sequencing to confirm that the result indicates the presence of EHNV.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals: not available

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity, qPCR: = real-time polymerase chain reaction.

7. References

- AHNE W., BEARZOTTI M., BREMONT M. & ESSBAUER S. (1998). Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med. [B]*, **45**, 373–383.
- AHNE W., OGAWA M. & SCHLOTFELDT H.J. (1990). Fish viruses: transmission and pathogenicity of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus isolated from sheatfish *Silurus glanis*. *J. Vet. Med. [B]*, **37**, 187–190.
- AHNE W., SCHLOTFELDT H.J. & THOMSEN I. (1989). Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*). *J. Vet. Med. [B]*, **36**, 333–336.
- ARIEL E. & BANG JENSEN B. (2009). Challenge studies of European stocks of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with epizootic haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **32**, 1017–1025.
- Ariel E, Holopainen R, Olenen NJ & Tapiovaara H (2010). Comparative study of ranavirus isolates from cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. Archives of Virology **155**, 1261-1271
- ARIEL E., NICOLAJSSEN N., CHRISTOPHERSEN M.-B., HOLOPAINEN R., TAPIOVAARA H. & BANG JENSEN B. (2009). Propagation and isolation of ranaviruses in cell culture. *Aquaculture*, **294**, 159–164.
- BECKER J.A., TWEEDIE A., GILLIGAN D., ASMUS M. & WHITTINGTON R. J. (2016). Susceptibility of Australian Redfin Perch *Perca fluviatilis* Experimentally Challenged with Epizootic Hematopoietic Necrosis Virus (EHNV). *J. Aquat. Anim. Health*, **28**, 122–130.
- BLOCH B. & LARSEN J.L. (1993). An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **15**, 235–240.
- BRYAN L.K., BALDWIN C.A., GRAY M.J. & MILLER D.L. (2009). Efficacy of select disinfectants at inactivating Ranavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **84**, 89–94.
- CHINCHAR V.G. (2002). Ranaviruses (family Iridoviridae): emerging cold-blooded killers – brief review. *Arch. Virol.*, **147**, 447–470.
- CHINCHAR G., ESSBAUER S., HE J.G., HYATT A., MIYAZAKI T., SELIGY V. & WILLIAMS T. (2005). Family Iridoviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, 145–161.
- CINKOVA K., RESCHOVA S., KULICH P. & VESELY T. (2010). Evaluation of a polyclonal antibody for the detection and identification of ranaviruses from freshwater fish and amphibians. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 191–198.
- CRANE M.S.J., YOUNG J. & WILLIAMS L. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.

DRURY S.E.N., GOUGH R.E. & CALVERT I. (2002). Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, **150**, 451–452.

FIJAN N., MATASIN Z., PETRINEC Z., VALPOTIC I. & ZWILLENBERG L.O. (1991). Isolation of an iridovirus-like agent from the green frog (*Rana esculenta* L.). *Veterinarski Arhiv*, **61**, 151–158.

HEDRICK R.P., McDOWELL T.S., AHNE W., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **13**, 203–209.

HOLOPAINEN R., HONKANEN J., JENSEN B.B., ARIEL E. & TAPIOVAARA H. (2011). Quantitation of ranaviruses in cell culture and tissue samples. *J. Virol. Methods*, **171**, 225–233.

HOLOPAINEN R., OHLEMAYER S., SCHÜTZE H., BERGMANN S.M. & TAPIOVAARA H. (2009). Ranavirus phylogeny and differentiation based on major capsid protein, DNA polymerase and neurofilament triplet H1-like protein genes. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 81–91.

HYATT A.D., GOULD A.R., ZUPANOVIC Z., CUNNINGHAM A.A., HENGSTBERGER S., WHITTINGTON R.J., KATTENBELT J. & COUPAR B.E.H. (2000). Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.*, **145**, 301–331.

HYATT A.D., WILLIAMSON M., COUPAR B.E.H., MIDDLETON D., HENGSTBERGER S.G., GOULD A.R., SELLECK P., WISE T.G., KATTENBELT J., CUNNINGHAM A.A. & LEE J. (2002). First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildl. Dis.*, **38**, 239–252.

JARAMILLO D., TWEEDE A., BECKER J.A., HYATT A., CRAMERI S. & WHITTINGTON R.J. (2012). A validated quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of ranaviruses (Family Iridoviridae) in fish tissue and cell cultures, using EHNV as a model. *Aquaculture*, **356–357**, 186–192.

LANGDON J.S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.*, **12**, 295–310.

LANGDON J.S. & HUMPHREY J.D. (1987). Epizootic Hematopoietic Necrosis a New Viral Disease in Redfin Perch *Perca fluviatilis* L. in Australia. *J. Fish Dis.*, **10**, 289–298.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D. & WILLIAMS L.M. (1988). Outbreaks of an EHNV-like iridovirus in cultured rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Australia. *J. Fish Dis.*, **11**, 93–96.

LANGDON J.S., HUMPHREY J.D., WILLIAMS L.M., HYATT A.D. & WESTBURY H.A. (1986). First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.*, **9**, 263–268.

MAO J., THAM T.N., GENTRY G.A., AUBERTIN A. & CHINCHAR V.G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology*, **216**, 431–436.

MAO J.H., HEDRICK R.P. & CHINCHAR V.G. (1997). Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology*, **229**, 212–220.

MARSH I.B., WHITTINGTON R.J., O'ROURKE B., HYATT A.D. & CHISHOLM O. (2002). Rapid differentiation of Australian, European and American ranaviruses based on variation in major capsid protein gene sequence. *Molec. Cell. Probes*, **16**, 137–151.

PALLISTER J., GOULD A., HARRISON D., HYATT A., JANCOVICH J. & HEINE H. (2007). Development of real-time PCR assays for the detection and differentiation of Australian and European ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **30**, 427–438.

POZET F., MORAND M., MOUSSA A., TORHY C. & DE KINKELIN P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 35–42.

REDDACLIFF L.A. & WHITTINGTON R.J. (1996). Pathology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) and redfin perch (*Perca fluviatilis* L.). *J. Comp. Pathol.*, **115**, 103–115.

RIMMER A.E., BECKER J.A., TWEEDE A. & WHITTINGTON R.J. (2012). Validation of high throughput methods for tissue disruption and nucleic acid extraction for ranaviruses (family Iridoviridae). *Aquaculture*, **338–341**, 23–28.

SPEARE R. & SMITH J.R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **14**, 51–57.

STILWELL N.K., WHITTINGTON R.J., HICK P.M., BECKER J.A., ARIEL E., VAN BEURDEN S., VENDRAMIN N., OLESEN N.J. & WALTZEKT.B. (2018). Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR for the detection of ranaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, **128**, 105–116.

WHITTINGTON R.J., BECKER J.A. & DENNIS M.M. (2010). Iridovirus infections in finfish – critical review with emphasis on ranaviruses. *J. Fish Dis.*, **33**, 95–122.

WHITTINGTON R.J., KEARNS C., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & RUTZOU T. (1996). Spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch (*Perca fluviatilis*) in southern Australia. *Aust. Vet. J.*, **73**, 112–114.

WHITTINGTON R.J., PHILBEY A., REDDACLIFF G.L. & MACGOWN A.R. (1994). Epidemiology of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) infection in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): findings based on virus isolation, antigen capture ELISA and serology. *J. Fish Dis.*, **17**, 205–218.

WHITTINGTON R.J. & REDDACLIFF G.L. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.*, **72**, 421–424.

WHITTINGTON R.J., REDDACLIFF L.A., MARSH I., KEARNS C., ZUPANOVIC Z. & CALLINAN R.B. (1999). Further observations on the epidemiology and spread of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in southeastern Australia and a recommended sampling strategy for surveillance. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 125–130.

WHITTINGTON R.J. & STEINER K.A. (1993). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): improved ELISA for detection in fish tissues and cell cultures and an efficient method for release of antigen from tissues. *J. Virol. Methods*, **43**, 205–220.

WOLF K., BULLOCK G.L., DUNBAR C.E. & QUIMBY M.C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.*, **118**, 253–262.

ZUPANOVIC Z., MUSSO C., LOPEZ G., LOURIERO C.L., HYATT A.D., HENGSTBERGER S. & ROBINSON A.J. (1998). Isolation and characterisation of iridoviruses from the giant toad *Bufo marinus* in Venezuela. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 1–9.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for infection with epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with EHNV.

The OIE Reference Laboratory can supply purified EHNV DNA, heat killed EHNV antigen and polyclonal antibodies against EHNV together with technical methods.

A fee is charged for the reagents to cover the costs of operating the laboratory.

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS EPIZOOTIC HAEMATOPOIETIC NECROSIS; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

[Retour à l'ordre du jour](#)

CHAPTER 2.3.7.

INFECTION WITH RED SEA BREAM IRIDOVIRUS**1. Scope**

Infection with red sea bream iridovirus is considered to be infection with the pathogenic agent red sea bream iridovirus (RSIV) of the genus *Megalocytivirus*, Family *Iridoviridae*.

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

The pathogen is an icosahedral virion 140–200 nm in diameter consisting of a central electron-dense core (120 nm) and an electron translucent zone (Inouye *et al.*, 1992) with a double-stranded DNA genome of approximately 110 kbp in length (Kawato *et al.*, 2017a). The viral genome has a G+C % content of 53–55%, containing about 120 potential open reading frames (ORFs).

Phylogenetic analyses using major capsid protein (MCP) and ATPase genes shows that the viruses causing the similar clinical signs can be divided into three different genotypes: RSIV, infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) (He *et al.*, 2000; 2001), and turbot reddish body iridovirus (TRBIV) genotype (Shi *et al.*, 2004; 2010).

The aetiological agent of infection with RSIV is RSIV (Inouye *et al.*, 1992; Jeong *et al.*, 2003) and other strains belonging in the RSIV genotype (Go *et al.*, 2016; Koda *et al.*, 2018; Kurita & Nakajima, 2012). Similar diseases with the characteristic, enlarged basophilic cells within infected organs, typical of infections with megalocytiviruses, classified into the ISKNV genotype and TRBIV genotypes are excluded from this chapter. Scale drop disease virus is another virus in the genus *Megalocytivirus* causing different clinical signs in Asian seabass, *Lates calcarifer* (Groof *et al.*, 2015). RSIV genotypes are differentiated from ISKNV and TRBIV genotypes based on nucleotide sequence analysis which is required for confirmatory diagnosis. Scale drop disease virus is another virus in the genus *Megalocytivirus* causing different clinical signs in Asian seabass, *Lates calcarifer* (Groof *et al.*, 2015).

RSIV was first found in red sea bream, *Pagrus major*, from which the virus name (RSIV) is derived (Inouye *et al.*, 1992). As RSIV has a broad host range as shown in Section 2.2.1. Susceptible host species, many viruses that can be classified into the RSIV genotype are synonyms of RSIV and defined to be the aetiological agents in this chapter, e.g. rock bream iridovirus (RBIV) (Do *et al.*, 2004; Jung & Oh 2000), Taiwan grouper iridovirus (TGIV) (Chou *et al.*, 1998), large yellow croaker iridovirus (LYCIV) (Chen *et al.*, 2003), orange-spotted grouper iridovirus (OSGIV) (Lu *et al.*, 2005), spotted knifejaw iridovirus (SKIV) (Dong *et al.*, 2010), and giant seaperch iridovirus (GSIV) (Wen & Hong, 2016) and pompano iridovirus (PIV) (Lopez-Porras *et al.*, 2018).

2.1.2. Survival and stability inside the host tissues

Unknown

2.1.3. Survival and stability outside the host

Unknown

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors**2.2.1. Susceptible host species**

In the case of infection RSIV: Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with RSIV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) are:

Family	Scientific name	Common name
Carangidae	<i>Pseudocaranx dentex</i>	striped jack
	<i>Seriola dumerili</i>	greater amberjack
	<i>Seriola lalandi</i>	yellowtail amberjack
	<i>Seriola lalandi</i> × <i>Seriola quinqueradiata</i>	hybrid of yellowtail amberjack and Japanese amberjack
	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Japanese amberjack
	<i>Trachinotus blochii</i>	snubnose pompano
	<i>Trachurus japonicus</i>	<u>Japanese jack mackerel</u>
Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>	largemouth bass
Centropomidae	<i>Lates calcarifer</i>	barramundi or sea bass
Haemulidae	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	chicken grunt
	<i>Plectorhinchus cinctus</i>	crescent sweetlips
	<i>Trachurus japonicus</i>	<u>Japanese jack mackerel</u>
Kyphosidae	<i>Girella punctata</i>	largescale blackfish
Lateolabracidae	<i>Lateolabrax japonicas japonicus</i>	Japanese sea perch
	<i>Lateolabrax</i> sp.	
Lethrinidae	<i>Lethrinus haematopterus</i>	Chinese emperor
	<i>Lethrinus nebulosus</i>	spangled emperor
Moronidae	<i>Morone saxatilis</i> × <i>M. chrysops</i>	hybrid of striped sea bass and white bass
Oplegnathidae	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	Japanese parrotfish
Paralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	bastard halibut
Pleuronectidae	<i>Verasper variegatus</i>	spotted halibut
Rachycentridae	<i>Rachycentron canadum</i>	cobia
Sciaenidae	<i>Pseudosciaena crocea</i>	croceine croaker
Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	chub mackerel
	<i>Scomberomorus niphonius</i>	Japanese Spanish mackerel
	<i>Thunnus thynnus</i>	northern bluefin tuna
Sebastidae	<i>Sebastes schlegeli</i>	rockfish
Serranidae	<i>Epinephelus akaara</i>	Hong Kong grouper
	<i>Epinephelus awoara</i>	yellow grouper
	<i>Epinephelus bruneus</i>	longtooth grouper
	<i>Epinephelus coioides</i>	orange-spotted grouper
	<i>Epinephelus fuscoguttatus</i>	brown-marbled grouper
	<i>Epinephelus lanceolatus</i>	giant grouper
	<i>Epinephelus malabaricus</i>	Malabar grouper
	<i>Epinephelus septemfasciatus</i>	convict grouper
	<i>Epinephelus tauvina</i>	greasy grouper
	<i>Oplegnathus punctatus</i>	spotted knifejaw
Sparidae	<i>Acanthopagrus latus</i>	yellowfin sea bream
	<i>Acanthopagrus schlegeli</i>	black porgy
	<i>Evynnis japonica</i>	crimson sea bream
	<i>Pagrus major</i>	red sea bream
Tetraodontidae	<i>Takifugu rubripes</i>	torafugu

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with (RSIV) according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: Under study.

2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Juvenile through to adult stages are susceptible; however, the susceptibility of juveniles is generally higher than adults. Fish belonging to the genus *Oplegnathus* may be more susceptible than others.

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Infected cells are observed in the spleen, kidney, heart, liver, intestine and gill and other organs.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Unknown

2.2.6. Vectors

Unknown

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Depending on host fish species, fish size, fish age, water temperature, and other culture conditions, mortality rates range between 0% and 100%. Morbidity is unknown.

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Affected fish become lethargic and show abnormal and conspicuous respiratory movements.

2.3.3. Gross pathology

Fish exhibit severe anaemia, petechiae in the gills, and enlargement of the spleen and kidney.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

The principal mode of transmission of RSIV is horizontal via the water. Vertical transmission of RSIV has not yet been investigated.

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks have been seen mostly in the summer season at water temperatures of 25°C and above.

2.3.6. Geographical distribution

The first outbreak was recorded in marine cultured red sea bream in Japan Asia in 1990. From then on, further outbreaks and infections have been reported in many marine fish and freshwater fish in many countries. The international trade of ornamental fish has contributed significantly to the spread of megaloeytiviruses (Johan & Zainathan, 2020).

See OIE WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

Effectiveness of a vaccine consisting of formalin-inactivated supernatant from RSIV-infected GF cell culture has been confirmed experimentally and in field trials (Nakajima *et al.*, 1997; 1999). Currently, the formalin-inactivated vaccine for infection with RSIV is commercially available for red sea bream (*Pagrus major*), striped jack (*Pseudocaranx dentex*), Malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*), orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) and other fish species belonging to the genus *Seriola* in Japan. Protection of fish belonging to the genus *Oplegnathus* by vaccination is difficult.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Not available.

2.4.3. Immunostimulation

Not applicable.

2.4.4. Breeding resistant strains

An RSIV-resistant strain of red sea bream (*Pagrus major*) has been developed using marker-assisted selection combined with DNA-based family selection (Sawayama *et al.*, 2019).

2.4.5. Inactivation methods

RSIV is inactivated at 56°C for 30 minutes and by treatment with either ether, chloroform or formalin (0.1%), and by exposure to pH 3.0. The virus is stable in tissue at -80°C and at pH 7.0 and pH 11.0 (Nakajima & Sorimachi, 1994).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Unknown

2.4.7. General husbandry

Not available.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This section draws on information in 2.2, 2.3 and 2.4 to identify populations, individuals and samples which are most likely to be infected.

3.1. Selection of populations and individual specimens

Clinical inspections should be carried out during a period when water temperature is conducive to development of clinical disease (see Section 2.3.5). All production units (ponds, tanks, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows:

- i) The most susceptible species should be sampled preferentially (see Section 2.2.3). Other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample lots or populations with a history of abnormal mortality, potential exposure events or where there is evidence of poor water quality or husbandry. If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.
- iii) If weak, abnormally behaving or freshly dead fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present (e.g. during surveillance of apparently healthy populations), the fish selected should include normal appearing, healthy fish collected in such a way that all parts of the farm as well as all year classes are proportionally represented in the sample. Smaller fish may be more appropriate because infection with RSIV can cause higher mortality in juvenile or yearling fish. However, adult fish are also susceptible to RSIV infection as the viral genome has been detected from apparently healthy broodstock. Infection with RSIV has not been reported in hatchery fish.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with RSIV should be collected. Ideally fish should be collected while alive, however recently dead fish can also be selected for diagnostic testing. It should be noted, however, that there will be a significant risk of contamination with environmental bacteria if the animals have been dead for some time.

3.2. Selection of organs or tissues

Although gill and visceral organs such as spleen, heart, kidney, liver and intestine can be used, it is recommended to sample spleen or kidney tissues; spleen is the most appropriate organ for the preparation of imprints for use in the IFAT. For surveillance of apparently healthy populations, spleen or kidney should be sampled.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Fish carcasses showing advanced signs of tissue decomposition are not suitable for testing by any method.

Use of inappropriate fixatives (where required), poor sample quality, inappropriate tissues and lack of information provided with the submission may render samples unsuitable for testing.

3.4. Non-lethal sampling

Not available.

3.5. Preservation of samples for submission

Store fish samples at 4°C for use within 24 hours (or at -80°C for longer periods [up to a few years] for the purposes of molecular detection methods).

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.3.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

The success of pathogen isolation depends strongly on the quality of samples (which will be affected by time since collection and time in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. To avoid degradation of samples, use alternate storage methods only after consultation with the receiving laboratory.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

~~Tissue samples for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 10:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen. Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.2.5 of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish)~~

3.5.3. Fixed samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation

~~Tissue samples for histopathology should be fixed immediately after collection. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. Standard sample collection, preservation and processing methods for histological techniques can be found in Section 2.2 of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish).~~

3.5.4. Samples for other tests

Not applicable.

3.6. Pooling of samples

Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where robust supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity have been evaluated and found to be suitable. If the effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, larger fish should be processed and tested individually. Small life stages such as fry or specimens can be pooled to provide the minimum amount of material needed for testing. If pooling is used, it is recommended to pool organ pieces from a maximum of five fish.

4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection-pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

The designations used in the Table indicate:

Ratings against for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to

application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability, cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

Key:

- +++ = Most suitable—Methods are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Suitable Method(s) are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Less suitable—Methods are suitable, but performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities, repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes, detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis ¹ of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV	Early life stages ²	Juveniles ²	Adults	LV
Tissue imprints	+	+	+	1	+	+	+	1				
Histopathology	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	1
IFAT or ICC	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Cytopathology												
Cell culture	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Real-time PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	2
Conventional PCR ³	++	++	++	2	++	++	++	2	+++	+++	+++	2
Amplicon sequencing									+++	+++	+++	NA
In-situ hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods ⁴												
Other serological method ⁴												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2), NA = not available; IFAT = Indirect fluorescent antibody test. ICC = Immunocytochemistry PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; Ab- or Ag-ELISA = antibody or antigen enzyme-linked immunosorbent assay, respectively;

¹For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). ²Susceptibility of early and juvenile life stages is described in Section 2.2.3.

³Conventional PCR alone does not meet the case definition of a confirmed case but must be followed by amplicon sequencing. ⁴Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

4.1. Tissue imprints

Samples to be tested include tissue imprints of spleen from affected fish. Use a tissue imprint of spleen from known uninfected fish as a negative control and if possible, use a tissue imprint of spleen from confirmed RSIV-infected fish as a positive control.

- i) Bleed the fish thoroughly.
- ii) Make spleen imprints on cleaned glass microscope slides.
- iii) Store the spleen pieces at 4°C together with the other organs that may be required for virus isolation or PCR tests later.
- iv) Allow the imprints to air-dry for 20 minutes.
- v) Fix the imprints with cold acetone.
- vi) Stain with Giemsa or Diff-Quik.
- vii) Mount the microscope slides with cover-slips using a drop of mounting fluid.
- viii) Examine under light microscopy using ×40–100 magnification.

A presumptive positive result is indicated by the presence of abnormally enlarged cells. Negative control slides should not exhibit any abnormally enlarged cells. If enlarged cells are observed in the test samples, identification procedures PCR followed by amplicon sequencing must be undertaken immediately.

4.2. Histopathology and cytopathology

Examination of histological sections from diseased fish may reveal abnormally enlarged cells from the spleen, heart, kidney, liver, intestine or gill. These enlarged cells react to anti-RSIV MAb M10 (4.9.1.) using an immunohistochemistry test (Bermudez *et al.*, 2018). However, this method is not yet fully validated.

4.3. Cell culture for isolation

Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

Isolation of RSIV (and ISKNV) is undertaken using the Grunt fin (GF) cell line⁹ or SKF-9 cell line (Kawato *et al.*, 2017b); ~~isolation of the viruses from freshwater fish such as gourami is difficult~~. Spleen and/or kidney tissues from diseased fish are suitable samples. Cells should be grown in Eagle's basal medium (BME) for GF cell line and Hank's minimum essential medium (HMEM) for SKF-9 cell line, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 25°C in a temperature-controlled incubator. A virus isolate to be used as positive control can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV. Use uninfected cells as negative control. Following development of viral cytopathic effect (CPE), virus identification would be undertaken using conventional PCR and sequencing. SKF-9 cell line can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV.

4.3.1. Virus isolation in cell cultures

4.3.1.1. Inoculation of cell monolayers

- i) Cell cultures (GF or SKF-9) maintained at 25°C and passaged at 7–14 day intervals should be used for virus isolation to ensure virus susceptibility. Prepare cell monolayers in 25 cm² flask, 6-well, 24-well, or 96-well plates according to the purpose and sample size on the day before sample inoculation.
- ii) Following the virus isolation procedure described in Chapter 2.3.0 *General information* (on diseases of fish), Section A.2.3.2, make an additional tenfold dilution of the 1/10 spleen homogenate supernatants and transfer an appropriate volume of each of the two dilutions onto the cell monolayers. To avoid cytotoxic effect (CTE), final concentration of the organ in the cultured medium should be less than 1% w/v.
- iii) Without withdrawing the inoculum, incubate at 25°C.

4.3.1.2. Monitoring incubation

- i) Follow the course of infection in positive controls and other inoculated cell cultures by daily microscopic examination at ×40–100 magnification for 10 days. The use of a phase-contrast microscope is recommended.
- ii) If CPE appears in those cell cultures inoculated with dilutions of the test homogenates, identification procedures by PCR followed by amplicon sequence analysis must be undertaken immediately.

⁹ European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) Catalogue No. 88010601; www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=88010601&collection=ecacc_gc

- iii) If no CPE develops in the inoculated cultures (despite normal progression of CPE in the positive controls cultures) after 10 days incubation, the inoculated cultures should be subcultured and incubated for a further 7 days. Should the virus control fail to develop CPE, the process should be repeated with fresh susceptible cells and new batches of samples.

4.3.1.3. Subcultivation procedure

- i) Collect aliquots of cell culture medium from all monolayers inoculated with dilutions of each supernatant of the test homogenates.
- ii) Inoculate cell monolayers as described above (Section 4.3.1.1 Inoculation of cell monolayers, steps i and ii).
- iii) Incubate and monitor as described above (Section 4.3.1.1 Inoculation of cell monolayers, steps ii and iii and Section 4.3.1.2 Monitoring incubation steps i and ii).

If no CPE occurs, the test may be declared negative.

4.4. Nucleic acid amplification

See Chapter 2.3.0 *General information* (on diseases of fish), Section B.2.5 for information on the use of molecular techniques for virus identification. Both real-time PCR and conventional PCR tests are available for RSIV identification. Samples to be tested include spleen from affected fish or supernatants from cell cultures that have developed CPE. The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control. Use extracted DNA from the spleen and kidney of uninfected fish or extracted DNA from the supernatant of an uninfected cell culture as the negative control. Use extracted DNA from the spleen of confirmed RSIV-infected fish or extracted DNA from the supernatant of an infected cell culture or Viral DNA or plasmid in which target sequence is inserted as the positive control. Select controls depending on the kinds of samples to be tested.

Tissue samples can be homogenised by manual pestle grinding or by bead-beating. Commercially available nucleic acid extraction kits may be used to extract DNA directly from tissues, from tissue homogenates and cell culture supernatants according to the manufacturer's instructions. A negative extraction control, consisting of extraction reagents only, is included when test samples are extracted. Use a pre-confirmed RSIV-affected organ or supernatant from RSIV-infected cell cultures as positive controls. Use organs from healthy fish or supernatants from non-infected cell cultures as negative controls

N.B. Viral DNA or a plasmid in which the PCR target sequence is inserted that can be used as the positive control can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV.

4.4.1. Real-time PCR

Several real-time PCR assays available for detection of RSIV have been evaluated (Kawato *et al.*, 2021). Two probe-based real-time PCR assays, designated as the Mohr *et al.* assay (Mohr *et al.*, 2015) and the Cummins assay, were deemed equivalent to each other and superior to the other tests evaluated in this study. The primer sets and probes of each of these two assays are designed to detect a major capsid protein (MCP) gene sequence and are as follows:

- i) Mohr real-time PCR

RSIV RT F: 5'-TGA-CCA-GCG-AGT-TCC-TTG-ACT-T-3'

RSIV RT R: 5'-CAT-AGT-CTG-ACC-GTT-GGT-GAT-ACC-3'

RSIV Probe: 5'-FAM-AAC-GCC-TGC-ATG-ATG-CCT-GGC-TAMRA-3'

- ii) Cummins real-time PCR

AFDL Megalo F: 5'-GGC-GAC-TAC-CTC-ATT-AAT-GTG-3'

AFDL Megalo R: 5'-CAC-CAG-GTC-GTT-AAA-TGA-CA-3'

AFDL Megalo Pr: 5'-FAM-CTG-CGT-GTT-AAG-ATC-CCC-TCC-A-TAMRA-3'

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory for RSIV is as follows: Template (2 µl) is added to 23 µl reaction mixture containing 12.5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 900 nM for each primer, 250 nM for probe, and molecular grade water. After 1 cycle of 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, amplification consists of 45 cycles of 95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds.

The detection sensitivity limits of both real-time PCRs are approximately 1-10 copies/µl template DNA which is higher than that of conventional PCR. However, since the real-time PCRs have cross-reactivity to the ISKNV and TRBIV genotypes, conventional PCR followed by amplicon sequence analysis (see Section 4.5.) is required for confirmatory diagnosis.

4.4.2. Conventional PCR

The conventional PCR primer set consisting of the forward primer 1-F (5'-CTC-AAA-CAC-TCT-GGC-TCA-TC-3') and reverse primer 1-R (5'-GCA-CCA-ACA-CAT-CTC-CTA-TC-3') is used for amplification of a 570 base region of the genome sequence across two ORFs (Kurita *et al.*, 1998). Primer set 4-F (5'-CGG-GGG-CAA-TGA-CGA-CTA-CA-3') and 4-R (5'-CCG-CCT-GTG-CCT-TTT-CTG-GA-3') also has adequate sensitivity for RSIV, and generates an amplicon of 568 bases, but it cannot be used to amplify ISKNV DNA (Kurita *et al.*, 1998). The reactivity of these primer sets against TRBIV has not yet been confirmed

The protocol in use at the OIE Reference Laboratory for RSIV, based on Kurita *et al.*, (1998), is as follows: Template (1 µl) is added to 19 µl reaction mixture containing 2 µl 10× reaction buffer, 1.6 µl dNTP mixture (2.5 mM each), 0.2 µl *TaKaRa ExTaq HS* (5 U/µl) (*TaKaRa*), 1 µM each primer, and molecular grade water. After 1 cycle of 94°C for 2 minutes, PCR amplification consists of 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by final extension at 72°C for 2 minutes. Amplified DNA (567 or 570 bp) is analysed by agarose gel electrophoresis using a 1.5% agarose/TAE (Tris-acetate-EDTA) gel containing SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) or equivalent.

The detection sensitivity limit of the 1-F/1-R PCR is approximately 10-100 copies/µl template DNA. However, the primer set 1-F and 1-R is confirmed to amplify both RSIV and ISKNV DNA, and hence, amplicon sequencing is required for confirmatory diagnosis. The cross reactivity of these primer sets against TRBIV has not yet been validated.

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable

4.5. Amplicon sequencing of the amplicon

The primer set 1-F and 1-R can amplify both RSIV and ISKNV DNA and sequencing of the amplicon is required for virus identification. Amplicons should be gel-purified and sequenced using both the forward and reverse primer. Consensus sequence, generated after analysis of the quality of the sequence chromatograms, can then be compared to reference sequences, for example by BlastN search of the NCBI database.

4.6. In-situ hybridisation

Not applicable

4.7. Immunohistochemistry

Not applicable

4.8. Bioassay

Not applicable

4.9. Antibody-based or antigen detection methods

4.9.1. Antibody-based antigen detection methods: indirect fluorescent antibody test (IFAT) or immunocytochemistry (ICC)

Reagent and protocols for detecting RSIV proteins with a monoclonal antibody (MAb) M10 have been published (Kawato *et al.*, 2017b; 2020; Nakajima & Sorimachi, 1995). The MAb M10-reactive epitope has been demonstrated to be a 7 amino acid sequence (EYDCPEY) of a non-structural protein encoded by the laminin-type epidermal growth factor-like domain gene in RSIV and ISKNV (Takano *et al.*, 2019). MAb M10 detects both RSIV- and ISKNV-infected cells (Kawato *et al.*, 2020) but it does not detect ranaviruses (Nakajima & Sorimachi, 1995). The reactivity of MAb against TRBIV has not yet been confirmed. MAb M10 can be obtained from the OIE Reference Laboratory for RSIV.

Samples to be tested include tissue imprints of spleen from affected fish. Use a tissue imprint of spleen from uninfected fish as a negative control and if possible, use a tissue imprint of spleen from confirmed RSIV-infected fish as a positive control. Similarly, IFAT can be conducted directly after virus isolation in cell culture. Samples to be taken for testing include acetone-fixed infected cell monolayers that have developed CPE. Use an uninfected cell monolayer as a negative control and if possible, use a confirmed RSIV-infected cell monolayer as a positive control. The protocol for tissue imprints is as follows and can be adapted for IFAT on cell cultures.

- i) Bleed the fish thoroughly.
- ii) Make spleen imprints on cleaned glass microscope slides.
- iii) Store the spleen pieces at 4°C together with the other organs that may be required for virus isolation.
- iv) Allow the imprints to air-dry for 20 minutes.
- v) Fix the imprints with cold acetone.
- vi) Prepare a diluted solution of MAb M10 in PBS (1/100)
- vii) Treat the imprints with the MAb M10 solution for 30 minutes at 37°C in a humid chamber.
- viii) Rinse three times with PBS.
- ix) Incubate the imprints for 30 minutes at 37°C in a humid chamber with a solution of a specific anti-mouse FITC-conjugated antibody prepared according to the supplier's instructions.
- x) Rinse three times with PBS.
- xi) Mount the microscope slides with cover-slips using glycerol saline prior to microscopic observation.
- xii) Examine using a fluorescence microscope. Positive and negative controls must be found to give the expected results prior to any other observation.

A positive result is indicated by the presence of abnormally enlarged cells with strong fluorescence. Negative control slides should not exhibit any strong fluorescence.

If the test is positive, the fish from which the samples were obtained is considered infected with RSIV or ISKNV.

Alternatively, a peroxide-conjugated second antibody could be used rather than fluorescence conjugate.

4.10. Other methods

RSIV cannot be identified by neutralisation tests as the antisera generated by the immunisation of rabbits have few neutralising antibodies.

5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations

As indicated in Table 4.1, real-time PCR is the most appropriate method of screening healthy fish populations for RSIV; however, the available methods are not specific for RSIV. Any real-time positive samples should be tested by conventional PCR followed by amplicon sequence analysis to distinguish megalocytiviruses.

6. Corroborative diagnostic criteria

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1.) or in the presence of clinical signs (Section 6.2.) but does not evaluate whether the infectious agent is the cause of the clinical event.

The case definitions for a suspect and confirmed case have been developed to support decision making related to trade and confirmation of disease status at the country, zone or compartment level. Case definitions for disease confirmation in endemically affected areas may be less stringent. It is recommended that all samples that yield suspect positive test results in an otherwise pathogen-free country or zone or compartment should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory does not have the capacity to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate OIE reference laboratory.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹⁰

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographic proximity to, or movement of animals or animal products or equipment, etc., from a known infected population equate to an epidemiological link. Alternatively, healthy populations are sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with RSIV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time or conventional PCR
- ii) ~~Cyto- or Histopathological changes consistent with infection with RSIV infection or disease~~
- iii) Cytopathic effect in cell culture
- iv) Positive result from IFAT-~~or~~ ICC

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with RSIV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by a recommended molecular or antigen detection test with confirmation by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV
- ii) ~~Cyto- or Histopathological changes consistent with the presence of infection with RSIV the pathogen or the disease with confirmation by~~ and conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV
- iii) Cytopathic effect in cell culture with ~~confirmation identification of RSIV by~~ conventional PCR and sequence analysis, ~~with sequence consistent with RSIV~~

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods. Positive test results will result in notification to the OIE.

6.2 Clinically affected animals

Clinical signs (see Section 2.3.2) are not pathognomonic for a single disease; however they may narrow the range of possible diagnoses.

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with RSIV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Presence of gross pathology or clinical signs associated with infection with RSIV disease-as described in this chapter, with or without elevated mortality
- ii) ~~Cyto- or Histopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease-infection with RSIV~~

¹⁰ For example transboundary commodities.

- iii) Positive result from IFAT or IGG
- iv) Cytopathic effect typical for RSIV infection in cell culture
- v) Positive result by real-time PCR or conventional PCR

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with RSIV is considered to be confirmed if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by a recommended antigen detection test ~~with confirmation by and a positive result by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV~~
- ii) Cyto- or histopathological changes consistent with ~~the presence of the pathogen or the disease within infection with RSIV and confirmation a positive result by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV~~
- iii) Cytopathic effect in cell culture with ~~confirmation identification of RSIV by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV~~
- iv) Positive ~~result by real-time PCR test and positive result by with confirmation by conventional PCR and sequence analysis, with sequence consistent with RSIV~~

Reference Laboratories should be contacted for specimen referral when testing laboratories cannot undertake any of the recommended test methods. Positive test results will result in notification to the OIE.

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests [under study]

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with RSIV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with RSIV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level 2 of the validation pathway described in Chapter 1.1.2. and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

6.3.1. For presumptive diagnosis of clinically affected animals

Test type		Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity.

6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation

DSe: = diagnostic sensitivity, DS_p = diagnostic specificity.

7. References

BERMUDEZ R., LOSADA A.P., AZEVEDO A.M., GUERRA-VARELA J., PÉREZ-FERNÁNDEZ D., SÁNCHEZ L., PADRÓS F., NOWAK B. & QUIROGA M.I. (2018). First description of a natural infection with spleen and kidney necrosis virus in zebrafish. *J. Fish Dis.*, **41**, 1283–1294.

CHEN X.H., LIN K.B. & WANG X.W. (2003). Outbreaks of an iridovirus disease in maricultured large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Richardson), in China. *J. Fish Dis.*, **26**, 615–619.

CHOU H.Y., HSU C.C. & PENG T.Y. (1998). Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured grouper (*Epinephelus* sp.) in Taiwan. *Fish Pathol.*, **33**, 201–206.

de GROOT A., GUELEN L., DEIJS M., VAN DER WAL Y., MIYATA M., NG KS., VAN GRINSVEN L., SIMMELINK B., BIERMANN Y., GRISEZ L., VAN LENT J., DE RONDE A., CHANG SF., SCHRIER C., VAN DER HOEK L. (2015). A Novel Virus Causes Scale Drop Disease in Lates calcarifer. *PLoS Pathog.*, **11**(8):e1005074.

DO J.W., CHA S.J., KIM J.S., AN E.J., PARK M.S., KIM J.W., KIM Y.C., PARK M.A. & PARK J.W. (2005). Sequence variation in the gene encoding the major capsid protein of Korean fish iridoviruses. *Arch. Virol.*, **150**, 351–359.

DO J.W., MOON C.H., KIM H.J., KO M.S., KIM S.B., SON J.H., KIM J.S., AN E.J., KIM M.K., LEE S.K., HAN M.S., CHAS J., PARK M.S., PARK M.A., KIM Y.C., KIM J.W. & PARK J.W. (2004). Complete genomic DNA sequence of rock bream iridovirus. *Virology*, **325**, 351–363.

DONG C., WENG S., LUO Y., HUANG M., AI H., YIN Z. & HE J. (2010). A new megalocytivirus from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus*, and its pathogenicity to freshwater mandarinfish, *Siniperca chuatsi*. *Virus Res.*, **147**, 98–106.

GO J., WALTZEK T.B., SUBRAMANIAM K., YUN S.C., GROFF J.M., ANDERSON I.G., CHONG R., SHIRLEY I., SCHUH J.C.L., HANDLINGER J.H., TWEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2016). Detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) and turbot reddish body iridovirus (TRBIV) from archival ornamental fish samples. *Dis. Aquat. Org.*, **122**, 105–123.

HE J.G., DENG M.S., WENG P., LI Z., ZHOU S.Y., LONG Q.X., WANG X.Z. & CHANG S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139.

HE J.G., ZENG K., WENG S.P. & CHAN S.M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarinfish *Siniperca chuatsi* (Basillesky), in China. *J. Fish Dis.*, **23**, 219–222.

INOUE K., YAMANO K., MAENO Y., NAKAJIMA K., MATSUOKA M., WADA Y. & SORIMACHI M. (1992). Iridovirus infection of cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **27**, 19–27.

JEONG J.B., JUN J.L., YOO M.H., KIM M.S., KOMISAR J.L. & JEONG H.D. (2003). Characterization of the DNA nucleotide sequences in the genome of red sea bream iridoviruses isolated in Korea. *Aquaculture*, **220**, 119–133.

JOHAN C.A.C. & ZAINATHAN S.C. (2020). Megalocytiviruses in ornamental fish: A review. *Vet. World*, **13**, 2565–2577.

JUNG S.J. & OH M.J. (2000). Iridovirus-like infection associated with high mortalities of striped beakperch, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck et Schlegel), in southern coastal areas of the Korean peninsula. *J. Fish Dis.*, **23**, 223–226.

KAWATO Y., CUMMINS D.M., VALDETER S., MOHR P.G., ITO T., MIZUNO K., KAWAKAMI H., WILLIAMS L.M., CRANE M.S.J., & MOODY N.J.G. (2021). Development of new real-time PCR assays for detecting *Megalocytivirus* across multiple genotypes. *Fish Pathol.*, **56**, 177–186 (in press).

KAWATO Y., MOHR P.G., CRANE M.S.J., WILLIAMS L.M., NEAVE M.J., CUMMINS D.M., DEARNLEY M., CRAMERI S., HOLMES C., HOAD J. & MOODY N.J.G. (2020). Isolation and characterisation of an ISKNV-genotype megalocytivirus from imported angelfish *Pterophyllum scalare*. *Dis. Aquat. Org.*, **140**, 129–141.

KAWATO Y., SUBRAMANIAM K., NAKAJIMA K., WALTZEK T. & WHITTINGTON R. (2017a). Iridoviral diseases: red sea bream iridovirus and white sturgeon iridovirus. In: *Fish Viruses and Bacteria: Pathobiology and Protection*, Woo P.T.K., Cipriano, R.C., eds. CABI Publishing, Wallingford, 147–159.

KAWATO Y., YAMASHITA H., YUASA K., MIWA S. & NAKAJIMA K. (2017b). Development of a highly permissive cell line from spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*) for red sea bream iridovirus. *Aquaculture*, **473**, 291–298.

KODA S.A., SUBRAMANIAM K., FRANCIS-FLOYD R., YANONG R.P., FRASCA S. JR, GROFF J.M., POPOV V.L., FRASER W.A., YAN A., MOHAN S. & WALTZEK T.B. (2018). Phylogenomic characterization of two novel members of the genus Megalocytivirus from archived ornamental fish samples. *Dis. Aquat. Org.*, **130**, 11–24.

KURITA J. & NAKAJIMA K. (2012). Megalocytiviruses. *Viruses*, **4**, 521–538.

KURITA J., NAKAJIMA K., HIRONO I. & AOKI T. (1998). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of DNA of red sea bream iridovirus (RSIV). *Fish Pathol.*, **33**, 17–23.

LOPEZ-PORRAS A., MORALES J.A., ALVARADO G., KODA S.A., CAMUS A., SUBRAMANIAM K., WALTZEK T.B. & SOTO E. (2018). Red seabream iridovirus associated with cultured Florida pompano *Trachinotus carolinus* mortality in Central America. Dis. Aquat. Org., **130**, 109–115.

LU L., ZHOU S.Y., CHEN C., WENG S.P., CHAN S.-M. & HE J.G. (2005). Complete genome sequence analysis of an iridovirus isolated from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Virology*, **339**, 81–100.

MOHR P.G., MOODY N.J.G., WILLIAMS L.M., HOAD J., CUMMINS D.M., DAVIES K.R. & CRANE M.S.J. (2015). Molecular confirmation of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) in farmed and imported ornamental fish in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **116**, 103–110.

NAKAJIMA K., MAENO Y., HONDA A., YOKOYAMA K., TOORIYAMA T. & MANABE S. (1999). Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 73–75.

NAKAJIMA K., MAENO Y., KURITA J. & INUI Y. (1997). Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathol.*, **32**, 205–209.

NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1994). Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream, *Pagrus major*. *Fish Pathol.*, **29**, 29–33.

NAKAJIMA K. & SORIMACHI M. (1995). Production of monoclonal antibodies against red sea bream iridovirus. *Fish Pathol.*, **30**, 47–52.

SAWAYAMA E., KITAMURA S.-I., NAKAYAMA K., OHTA K., OKAMOTO H., OZAKI A. & TAKAGI M. (2019). Development of a novel RSIVD-resistant strain of red sea bream (*Pagrus major*) by marker-assisted selection combined with DNA-based family selection. *Aquaculture*, **506**, 188–192.

SHI C.Y., JIA K.T., YANG B. & HUANG J. (2010). Complete genome sequence analysis of a *Megalocytivirus* (family *Iridoviridae*) associated with turbot mortality in China. *Virol. J.*, **7**, 159.

SHI C.Y., WANG Y.G., YANG S.L., HUANG J. & WANG Q.Y. (2004). The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. *Aquaculture*, **236**, 11–25.

TAKANO T., MATSUYAMA T., KAWATO Y., SAKAI T., KURITA J., MATSUURA Y., TERASHIMA S., NAKAJIMA K. & NAKAYASU C. (2019). Identification of the epitope recognized by the anti-red sea bream iridovirus (RSIV) monoclonal antibody M10 using a phage display RSIV peptide library *Fish Pathol.*, **54**, 83–92.

WEN C.M. & HONG J.R. (2016). Complete genome sequence of a giant sea perch iridovirus in Kaohsiung, Taiwan. *Genome Announc.*, **4**, e01759–e15.

*
* *

NB: There is an OIE Reference Laboratory for red sea bream iridoviral disease
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:
<https://www.oie.int/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques / janvier et février 2022

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on
infection red sea bream iridoviral disease.

NB: FIRST ADOPTED IN 2000); MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 20XX.

[Retour à l'ordre du jour](#)

DOCUMENT D'ORIENTATION SUR L'UTILISATION DES MÉTHODES DE L'ADN ENVIRONNEMENTAL À DES FINS DE SURVEILLANCE DES MALADIES DES ANIMAUX AQUATIQUES LISTÉES DE L'OIE

Document de travail élaboré par la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE (Commission des animaux aquatiques), afin de recueillir les commentaires des Membres.

Version : 28 septembre 2021

1. Résumé

Le suivi des systèmes aquatiques en ayant recours à l'ADN environnemental (ADNe) est un domaine de recherche qui progresse rapidement et qui permettra de disposer de méthodes économiques et n'occasionnant pas de destruction pour le dépistage d'agents pathogènes, notamment ceux affectant les populations aquatiques sauvages au sein desquelles il peut être difficile ou non souhaitable de prélever des échantillons.

La Commission des animaux aquatiques est informée que les méthodes de l'ADN environnemental sont appliquées pour la détection des agents pathogènes responsables de plusieurs maladies listées par l'OIE. Ces méthodes étant disponibles et actuellement utilisées, la Commission est convenue qu'il serait souhaitable que des orientations relatives aux applications appropriées des méthodes de l'ADN environnemental et à leurs limites potentielles soient proposées.

La Commission indique que, dans la mesure où il n'existe pas d'estimations précises des performances en matière de diagnostic permettant de concevoir des programmes de surveillance ayant recours à des épreuves de l'ADN environnemental, les données obtenues par des méthodes de l'ADN environnemental ne sont pas appropriées pour étayer les déclarations d'absence de maladies listées. La confirmation des infections par des maladies listées ne peut pas non plus être effectuée en utilisant des méthodes de l'ADN environnemental car un résultat positif ne démontre pas qu'un ou des animaux hôte(s) sensible(s) est / sont infecté(s).

Les résultats positifs obtenus par des méthodes de l'ADN environnemental pourront toutefois constituer des éléments de preuve suffisants pour une suspicion d'infection, comme la présence de l'ADN/l'ARN de l'agent pathogène dans l'échantillon. Cette application des méthodes de l'ADN environnemental peut être particulièrement utile pour le suivi des animaux de haute valeur ou rares, comme solution de substitution à la collecte d'échantillons de tissus. Elle peut jouer un rôle dans la détection précoce de l'incursion d'une maladie dans des populations sauvages ou dans des circonstances où l'infection est susceptible de ne pas causer de signes cliniques observables. À la suite d'une suspicion fondée sur un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental, des échantillons collectés directement chez les animaux aquatiques doivent être analysés comme décrit dans les chapitres spécifiques à des maladies pertinents du *Manuel aquatique* - pour confirmer ou exclure le cas.

L'application de méthodes de l'ADN environnemental pour la réalisation d'un objectif précis doit être examinée avec précaution. Les méthodes doivent être choisies de façon appropriée, en prenant en considération l'ensemble des facteurs, notamment l'objectif de la surveillance, l'agent pathogène cible, la fiabilité de la méthode et l'environnement dans lequel est réalisé l'échantillonnage. Il est important que les conséquences de l'obtention de résultats positifs soient anticipées préalablement à l'application d'une méthode de l'ADN environnemental car tout résultat positif peut nécessiter la réalisation d'enquêtes impliquant un échantillonnage direct et un test de l'animal sensible afin de confirmer ou d'exclure un cas suspect. Le recours à des méthodes de l'ADN environnemental ne s'avérera pas être un choix opportun pour réaliser un certain nombre des objectifs de la surveillance des animaux aquatiques.

Le présent document a pour objectif d'étudier l'utilisation potentielle des méthodes de l'ADN environnemental dans le contexte des normes du *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (le *Code aquatique*) de l'OIE et du *Manuel aquatique* et de mettre en évidence leurs avantages et leurs limites.

L'utilisation d'une méthode de l'ADN environnemental pour la détection de *Gyrodactylus salaris* a été incluse dans le chapitre 2.3.3. du *Manuel aquatique* intitulé « Infection à *Gyrodactylus salaris* »¹¹. L'inclusion de cette méthode est en ligne avec les conclusions de ce document de travail.

2. Définitions de l'ADN environnemental

¹¹ https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.03_G_salaris.pdf

Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques / janvier et février 2022

De nombreuses définitions de l'ADN environnemental sont proposées (par exemple, Díaz-Ferguson et Moyer, 2014 ; Bass *et al.*, 2015 ; Thomsen et Willerslev, 2015). La plupart de ces définitions considèrent l'ADN environnemental comme de courts fragments d'ADN/ARN détectables, issus d'un organisme vivant et qui dérivent de composants cellulaires ou de fluides sécrétés dans les composants abiotiques du milieu environnant (c'est-à-dire l'eau, l'air, les sédiments).

Aux fins du présent document, nous définissons l'ADN environnemental comme suit : « acides nucléiques extraits de ‘véritables’ échantillons environnementaux (tels que l'eau, le sol, les sédiments, le biofilm) ». Les matériaux dérivant directement de l'hôte (tels que les fèces, les cellules mortes et le mucus) ne sont pas couverts par cette définition. Une fois extraits de l'échantillon environnemental, les fragments d'ADN environnemental cible peuvent être détectés en ayant recours à des méthodes moléculaires variées (Díaz-Ferguson et Moyer, 2014). L'ADN environnemental peut en outre faire l'objet d'un séquençage direct, sous forme de bibliothèques métagénomiques ou après amplification par PCR de régions génétiques cibles spécifiques (Bass *et al.*, 2015).

Les performances réelles de la détection de l'ADN environnemental dépendent de la collecte des échantillons et de la méthode de traitement (par exemple, le volume filtré, la présence et l'élimination des inhibiteurs de la PCR) et des processus biologiques (par exemple le taux d'excrétion, les variations temporelles) et de facteurs abiotiques (la dégradation des substances à analyser). Il est important d'évaluer ces facteurs de manière empirique, afin de pouvoir interpréter correctement les résultats. Ce n'est qu'en ayant une compréhension claire de la manière dont ces facteurs influent sur la probabilité de détection de l'agent pathogène, que la détection basée sur l'ADN environnemental peut être utilisée de manière fiable dans divers contextes (Brunner, 2020).

3. Objectifs

Ce document examine i) les avantages et ii) les limites afférents aux méthodes de détection des agents pathogènes basées sur l'ADN environnemental, iii) la validation des méthodes de l'ADN environnemental, iv) les conditions d'inclusion d'une méthode de l'ADN environnemental dans un chapitre spécifique à une maladie du *Manuel aquatique* et v) l'utilisation des éléments de preuve produits par des méthodes de l'ADN environnemental en tant que critères de diagnostic.

4. Revue des méthodes de l'ADN environnemental pour la détection des agents pathogènes des animaux aquatiques ayant fait l'objet d'une publication

Une revue de la littérature a été entreprise pour évaluer les applications des méthodes de l'ADN environnemental pour la détection et l'étude des agents pathogènes et des parasites des animaux aquatiques. Trente-trois publications traitant de l'utilisation de l'ADN environnemental pour la détection de treize agents pathogènes listés par l'OIE ont été identifiées (voir l'annexe 1, Tableau 1 pour plus de détails). Des méthodes ont été développées pour la détection des agents responsables de maladies listées par l'OIE affectant des amphibiens, des crustacés, des poissons et des mollusques. La majorité des publications portent sur la détection dans des populations d'animaux aquatiques sauvages d'agents pathogènes listés, notamment l'infection à *Aphanomyces astaci*, l'infection à *Batrachochytrium dendrobatidis*, l'infection à *B. salamandrivorans*, l'infection par les espèces du genre *Ranavirus*, l'infection par *G. salaris*.

Treize publications supplémentaires traitant d'autres agents pathogènes spécifiques (par exemple, *Microcytos mackini*), de groupes d'agents pathogènes (par exemple, ceux de poissons d'ornement) ou appliquant des méthodes de l'ADN environnemental à des domaines d'étude plus larges (par exemple, la transmission de virus aquatiques) ont été identifiées (voir annexe 1, Tableau 2 pour plus de détails).

5. Avantages afférents aux méthodes de l'ADN environnemental pour la détection des agents pathogènes des animaux aquatiques

La détection de l'ADN environnemental est un outil prometteur qui peut être utilisé à des fins de surveillance en complément de l'échantillonnage direct des animaux aquatiques. Les méthodes de l'ADN environnemental offrent certains avantages par rapport à l'échantillonnage et au dépistage directs chez les animaux aquatiques, qui comprennent, mais sans s'y limiter, les éléments suivants.

1. Les méthodes de l'ADN environnemental ne nécessitent pas la mise en œuvre de techniques d'échantillonnage des animaux aquatiques hôtes qui soient intrusives ou létales. Elles peuvent être particulièrement utiles pour les animaux aquatiques rares ou de haute valeur, ou pour les animaux sauvages chez lesquels la collecte d'échantillon est difficile (par exemple, Rusch *et al.*, 2018).

2. Les méthodes de l'ADN environnemental ne nécessitent pas de manipulation des animaux, ce qui évite le stress associé à l'obtention sans destruction d'échantillons de tissus (Brunner, 2020).
3. Le temps consacré à la collecte et au traitement des échantillons, ainsi que les coûts afférents peuvent être significativement réduits par rapport à la collecte et au traitement à l'échelle individuelle d'échantillons chez des animaux (Rusch *et al.*, 2018).
4. Étant donné que les échantillons environnementaux peuvent contenir des analytes issus de la totalité ou d'un pourcentage élevé d'une population captive cible, le nombre d'échantillons nécessaire pour détecter un agent pathogène peut être beaucoup plus faible (par rapport aux échantillons prélevés individuellement chez les animaux), même lorsque la sensibilité en matière de diagnostic de la méthode de l'ADN environnemental est faible (Brunner, 2020).
5. Un même échantillon environnemental peut faire l'objet d'analyses visant à détecter la présence d'espèces hôtes (voir par exemple Rusch *et al.*, 2018) et d'agents pathogènes multiples.
6. Les méthodes de l'ADN environnemental peuvent être utilisées pour évaluer les voies d'introduction potentielles dans les cas où l'échantillonnage des hôtes ne peut pas être réalisé (par exemple, pour les eaux de ballast).

6. Limites afférentes aux méthodes de l'ADN environnemental

Les limites relatives aux applications de la détection des agents pathogènes basée sur l'ADN environnemental comprennent, mais sans s'y limiter, les éléments suivants :

1. La quantité d'ADN d'un agent pathogène cible présent dans l'échantillon environnemental peut être très faible, en raison de la dilution dans l'environnement et de la dégradation des acides nucléiques. Cette situation peut avoir une incidence négative sur la sensibilité de l'épreuve (Brunner, 2020).
2. La concentration de l'ADN cible dans un échantillon environnemental varie en fonction de divers facteurs tels que la densité des hôtes, la prévalence et l'intensité de l'infection, la méthode d'échantillonnage (par exemple, s'agissant d'eau, le volume prélevé, la taille des pores du filtre, les conditions de stockage) et les conditions environnementales (par exemple, la quantité de matière organique). La sensibilité des méthodes de l'ADN environnemental peut par conséquent présenter des variations plus marquées, en fonction des localités, des études menées à des moments différents et des taxons cibles, que celle de l'échantillonnage et de l'analyse directs de tissus animaux (Brunner, 2020).
3. Des cadres formels sont proposés pour l'évaluation des performances en matière de diagnostic des tests utilisant des échantillons issus des animaux, mais ils n'ont pas été élaborés pour les méthodes de l'ADN environnemental. De ce fait, la conception des études visant à démontrer l'absence d'infection en ayant recours à des méthodes de l'ADN environnemental est problématique.
4. Un résultat positif pour la détection de l'ADN d'un agent pathogène cible dans un échantillon environnemental est plus susceptible de provenir d'une source de contamination non représentative de l'agent pathogène viable (par exemple, un agent pathogène inactivé présent dans produit ayant été soumis à un traitement par la chaleur) que dans les échantillons issus des animaux. Il n'indique pas non plus nécessairement qu'un animal hôte est infecté par l'agent pathogène cible.

7. Validation des méthodes de l'ADN environnemental

Il est de plus en plus probable que des décisions en matière de gestion des maladies seront prises sur la base des résultats d'études utilisant des méthodes de l'ADN environnemental. Il est donc impératif que les données générées par ces études soient fiables, défendables et respectent des normes d'assurance qualité élevées (Klymus *et al.*, 2019). La validation empirique de la détection d'agents pathogènes basée sur l'ADN environnemental doit être focalisée sur la compréhension des causes et des conséquences des variations des caractéristiques des tests en fonction des conditions d'échantillonnage ; elle nécessite une bonne compréhension de ce qui fait l'objet de l'échantillonnage/l'épreuve pour chaque agent pathogène d'intérêt.

Le chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique* décrit les principes et les méthodes de validation des épreuves de diagnostic utilisées pour les maladies infectieuses. Les recommandations de ce chapitre concernent les analyses de diagnostic des échantillons issus des animaux ; toutefois, les principes et nombre des méthodes qui y figurent sont applicables aux méthodes de l'ADN environnemental. Il est recommandé que les principes généraux et les méthodes exposés

dans le chapitre 1.1.2. soient appliqués à la validation des méthodes de l'ADN environnemental de détection des maladies listées par l'OIE, dans certains cas. Il convient de noter que le processus de collecte des échantillons, la concentration en ADN cible, l'extraction de l'ADN, la sensibilité et les indicateurs de performance doivent être définis et validés.

Des normes en matière de conception et de communication de l'information sont proposées pour les études visant à évaluer la précision du diagnostic de méthodes utilisant des échantillons issus des animaux aquatiques (par exemple, Laurin *et al.*, 2018). Nombre des considérations relatives à la conception et à la communication de l'information sont également applicables aux méthodes de l'ADN environnemental et il est recommandé que ces normes soient appliquées pour les études visant à évaluer la précision du diagnostic basé sur l'ADN environnemental.

En plus des orientations décrites ci-dessus, des considérations relatives à la conception et à la communication de l'information, spécifiques aux méthodes de l'ADN environnemental, ont été publiées (par exemple, Doyle & Uthicke, 2020 ; Goldberg *et al.*, 2016 ; Klymus *et al.*, 2019). Nombre de ces études portent sur la détection de macro-organismes et non d'agents pathogènes ; en général, les considérations sont toutefois pertinentes pour les méthodes de détection de l'ADN environnemental concernant des agents pathogènes. Ces orientations seront particulièrement utiles pour la collecte sur le terrain, le traitement et la conservation des échantillons d'ADN environnemental.

8. Exigences minimales pour l'inclusion d'une méthode de l'ADN environnemental dans le *Manuel aquatique*

Il est reconnu que la procédure de validation décrite au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique* et les normes en matière de conception et de communication de l'information décrites par Laurin *et al.*, 2018 (voir ci-dessus) ne sont pas respectées par nombre de méthodes de diagnostic figurant actuellement dans le *Manuel aquatique*. En effet, beaucoup d'épreuves figurant dans le *Manuel aquatique* peuvent être validées en se limitant au niveau 1 ou 2 de la procédure de validation décrite au chapitre 1.1.2. du *Manuel aquatique*. De ce fait, la Commission des animaux aquatiques propose que les exigences minimales de communication de l'information suivantes soient respectées pour qu'une méthode de l'ADN environnemental soit prise en considération pour une inclusion dans le *Manuel aquatique* [Adapté de Goldberg *et al.* (2016)] :

1. L'objectif ou l'application prévu de l'épreuve ou du protocole doit être clairement défini (noter que les objectifs appropriés d'utilisation des méthodes de l'ADN environnemental dans le contexte des normes de l'OIE sont examinés plus en détail dans la partie 9).
2. La description des méthodes de collecte des échantillons et des précautions mises en œuvre pour prévenir la contamination, notamment le volume collecté, le matériau du conteneur, les contrôles négatifs, le nombre de répétitions et les lieux / la profondeur de l'échantillonnage.
3. La description des méthodes utilisées pour la concentration de l'ADN/l'ARN cible (précipitation / filtration), du type de filtre (s'il y a lieu) et du lieu où est effectuée la filtration (par exemple, sur le terrain).
4. La description des conditions de conservation et de stockage des échantillons (méthode, température, durée).
5. La description du processus d'extraction de l'ADN/l'ARN, notamment les ajustements du protocole, les précautions relatives aux contaminations, les contrôles négatifs et les contrôles positifs internes.
6. La description de la méthode de détection moléculaire et de son optimisation conformément à Bustin *et al.* (2009). En outre, les épreuves doivent en outre être validées (niveau 1) dans une matrice environnementale en fonction de son objectif d'utilisation.

9. Applications potentielles des méthodes de détection de l'ADN environnemental dans les chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique*.

Les chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique* contiennent des recommandations ayant trait aux tests destinés à identifier les suspicions de cas et à confirmer la suspicion chez les animaux paraissant en bonne santé (ou dont le statut sanitaire est inconnu) et les animaux cliniquement affectés. Les populations d'animaux paraissant en bonne santé peuvent faire l'objet de suspicions, et donc être soumises à des prélèvements d'échantillons, si elles présentent un ou des liens épidémiologiques avec une population infectée. La proximité géographique avec une population réputée infectée, ou le mouvement d'animaux aquatiques, de produits issus d'animaux aquatiques ou de matériels, etc., depuis une telle population sont considérés comme des liens épidémiologiques. Par ailleurs, des populations paraissant en bonne santé sont soumises à un échantillonnage dans le cadre d'études visant à démontrer l'absence de maladie.

Les points suivants décrivent la pertinence des éléments de preuve obtenus par les méthodes de détection de l'ADN environnemental, en vue de leur inclusion en tant que critères de définition des cas dans la partie 6 des chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique*.

a) Animaux paraissant en bonne santé

i) Définition d'une suspicion de cas dans une population d'animaux paraissant en bonne santé

Utilisation pertinente en tant que critère. Un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* est considéré comme étant un élément de preuve suffisant pour être inclus en tant que critère pour une suspicion de cas sous réserve de la présence d'une espèce reconnue comme étant sensible dans l'environnement où l'échantillon a été prélevé.

ii) Définition d'une confirmation de cas chez les animaux paraissant en bonne santé

Utilisation non pertinente en tant que critère. Un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* n'est pas considéré comme étant un élément de preuve approprié pour confirmer un cas chez des animaux paraissant en bonne santé. Des méthodes utilisant des échantillons issus des animaux sont considérées comme plus pertinentes en tant que critère pour confirmer un cas. Les éléments de preuve permettant la confirmation d'un cas chez des animaux paraissant en bonne santé doivent impérativement satisfaire aux exigences de la partie 6.1.2 du chapitre spécifique à une maladie pertinent du *Manuel aquatique*. Un élément de preuve basé sur l'ADN environnemental ne sera pas inclus en tant que critère dans ladite section.

b) Animaux cliniquement affectés

i) Définition d'une suspicion de cas chez les animaux cliniquement affectés

Utilisation pertinente en tant que critère. Le prélèvement d'un échantillon environnemental pour rechercher la cause d'une maladie dans une population d'animaux cliniquement affectés n'est généralement pas recommandé, car les échantillons issus d'animaux cliniquement affectés sont plus susceptibles de permettre la détection d'un agent pathogène et sont plus appropriés pour la recherche de la maladie. Toutefois, dans certaines circonstances, une méthode de l'ADN environnemental peut permettre de détecter un agent pathogène et conduire à la reconnaissance de signes cliniques de la maladie qui n'avaient été ni observés ni associés auparavant. Dans ces circonstances, un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* est considéré comme étant un élément de preuve suffisant pour être inclus en tant que critère d'une suspicion de cas.

ii) Définition d'une confirmation de cas

Utilisation non pertinente en tant que critère. Un résultat positif obtenu par une méthode de l'ADN environnemental recommandée dans le *Manuel aquatique* ne sera pas inclus en tant que critère pour la confirmation d'un agent pathogène chez des animaux cliniquement affectés (ou des animaux paraissant en bonne santé, voir point 9.a ii ci-dessus). Tout test de l'ADN environnemental dont le résultat est positif nécessite des investigations complémentaires impliquant la collecte et l'analyse de tissus animaux, comme stipulé dans le chapitre spécifique à une maladie pertinent du *Manuel aquatique*. Les éléments de preuve permettant de confirmer un cas chez des animaux cliniquement affectés doivent satisfaire aux exigences de la partie 6.2.2. du chapitre spécifique à une maladie pertinent du *Manuel aquatique*. Un élément de preuve basé sur l'ADN environnemental ne sera pas inclus en tant que critère dans ladite partie.

10. Discussion

Les principales limites en matière d'ADN environnemental sont le manque de données de validation et de performance en matière de diagnostic, ce qui signifie que les résultats négatifs ne peuvent pas être utilisés pour démontrer l'absence de maladie et les résultats positifs nécessitent une confirmation systématique en ayant recours à des échantillons issus d'animaux (Brunner, 2020). Les avantages afférents à l'échantillonnage environnemental par rapport à l'échantillonnage d'animaux, dans certaines circonstances, impliquent que les approches de l'ADN environnemental peuvent être intégrées de manière utile dans un programme de surveillance.

Un pays ou une zone pour lequel une déclaration d'absence d'un ou plusieurs agents pathogènes spécifiques est déposée, doit avoir un système de détection précoce des incursions de la maladie en vigueur. Le signalement de la morbidité et de la mortalité par les éleveurs est un élément essentiel de ce système de détection précoce. Les

populations d'élevage ne peuvent servir de sentinelle pour les populations sauvages que si elles présentent un lien épidémiologique (par exemple, lorsqu'elles partagent les mêmes eaux). Dans le cas contraire, une surveillance active des populations sauvages est requise, car il est peu probable que la morbidité ou la mortalité soit signalée (en particulier parce que les animaux morts ou mourants sont susceptibles d'être rapidement consommés ou victimes de prédateurs). L'échantillonnage d'animaux de populations sauvages peut comporter des difficultés logistiques considérables, en particulier si les populations sont isolées, éparses ou si leur faible nombre rend l'échantillonnage occasionnant une destruction non souhaitable. Les méthodes de détection des agents pathogènes basée sur l'ADN environnemental permettent de surmonter bon nombre de ces défis liés à l'échantillonnage des animaux aquatiques sauvages (Kamoroff et Goldberg, 2017 ; Trebitz *et al.*, 2017).

L'infection par certains agents pathogènes listés, dans des conditions particulières ou chez des espèces hôtes données, ne provoquera pas systématiquement des signes cliniques détectables. Les systèmes de détection précoce qui reposent sur l'observation par les éleveurs (ou d'autres parties prenantes) de la mortalité ou de la morbidité s'avèrent inefficaces dans ces circonstances et une surveillance active est alors nécessaire. L'échantillonnage des animaux d'élevage à une fréquence élevée et à un niveau permettant de détecter une faible prévalence, comporte des difficultés logistiques considérables et leur coût peut être inacceptable. Les méthodes de l'ADN environnemental peuvent constituer une solution de substitution viable (Trujillo-González *et al.*, 2019a) pour la surveillance active des agents pathogènes qui sont susceptibles de ne pas causer de manière fiable l'expression de signes cliniques observables. Elles présentent l'avantage supplémentaire de disposer d'échantillons qui contiennent des analytes provenant d'un grand pourcentage, si ce n'est de la totalité, de la population captive. Ainsi, le nombre d'échantillons environnementaux nécessaire est relativement faible par rapport au nombre d'échantillons issus d'animaux (à condition qu'une quantité suffisante d'ADN/d'ARN puisse être extraite).

11. Conclusions

1. Les méthodes de l'ADN environnemental présentent un intérêt pour améliorer les systèmes de surveillance passive aux fins de la détection précoce, en particulier dans les cas où les conditions ne sont pas propices à l'expression clinique d'une maladie ou lorsque les populations ne sont pas soumises à une observation suffisante pour détecter la maladie clinique, si elle devait survenir.
2. Les méthodes de l'ADN environnemental peuvent être utiles pour les animaux aquatiques rares, de haute valeur ou chez lesquels la collecte d'échantillons est difficile, lorsque l'échantillonnage direct des animaux n'est pas souhaitable ou que son coût est prohibitif. Elles peuvent également présenter des avantages en termes de coûts pour les programmes de suivi des maladies dans les environnements de production.
3. Contrairement à ce qui existe pour les échantillons issus d'animaux, il n'y a actuellement aucun cadre similaire permettant d'évaluer les performances en matière de diagnostic des méthodes de l'ADN environnemental. De ce fait, un élément de preuve obtenu par des méthodes de l'ADN environnemental ne peut être utilisé pour étayer une auto-déclaration d'absence de maladie.
4. Les méthodes de l'ADN environnemental seront prises en considération en vue d'être intégrées dans les chapitres spécifiques à des maladies du *Manuel aquatique*, si des normes minimales relatives aux maladies et à la communication des informations, comme décrit dans le présent document, sont respectées.
5. Les résultats positifs obtenus avec des méthodes de l'ADN environnemental qui ont été intégrées dans le *Manuel aquatique* seront considérés comme un critère suffisant pour une suspicion de cas de maladie.
6. L'application de méthodes de l'ADN environnemental pour la réalisation d'un objectif précis doit être examinée avec précaution, en tenant compte de l'agent pathogène à détecter, de l'environnement dans lequel les échantillons sont prélevés, de la fiabilité de la méthode ainsi que des conséquences de l'obtention de résultats positifs, qui peuvent nécessiter la réalisation d'enquêtes au sein des populations d'animaux sensibles afin de confirmer ou d'exclure un cas suspect.
7. Les résultats positifs obtenus avec des méthodes de l'ADN environnemental qui ont été intégrées dans le *Manuel aquatique* ne seront pas considérés comme un critère suffisant pour une confirmation de cas de maladie, que ce soit chez des animaux paraissant en bonne santé ou des animaux cliniquement affectés.

Références bibliographiques

- ALZAYLAEE H., COLLINS R.A., RINALDI G., SHECHONGE A., NGATUNGA B., MORGAN E.R. & GENNER M.J. (2020). Schistosoma species detection by environmental DNA assays in African freshwaters. *PLOS Neglect. Trop. Dis.*, 14:e0008129.
- AUDEMARD C., REECE K.S. & BURRESON E.M. (2004). Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 6611–6618.
- BASS D., STENTIFORD G.D., LITTLEWOOD D.T.J. & HARTIKAINEN H. (2015). Diverse Applications of Environmental DNA Methods in Parasitology. *Trends in Parasitol.*, **31**, 499–513.
- BASTOS GOMES G., HUTSON K.S., DOMINGOS J.A., CHUNG C., HAYWARD S., MILLER T.L. & JERRY D.R. (2017). Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms. *Aquaculture*, **479**, 467–473.
- BASTOS GOMES G., HUTSON K.S., DOMINGOS J.A., INFANTE VILLAMIL S., HUERLIMANN R., MILLER T.L. & JERRY D.R. (2019). Parasitic protozoan interactions with bacterial microbiome in a tropical fish farm. *Aquaculture*, **502**, 196–201.
- BERNHARDT L., MYRMEL M., LILLEHAUG A., QVILLER L. & WELI S. (2020). Filtration, concentration and detection of salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt salmon (*Salmo salar*) cohabitant challenge. *Dis. Aquatic. Org.*, **144**, 61–73.
- BRANNELLY L.A., WETZEL D.P., OHMER M.E.B., ZIMMERMAN L., SAENZ V. & RICHARDS-ZAWACKI C.L. (2020). Evaluating environmental DNA as a tool for detecting an amphibian pathogen using an optimized extraction method. *Oecologia*, **194**, 267–281.
- BRUNNER J.L. (2020). Pooled samples and eDNA-based detection can facilitate the “clean trade” of aquatic animals. *Sci. Rep.*, **10**, 10280.
- BUSTIN S.A., BENES V., GARSON J.A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M.W., SHIPLEY G.L., VANDESOMPELE J. & WITTWER C.T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.*, **55**, 611–622.
- DÍAZ-FERGUSON E.E. & MOYER G.R. (2014). History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev. Biol. Trop.*, **62**, 1273–1284.
- DOYLE J. & UTHICKE S. (2020). Sensitive environmental DNA detection via lateral flow assay (dipstick) – A case study on corallivorous crown-of-thorns sea star (*Acanthaster cf. solaris*) detection. *Environ. DNA*, 1–20.
- FOSSEY F., BRANDSEGG H., SIVERTSGÅRD R., PETTERSEN O., SANDERCOCK B.K., SOLEM Ø., HINDAR K. & MO T.A. (2020). Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environ. DNA*, **2**, 53–62.
- GOLDBERG C.S., TURNER C.R., DEINER K., KLYMUS K.E., THOMSEN P.F., MURPHY M.A., SPEAR S.F., MCKEE A., OYLER-MCCANCE S.J., CORNMAN R.S., LARAMIE M.B., MAHON A.R., LANCE R.F., PILLIOD D.S., STRICKLER K.M., WAITS L.P., FREMIER A.K., TAKAHARA T., HERDER J.E. & TABERLET P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol. Evol.*, **7**, 1299–1307.
- GREGORY A., MUNRO L.A., SNOW M., URQUHART K.L., MURRAY A.G. & RAYNARD R.S. (2009). An experimental investigation on aspects of infectious salmon anaemia virus (ISAV) infection dynamics in seawater Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **32**, 481–489.
- HALL E.M., CRESPI E.J., GOLDBERG C.S. & BRUNNER J.L. (2016). Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molec. Ecol. Resour.*, **16**, :423–433.
- HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H. & OHGAKI S. (2007). Detection of koi herpesvirus DNA in river water in Japan. *J. Fish Dis.*, **30**, 59–61.
- HOLT C., FOSTER R., DANIELS C.L., VAN DER GIEZEN M., FEIST S.W., STENTIFORD G.D. & BASS D. (2018). *Halioticida noduliformans* infection in eggs of lobster (*Homarus gammarus*) reveals its generalist parasitic strategy in marine invertebrates. *J. Invertebr. Pathol.*, **154**, 109–116.
- HONJO M.N., MINAMOTO T. & KAWABATA Z. (2012). Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Vet. Microbiol.*, **155**, 183–190.
- HONJO M.N., MINAMOTO T., MATSUI K., UCHII K., YAMANAKA H., SUZUKI A.A., KOHMATSU Y., IIDA T. & KAWABATA Z. (2010). Quantification of cyprinid herpesvirus 3 in environmental water by using an external standard virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 161–168.
- HUVER J.R., KOPRIVNIKAR J., JOHNSON P.T.J. & WHYARD S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecol. Appl.*, **25**, 991–1002.

- JORGENSEN L., VON G., NIELSEN J.W., VILLADSEN M.K., VISMANN B., DALVIN S., MATHIESSEN H., MADSEN L., KANIA P.W. & BUCHMANN K. (2020). A non-lethal method for detection of *Bonamia ostreae* in flat oyster (*Ostrea edulis*) using environmental DNA. *Sci. Rep.*, **10**, 1–9.
- JULIAN J.T., GLENNEY G.W. & REES C. (2019). Evaluating observer bias and seasonal detection rates in amphibian pathogen eDNA collections by citizen scientists. *Dis. Aquat. Org.*, **134**, 15–24.
- KAMOROFF C. & GOLDBERG C.S. (2017). Using environmental DNA for early detection of amphibian chytrid fungus Batrachochytrium dendrobatidis prior to a ranid die-off. *Dis. Aquat. Org.*, **127**, 75–79.
- KLYMUS K.E., MERKES C.M., ALLISON M.J., GOLDBERG C.S., HELBING C.C., HUNTER M.E., JACKSON C.A., LANCE R.F., MANGAN A.M., MONROE E.M., PIAGGIO A.J., STOKDYK J.P., WILSON C.C. & RICHTER C.A. (2019). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environ. DNA*, 1–12.
- KONGRUENG J., YINGKAJORN M., BUNPA S., SERMWITTAYAWONG N., SINGKHAMANAN K. & VUDDHAKUL V. (2015). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in southern Thailand. *J. Fish Dis.*, **38**, 957–966.
- LAFFERTY K.D. & BEN-HORIN T. (2013). Abalone farm discharges the withering syndrome pathogen into the wild. *Front. Microbiol.*, **4**, 1–5.
- LAURIN, E., THAKUR, K.K., GARDNER, I.A., HICK, P., MOODY, N.J., CRANE, M. & ERNST, I. (2018). Design standards for experimental and field studies to evaluate diagnostic accuracy of tests for infectious diseases in aquatic animals. *J. Fish Dis.*, **41**, 729–749.
- MAHON A.R., HORTON D.J., LEARMAN D.R., NATHAN L.R. & JERDE C.L. (2018). Investigating diversity of pathogenic microbes in commercial bait trade water. *PeerJ*, **6**:e5468.
- MIAUD C., ARNAL V., POULAIN M., VALENTINI A. & DEJEAN T. (2019). eDNA increases the detectability of ranavirus infection in an alpine amphibian population. *Viruses*, **11**, 1–15.
- MOSHER B.A., HUYVAERT K.P., CHESTNUT T., KERBY J.L., MADISON J.D. & BAILEY L.L. (2017). Design- and model-based recommendations for detecting and quantifying an amphibian pathogen in environmental samples. *Ecol. Evol.*, **7**, 10952–10962.
- NATIVIDAD K.D.T., NOMURA N. & MATSUMURA M. (2008). Detection of White spot syndrome virus DNA in pond soil using a 2-step nested PCR. *J. Virol. Methods*, **149**, 28–34.
- OIDTMANN B., DIXON P., WAY K., JOINER C. & BAYLEY A.E. (2018). Risk of waterborne virus spread – review of survival of relevant fish and crustacean viruses in the aquatic environment and implications for control measures. *Rev. Aquacult.*, **10**, 641–669.
- PIERSON T.W. & HORNER A.A. (2016). Environmental DNA (eDNA) sampling for amphibian pathogens. Southeastern Partners in Amphibian and Reptile Conservation (SEPARC), Disease, Pathogens and Parasites Task Team: Information Sheet #19.
- POLINSKI M.P., MEYER G.R., LOWE G.J. & ABBOTT C.L. (2017). Seawater detection and biological assessments regarding transmission of the oyster parasite *Mikrocytos mackini* using qPCR. *Dis. Aquat. Org.*, **126**, 143–153.
- QUANG N.D., HOA P.T.P., DA T.T. & ANH P.H. (2009). Persistence of white spot syndrome virus in shrimp ponds and surrounding areas after an outbreak. *Environ. Monit. Assess.*, **156**, 69–72.
- ROBINSON C.V., UREN WEBSTER T.M., CABLE J., JAMES J. & CONSUEGRA S. (2018). Simultaneous detection of invasive signal crayfish, endangered white-clawed crayfish and the crayfish plague pathogen using environmental DNA. *Biol. Conserv.*, **222**, 241–252.
- RUSCH J.C., HANSEN H., STRAND D.A., MARKUSSEN T., HYTTERØD S. & VRÅLSTAD T. (2018). Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *Gyrodactylus salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasite. Vector.*, **11**, 333.
- RUSCH J.C., MOŽIŠOVÁ M., STRAND D.A., SVOBODOVÁ J., VRÅLSTAD T. & PETRUSEK A. (2020). Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota*, **58**, 1–32.
- SALAMA N. & RABE B. (2013). Developing models for investigating the environmental transmission of disease-causing agents within open-cage salmon aquaculture. *Aquacult. Env. Interac.*, **4**, 91–115.
- SANA S., WILLIAMS C., HARDOUIN E.A., BLAKE A., DAVISON P., PEGG J., PALEY R., ZHANG T. & ANDREOU D. (2018). Phylogenetic and environmental DNA insights into emerging aquatic parasites: implications for risk management. *Int. J. Parasitol.*, **48**, 473–481.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., STARK T., DEJEAN T., VERBRUGGHE E., HERDER J., GILBERT M., JANSE J., MARTEL A.,

- PASMANS F. & VALENTINI A. (2020). Using environmental DNA for detection of *Batrachochytrium salamandrivorans* in natural water. *Environ. DNA*, **2**, 565–571.
- STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAIVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: Direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.
- STRAND D.A., JUSSILA J., JOHNSEN S.I., VILJAMAA-DIRKS S., EDSMAN L., WIIK-NIELSEN J., VILJUGREIN H., ENGDAHL F. & VRÅLSTAD T. (2014). Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *J. Appl. Ecol.*, **51**, 544–553.
- THOMSEN P.F. & WILLERSLEV E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol. Conserv.*, **183**, 4–18.
- TREBITZ A.S., HOFFMAN J.C., DARLING J.A., PILGRIM E.M., KELLY J.R., BROWN E.A., CHADDERTON W.L., EGAN S.P., GREY E.K., HASHSHAM S.A., KLYMUS K.E., MAHON A.R., RAM J.L., SCHULTZ M.T., STEPIEN C.A. & SCHARDT J.C. (2017). Early detection monitoring for aquatic non-indigenous species: Optimizing surveillance, incorporating advanced technologies, and identifying research needs. *J. Environ. Manage.*, **202**, 299–310.
- TRUJILLO-GONZALEZ A., BECKER J.A., HUERLIMANN R., SAUNDERS R.J. & HUTSON K.S. (2019a). Can environmental DNA be used for aquatic biosecurity in the aquarium fish trade? *Biol. Invasions*, **22**, 1011–1025.
- TRUJILLO-GONZALEZ A., EDMUNDS R. C., BECKER J.A. & HUTSON K.S. (2019b). Parasite detection in the ornamental fish trade using environmental DNA. *Sci. Rep.*, **9**, 1–9.
- VILACA S.T., GRANT S.A., BEATY L., BRUNETTI C.R., CONGRAM M., MURRAY D.L., WILSON C.C. & KYLE C.J. (2020). Detection of spatiotemporal variation in ranavirus distribution using eDNA. *Environ. DNA*, **2**, 210–220.
- VRALSTAD T., STRAND D., RUSCH J., TOVERUD O., JOHNSEN S.I., TARPAI A., RASK-MOLLER P. & GJERVE A.-G. (2016). The surveillance programme for *Aphanomyces astaci* in Norway 2016. Norwegian Veterinary Institute.
- WALKER S.F., SALAS M.B., JENKINS D., GARNER T.W.J., CUNNINGHAM A.A., HYATT A.D., BOSCH J. & FISHER M.C. (2007). Environmental detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* in a temperate climate. *Dis. Aquat. Org.*, **77**, 105–112.
- WEIL S.C., BERNHARDT L.-V., QVILLER L., MYRMEL M. & LILLEHAUG A. (2021). Development and evaluation of a method for concentration and detection of salmonid alphavirus from seawater. *J. Virol. Methods*, **287**, 113990.
- WITTWER C., NOWAK C., STRAND D.A., VRÅLSTAD T., THINES M. & STOLL S. (2018a). Comparison of two water sampling approaches for eDNA-based crayfish plague detection. *Limnologica*, **70**, 1–9.
- WITTWER C., STOLL S., STRAND D., VRÅLSTAD T., NOWAK C. & THINES M. (2018b). eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia*, **807**, 87–97.

Annexe 1. Publications décrivant les méthodes de l'ADN environnemental pour les agents pathogènes des animaux aquatiques

Tableau 1. Applications des méthodes de l'ADN environnemental pour la détection des agents pathogènes des animaux aquatiques listés par l'OIE ayant fait l'objet d'une publication.

Maladie listée par l'OIE	Publications
Maladies des amphibiens	
Infection à <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Walker <i>et al.</i> , 2007 ; Pierson and Horner, 2016, Kamoroff and Goldberg, 2017 ; Mosher <i>et al.</i> , 2017 ; Julian <i>et al.</i> , 2019 ; Brannelly <i>et al.</i> , 2020
Infection à <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i>	Spitzen - van der Sluijs <i>et al.</i> , 2020 ; Brunner, 2020
Infection par les espèces du genre <i>Ranavirus</i>	Hall <i>et al.</i> , 2016 ; Pierson and Horner, 2016; Julian <i>et al.</i> , 2019 ; Miaud <i>et al.</i> , 2019 ; Vilaça <i>et al.</i> , 2020
Maladies des poissons	
Infection à <i>Gyrodactylus salaris</i>	Rusch <i>et al.</i> , 2018 ; Fossøy <i>et al.</i> , 2020
Infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon (virus présentant des délétions dans la région hautement polymorphe)	Gregory <i>et al.</i> , 2009
infection par l'herpès-virus de la carpe koï	Haramoto <i>et al.</i> , 2007 ; Honjo <i>et al.</i> , 2010 and 2012
l'infection par l'alphavirus des salmonidés (maladie du pancréas du saumon)	Bernhardt <i>et al.</i> , 2020 ; Weli <i>et al.</i> , 2021
Maladies des crustacés	
Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë	Kongrueng <i>et al.</i> , 2015
Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse)	Strand <i>et al.</i> , 2011 and 2014 ; Vrålstad <i>et al.</i> , 2016 ; Robinson <i>et al.</i> , 2018; Wittwer <i>et al.</i> , 2018a and 2018b ; Rusch <i>et al.</i> , 2020
Infection par le virus du syndrome des points blancs	Natividad <i>et al.</i> , 2008 ; Quang <i>et al.</i> , 2009
Maladies des mollusques	
Infection à <i>Bonamia ostreae</i>	Jørgensen <i>et al.</i> , 2020
Infection à <i>Perkinsus marinus</i>	Audemard <i>et al.</i> , 2004
Infection à <i>Xenohaliotis californiensis</i>	Lafferty et Ben-Horin, 2013

Tableau 2. Études portant sur l'ADN environnemental des agents pathogènes des animaux aquatiques non listés par l'OIE, ayant fait l'objet d'une publication

SUJET	PUBLICATION
Détection des parasites de poissons d'ornement	Trujillo-González <i>et al.</i> , 2019b et 2019a
Parasitologie	Bass <i>et al.</i> , 2015
Foyers de protozoaires parasites en exploitations piscicoles	Bastos Gomes <i>et al.</i> 2017 and 2019
Transmission des maladies dans les cages à saumon en eau libre	Salama and Rabe, 2013
Parasites aquatiques émergents	Sana <i>et al.</i> , 2018
Micro-organismes pathogènes dans les appâts	Mahon <i>et al.</i> , 2018
Virus d'origine aquatique	Oidtmann <i>et al.</i> , 2018
<i>Halioticida noduliformans</i> chez les homards	Holt <i>et al.</i> , 2018
<i>Microcytos mackini</i>	Polinski <i>et al.</i> , 2017
Trématode parasite <i>Ribieroia ondatrae</i>	Huver <i>et al.</i> , 2015
<i>Schistosoma</i> sp.	Alzaylaee <i>et al.</i> , 2020

[Retour à l'ordre du jour](#)

Aquatic Manual disease chapters Table 4.1. OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals: current Key for Table 4.1 with suggested edits tracked)

4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection-pathogen detection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations animals, ii) presumptive diagnosis in clinically affected animals and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by animal life stage.

The designations used in the Table indicate:

Ratings against for purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against for the purpose of use is provided. The ratings are determined based on multiple performance and operational factors relevant to application of an assay for a defined purpose. These factors include appropriate diagnostic performance characteristics, level of assay validation, successful application by diagnostic laboratories, availability cost, timeliness, and sample throughput and operability. For a specific purpose of use, assays are rated as:

Key:

- +++ = Most suitable-Methods —are most suitable with desirable performance and operational characteristics.
- ++ = Suitable-Methods(s) are suitable with acceptable performance and operational characteristics under most circumstances.
- + = Less suitable-Methods —are suitable but performance or operational characteristics may significantly limit application under some circumstances.
- Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

The selection of a test for a given purpose depends on the analytical and diagnostic sensitivities and specificities repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay analytical sensitivity or analytical specificity, such as tissue components inhibiting amplification, presence of nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.

Validation stage. The validation stage corresponds to the assay development and validation pathway in chapter 1.1.2. The validation stage is specific to each purpose of use. Where available, information on the diagnostic performance of recommended assays is provided in Section 6.3.

OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance of recommended assays, in particular PCR methods. Of particular interest are any factors affecting expected assay sensitivity (e.g. tissue components inhibiting amplification) or expected specificity (e.g. failure to detect particular genotypes detection of homologous sequences within the host genome). These issues should be communicated to the OIE Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

© Organisation mondiale de la santé animale (OIE), 2022

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.