

Rapport de la Réunion de la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OMSA

Original : anglais (EN)

Le 19 janvier et du
15 au 22 février 2023
Réunion en format hybride

Introduction et contribution des Membres

Ce rapport présente les travaux de la Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques (ci-après désignée par « Commission des animaux aquatiques »), qui s'est réunie de façon virtuelle le 19 janvier puis en présentiel à Paris, du 15 au 22 février 2023.

La Commission des animaux aquatiques de l'OMSA 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* de l'OMSA (ci-après désigné par « *Code aquatique* ») et au *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques* de l'OMSA (ci-après désigné par « *Manuel aquatique* ») et diffusés dans son rapport de septembre 2022 : l'Allemagne, l'Australie, le Brésil, le Canada, le Chili, la Chine (Rép. populaire de), l'Espagne, les États-Unis d'Amérique, l'Irlande, le Japon, la Norvège, la Nouvelle-Zélande, le Royaume-Uni (RU), la Slovénie, la Suède, la Suisse, le Taipei chinois, la Thaïlande ainsi que les Membres de la Région des Amériques de l'OMSA et les États membres de l'Union européenne (UE). La Commission a également souhaité remercier les nombreux experts du réseau scientifique de l'OMSA 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. En raison du grand nombre 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 explications aux commentaires les plus importants. Elle n'a pas inclus d'explications justifiant les modifications d'ordre rédactionnel apportées au texte. La Commission 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 a procédé aux amendements des projets de textes de la façon usuelle, c'est-à-dire par l'utilisation des fonctions « double souligné » et « barré » du logiciel de traitement de texte. Dans les annexes concernés, les amendements proposés lors de cette réunion sont mis en exergue par un surlignage jaune afin d'être différenciés de ceux précédemment proposés.

Annexes

Les textes figurant en **annexes 4 à 12 et 22 à 33** seront proposés à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

Les textes présentés en **annexes 13 à 15, 17 à 21 et 34 à 38** sont présentés aux Membres fin qu'ils formulent des commentaires.

Procédure de soumission des commentaires

La Commission des animaux aquatiques encourage vivement les Membres et les Organisations internationales ayant signé un Accord de coopération avec l'OMSA à participer à l'élaboration des normes internationales de l'OMSA en soumettant des commentaires sur les annexes concernées du présent rapport. Tous les commentaires doivent être soumis à l'OMSA via les Délégués de l'OMSA ou par les Organisations avec lesquelles l'OMSA a un Accord de coopération.



La Commission a souhaité attirer l'attention des Membres sur les cas où un groupe *ad hoc* a traité d'un sujet spécifique à la demande de la Commission des animaux aquatiques. Dans ces cas, les Membres sont encouragés à examiner ces rapports en plus du rapport de la Commission. Les rapports des groupes *ad hoc* ne sont plus présentés dans les annexes des rapports de la Commission. À la place, ils sont disponibles sur des pages du site internet de l'OMSA, dédiées par exemple aux rapports de groupes *ad hoc* :

<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/groupe-ad-hoc/>

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, et inclure toutes les propositions d'amendements du texte, dûment étayées par des arguments structurés ou par des références scientifiques publiées. Les propositions de suppression doivent être indiquées par des ~~caractères barrés~~ et celles d'ajouts par l'emploi du double soulignement. 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 peuvent disparaître lors de l'intégration de leurs propositions aux documents de travail.

Date limite de réception des commentaires

Les commentaires formulés sur les textes concernés du présent rapport devront être transmis au Secrétariat avant le **3 juillet 2023** afin que la Commission des animaux aquatiques puisse les examiner lors de sa réunion de septembre 2023.

Destinataire des commentaires

L'ensemble des commentaires devra être adressé au Service des normes à l'adresse : AAC.Secretariat@woah.org

Date de la prochaine réunion

La Commission des animaux aquatiques a indiqué que sa prochaine réunion se tiendrait du **13 au 20 septembre 2023**.

Sommaire

1. Accueil	6
1.1. Directrice générale adjointe pour le Service des Normes internationales et la Science	6
1.2. Directrice générale de l'OMSA	6
1.3. Points d'actualité du Siège de l'OMSA	7
1.3.1. Rapports des Commissions spécialisées de l'OMSA	7
1.3.2. Pré-Session générale	7
1.3.3. Utilisation de l'acronyme « OMSA » dans le <i>Code aquatique</i> et le <i>Manuel aquatique</i>	8
2. Adoption de l'ordre du jour	9
3. Coopération avec la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres	9
4. Coopération avec la Commission des normes biologiques	9
4.1. Centres de référence : discussion sur les modèles de rapports annuels et l'utilisation des données collectées	9
4.2. Manuels aquatiques et terrestres : sujets d'intérêt commun	9
4.2.1. Examen du tableau de la Commission des animaux aquatiques sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) par la Commission des normes biologiques	9
4.2.2. Version révisée du chapitre du <i>Manuel terrestre</i> sur la validation	10
4.2.3. Addition d'une nouvelle section dans les chapitres spécifiques aux maladies visant à justifier la sélection des tests destinés à diverses fins figurant dans le tableau 1 « Test methods available and their purpose » et à expliquer leur notation	10
4.2.4. Élaboration d'un modèle de rapport de validation des tests dans le <i>Manuel terrestre</i>	10
4.3. Travaux sur la liste des réactifs de référence approuvés par l'OMSA	11
5. Plan de travail et priorités	11
6. Stratégie pour la santé des animaux aquatiques	12
Le Code sanitaire pour les animaux aquatiques de l'OMSA	12
7. Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2023	12
7.1. Article 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante) »	12
7.2. Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »	12
7.3. Article 9.5.2 du chapitre 9.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse »	13
7.4. Article 10.9.2. du chapitre 10.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »	13
7.5. Nouveau chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre »	14
7.6. Article 11.2.2. du chapitre 11.2. « Infection à <i>Bonamia exitiosa</i> » et article 11.3.2. du chapitre 11.3. « Infection à <i>Bonamia ostreae</i> »	16
7.7. Articles 11.4.1. et 11.4.2. du chapitre 11.4. « Infection à <i>Marteilia refringens</i> »	17
7.8. Modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques	17
8. Points portés à l'attention des Membres pour avis	19
8.1. Définitions des termes « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire » figurant dans le glossaire	19

8.2.	Article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques »	20
8.3.	Article 1.3.1. du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA » - Inclusion de l'infection par tous les génogroupes de l'espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique.....	20
8.4.	Marchandises dénuées de risque – Articles X.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies.....	24
8.4.1.	Articles 8.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens	25
8.4.2.	Articles 9.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des crustacés	25
8.4.3.	Articles 10.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des poissons	26
8.4.4.	Articles 11.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques	26
8.5.	Articles 11.5.1. et 11.5.2. du chapitre 11.5. « Infection à <i>Perkinsus marinus</i> »	27
9.	Points portés à l'attention des Membres à titre informatif	28
9.1.	Maladies émergentes	28
9.1.1.	Infection par le virus de l'œdème de la carpe.....	28
9.1.2.	Covert mortality nodavirus	29
	Le Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques	30
10.	Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2023	33
10.1.	Titre 2.2. Maladies des crustacés.....	33
10.1.1.	Chapitre 2.2.1. Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë	33
10.1.2.	Chapitre 2.2.3. « Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante) ».....	35
10.1.3.	Chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »	36
10.1.4.	Chapitre 2.2.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse »	39
10.1.5.	Chapitre 2.2.7. « Infection par le virus du syndrome de Taura »	40
10.1.6.	Chapitre 2.2.8. « Infection par le virus du syndrome des points blancs »	42
10.2.	Titre 2.3. Maladies des poissons	43
10.2.1.	Chapitre 2.3.1. « Infection à <i>Aphanomyces invadans</i> (syndrome ulcératif épizootique) »	43
10.2.2.	Chapitre 2.3.2. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique »	44
10.2.3.	Section 2.2.1. du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »	47
10.3.	Titre 2.4. Maladies des mollusques	47
10.3.1.	Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à <i>Bonamia exitiosa</i> » et sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.3. « Infection à <i>Bonamia ostreae</i> »	47
10.3.2.	Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. « Infection à <i>Marteilia refringens</i> »	48
11.	Points portés à l'attention des Membres pour avis.....	49
11.1.	Titre 2.2. Maladies des crustacés.....	49
11.1.1.	Chapitre 2.2.0. « Informations générales : maladies des crustacés ».....	49
11.1.2.	Chapitre 2.2.2. « Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse) »	51
11.1.3.	Chapitre 2.2.6. « Infection par le nodavirus de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (maladie des queues blanches) ».....	53

11.1.4. Chapitre 2.2.9. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune »	54
11.2. Titre 2.4. Maladies des mollusques	54
11.2.1. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.5. « Infection à <i>Perkinsus marinus</i> ».....	54
11.3. Développement d'un dispositif visant à accélérer le processus d'actualisation des méthodes de diagnostic dans le <i>Manuel aquatique</i> , les rendant ainsi plus rapidement disponibles pour les Membres	55
12. Groupes <i>ad hoc</i>	56
12.1. Groupe <i>ad hoc</i> sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA	56
12.2. Groupe <i>ad hoc</i> sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA.....	56
12.3. Groupe <i>ad hoc</i> sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA.....	56
13. Centres de référence ou changement d'experts	56
13.1. Évaluation des candidatures au statut de Centre de référence de l'OMSA dans le domaine de la santé des animaux aquatiques ou changements d'experts	56
14. Sujets divers	57
14.1. Enregistrement des kits de diagnostic.....	57
14.1.1. Registre des kits de diagnostic de l'OMSA.....	57
14.1.2. Kit de test rapide « Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit »	58
Annexe 1. Point 2 – Ordre du jour adopté	59
Annexe 2. Point 2 – Liste des participants	63

Liste des annexes

Annexe 1. Point 2 – Ordre du jour adopté	59
Annexe 2. Point 2 – Liste des participants	61

1. Accueil

1.1. Directrice générale adjointe pour le Service des Normes internationales et la Science

La docteure Montserrat Arroyo, Directrice générale adjointe de l'OMSA pour le Service des Normes internationales et Science (DGA NIS), a accueilli les membres de la Commission des animaux aquatiques et les a remerciés pour leurs contributions aux travaux de l'OMSA. La docteure Arroyo les a félicités pour leur ordre du jour ambitieux et a exprimé sa reconnaissance envers les institutions et gouvernements des Membres les employant.

La docteure Arroyo a informé la Commission que le processus de sélection des experts souhaitant participer à l'élection des Commission spécialisées de l'OMSA débutera avec l'Appel à candidatures des experts, en juillet 2023. Les élections auront lieu lors de la 91^e Session générale, en mai 2024. De plus amples informations seront transmises aux Délégués en temps voulu.

La docteure Arroyo a informé la Commission que la 90^e Session générale se tiendra uniquement en présentiel. Elle a précisé que cette année, le programme inclura un « Forum sur la santé animal » principalement axé sur l'influenza aviaire, et visant à encourager les discussions entre les Délégués sur ce sujet sanitaire d'importance au niveau global.

La docteure Arroyo a informé la Commission que les webinaires de la pré-Session générale seront une nouvelle fois organisés cette année, dans la lignée de ce qui a été effectué les années précédentes. Le Président de la Commission, le docteur Ernst, fera une présentation le 20 avril 2023 de 12 :00 à 2 :00 (CEST) sur les chapitres nouveaux et révisés du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* qui seront présentés à l'adoption. Une traduction simultanée en langues française et espagnole sera proposée lors du webinaire, qui sera enregistré et mis en ligne sur le site internet de l'OMSA.

La docteure Arroyo a informé la Commission que le nouvel acronyme « OMSA » sera intégré dans les éditions 2023 des *Code aquatique* et *Manuel aquatique*.

La docteure Arroyo a fait un point sur l'avancement et la publication prochaine des appels d'offre pour la mise en place du nouvel outil de navigation pour l'élaboration des normes de l'OMSA, ainsi que sur les travaux visant à améliorer la transparence des commentaires.

La docteure Arroyo a remercié la Commission pour la mise à jour du document « Safe commodities assessments » (évaluations des marchandises dénuées de risque). Elle s'attend à ce que les membres apprécient ces orientations additionnelles. La docteure Arroyo a informé la Commission que l'OMSA était favorable au recours aux consultants pour la réalisation de certains travaux techniques et que cette pratique devrait être reconduite dans le futur.

La docteure Arroyo a constaté l'amélioration de l'harmonisation des travaux des Commissions spécialisées, comme en témoigne la réunion entre les Bureaux de la Commission des animaux aquatiques et de la Commission des normes biologiques ainsi que l'amélioration de la coordination pour les points du plan de travail communs avec la Commission sanitaire pour les animaux terrestres (ci-après désignée par « Commission du Code »).

Les Membres de la Commission des animaux aquatiques ont remercié la docteure Arroyo pour l'excellent soutien offert par le Secrétariat de l'OMSA.

1.2. Directrice générale de l'OMSA

La docteure Monique Éloit, Directrice générale de l'OMSA, a rencontré les membres de la Commission des animaux aquatique le 16 février et les a remerciés pour leur soutien et leur engagement dans la réalisation des objectifs de l'OMSA.

La docteure Éloit a souligné la pertinence du rapport du Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) publié récemment et intitulé « Se préparer aux superbactéries : renforcer l'action

environnementale dans la réponse "Une Seule Santé" à la résistance antimicrobienne », au regard du programme de la Commission et des activités menées dans le cadre de la Stratégie sur la santé des animaux aquatiques, en lien avec l'usage prudent et responsable des agents antimicrobiens. Elle a souligné qu'en tant que membre de l'Alliance quadripartite, l'OMSA devait, le cas échéant, veiller à investiguer les moyens permettant la prise en compte des recommandations figurant dans le rapport.

La docteure Éloit a informé la Commission sur l'avancement de la révision en cours du Système scientifique de l'OMSA et sur les résultats de la comparaison entreprise avec les systèmes des autres organisations internationales. La docteure Éloit a assuré à la Commission qu'elle la tiendrait informée de l'évolution de la situation.

La docteure Éloit a fait état de la publication récente du rapport annuel de l'Observatoire de l'OMSA et indiqué qu'il aiderait les Membres à comprendre la façon dont le programme de l'Observatoire offrait un aperçu de la mise en pratique des normes internationales de l'OMSA. Le rapport comporte des recommandations destinées à l'OMSA comme à ses Membres pour les aider dans l'amélioration de la mise en place des normes. La Commission a reconnu le volume d'informations important figurant dans le rapport et a fait part de son intérêt sur la façon dont les constats et recommandations pourront éclairer les planifications stratégiques de l'OMSA. La Commission a remercié la docteure Éloit pour ces points d'actualité.

1.3. Points d'actualité du Siège de l'OMSA

1.3.1. Rapports des Commissions spécialisées de l'OMSA

Les Secrétariats des Commissions spécialisées de l'OMSA sont toujours à la recherche d'amélioration de l'efficacité dans l'élaboration et la publication des rapports de leur Commission spécialisée respective tout en assurant, lorsque cela s'avère nécessaire, leur alignement. La DGA NIS a examiné les propositions faites par le Secrétariat et a accepté que les modifications suivantes soient apportées aux rapports des Commissions, qui seront publiés à partir de février 2023 :

1. Tous les rapports de Commissions spécialisées devront à nouveau être présentés sous la forme d'un unique rapport par Commission. (Note : la Commission scientifique pour les maladies animales a toujours produit un seul rapport) ;
2. Les rapports non officiels en langue anglaise ne seront plus publiés ;
3. Une fois finalisés, les rapports des Commissions spécialisées seront publiés sur le site internet des Délégués (sous format Word pour la Commission des animaux aquatiques et la Commission du Code et sous format PDF pour la Commission des normes biologiques et la Commission scientifiques pour les maladies animales) ainsi que sur le site internet accessible au public (sous format PDF pour tous les rapports), dans les trois langues (c'est-à-dire en anglais, français et espagnol). Un décalage entre la date de publication de la version anglaise et celle des versions française et espagnole est inévitable puisque la langue de travail de l'OMSA est l'anglais. Toutefois, l'OMSA s'efforcera de réduire cette période au maximum ;
4. Les rapports des quatre Commissions spécialisées seront publiés en anglais au moins deux semaines avant la tenue des webinaires de la pré-Session générale.

1.3.2. Pré-Session générale

1. Des webinaires d'information de la pré-Session générale seront organisés chaque année pour la Commission des animaux aquatiques, la Commission des normes biologiques et la Commission du Code (avec l'appui de la Commission scientifique pour les maladies animales), dans un seul fuseau horaire et seront enregistrés puis mis en ligne sur le site internet de la Session générale. Ces webinaires seront présentés par le Président respectif de chaque Commission et seront axés sur la présentation des informations sur les normes nouvelles ou révisées qui seront proposées à l'adoption lors de la Session générale.

NOTE : les dates prévues en 2023 sont : le 18 avril 2023 pour la Commission des normes biologiques ; le 19 avril 2023 pour la Commission du Code ; le 20 avril 2023 pour la Commission des animaux aquatiques. Tous les webinaires se dérouleront entre 12 :00-2 :00 pm (CEST).

2. L'OMSA ne prévoira plus de procédure permettant aux Membres de transmettre leurs positions dans le cadre de la pré-Session générale comme ce fut le cas en 2021 et 2022, années pendant lesquelles les Sessions générales ont été organisées sous format virtuel ou hybride. Cependant, si des Membres souhaitent transmettre de façon non formelle leurs positions lors de la pré-Session générale afin d'assister les Présidents des Commissions spécialisées dans la préparation des rapports de Session générale, ils peuvent adresser un courriel au Secrétariat concerné.

1.3.3. Utilisation de l'acronyme « OMSA » dans le *Code aquatique* et le *Manuel aquatique*

Contexte

Lors de la 89^e Session générale en mai 2022, l'Assemblée mondiale des Délégués a adopté la résolution n°10, entérinant le remplacement de l'acronyme « OIE » par l'acronyme « WOAH » (et « OMSA » en français et espagnol) dans le cadre de la modernisation de l'image de marque de l'Organisation.

Lors des réunions de septembre 2022, les Commissions spécialisées ont été informées par la DGA NIS de l'OMSA que le nouvel acronyme serait introduit dans les normes de l'OMSA en remplacement de l'acronyme « OIE ». Les Commissions ont été informées que le Secrétariat concerné présenterait une analyse et ferait une proposition à chacune des Commissions spécifiques lors des réunions de février 2023.

En outre, préalablement à sa réunion de février 2023, la Commission des animaux aquatiques a reçu des commentaires de plusieurs Membres demandant l'utilisation de l'acronyme « OMSA » à la place de l'acronyme « OIE ».

Réunion de février 2023

La Commission des animaux aquatiques a examiné une analyse préparée par le Secrétariat sur l'utilisation de l'acronyme « OIE » dans l'édition en vigueur du *Code aquatique* et a discuté de l'approche proposée pour remplacer « OIE » par « OMSA ». La Commission a été informée que les Secrétariats des Commissions spécialisées avaient travaillé collectivement pour s'assurer que cette modification serait effectuée de façon harmonisée dans l'ensemble des normes internationales de l'OMSA (c'est-à-dire le *Code terrestre*, le *Manuel terrestre*, le *Code aquatique* et le *Manuel aquatique*).

La Commission est convenue que la « liste de l'OMSA » et les « maladies listées » (telles que définies dans le Glossaire) remplaceraient la « liste de l'OIE » et les « maladies listées par l'OIE » dans l'ensemble du *Code aquatique* et du *Code terrestre*. Elle est également convenue que le titre du chapitre 1.3. du *Code aquatique* serait amendé en « Maladies listées par l'OMSA ».

La Commission a noté que les termes « Assemblée mondiale des Délégués de l'OIE » et « Assemblée mondiale des Délégués » figuraient tous deux dans le *Code aquatique*. À des fins d'harmonisation, il a été décidé que seul le terme « Assemblée mondiale des Délégués » serait utilisé.

La Commission a noté que le Guide de l'utilisateur et le chapitre 1.1. du *Code aquatique* faisaient référence au terme « Statuts organiques de l'OIE ». Elle est convenue de remplacer cette expression par « Statuts organiques de l'Office international des épizooties », qui est le titre officiel du document légal.

La Commission a décidé que dans tous les autres cas, que ce soit dans le *Code aquatique* ou dans le *Manuel aquatique*, « OIE » serait remplacé par « OMSA » (ou « l'OMSA », selon les lignes directrices internes sur la modernisation de l'image de marque de l'OMSA).

La Commission est convenue que ces modifications étaient d'ordre éditoriale et qu'elles n'avaient pas de conséquences sur l'interprétation des normes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique*.

La Commission a approuvé la proposition de la DGA-NIS de procéder à ces amendements dans l'édition 2023 du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique*.

La Commission a souhaité rappeler que ces modifications, lorsque cela était pertinent, ont été apportées dans l'ensemble des annexes présentées dans le présent rapport sans mise en exergue, c'est-à-dire sans utilisation de caractères barrés/double soulignement en raison de leur nature éditoriale.

2. Adoption de l'ordre du jour

Le projet d'ordre du jour a été adopté par la Commission des animaux aquatiques. L'ordre du jour et la liste des participants sont présentés respectivement en [annexes 1 et 2](#).

3. Coopération avec la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres

Le Secrétariat de la Commission du Code a informé la Commission des animaux aquatiques de l'avancement réalisé sur certains sujets identifiés comme ayant un intérêt lors de la réunion des Bureaux de la Commission du Code et de la Commission des animaux aquatiques organisée en septembre 2022.

La Commission des animaux aquatiques a été informée que la Commission du code avait examiné l'utilisation faite des termes « Services vétérinaires », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire » dans l'ensemble du *Code terrestre* et les ont présentés pour avis dans son rapport de février 2023.

La Commission des animaux aquatiques a été informée des travaux de la Commission du Code sur la révision des chapitres 5.4. à 5.7. et du chapitre 6.10. Elle a demandé que soient effectués des points sur leur avancement lors des futures réunions des Commissions en raison de l'importance que revêt l'alignement, lorsqu'il est pertinent, des chapitres correspondants du *Code aquatique*.

4. Coopération avec la Commission des normes biologiques

Les Bureaux de la Commission des normes biologiques et de la Commission des animaux aquatiques se sont réunis le 8 février 2023 en vue de discuter des domaines d'intérêt commun qui sont rapportées ci-dessous.

4.1. Centres de référence : discussion sur les modèles de rapports annuels et l'utilisation des données collectées

Lors de leur réunion, les deux Bureaux ont discuté de la version actualisée du modèle de rapport annuel utilisé par les Centres de référence, en vue d'améliorer le questionnaire et la clarté des réponses adressées en retour ainsi que la qualité des données collectées. Ils ont estimé que la version révisée du modèle, bien qu'améliorée, pouvait être perfectionnée en déterminant le type de résultats susceptibles d'être obtenus à partir des données collectées et que de telles améliorations pourraient également bénéficier aux Centres de référence établissant ces rapports. Les Bureaux ont décidé que, préalablement à la réunion de septembre 2023, la Commission des normes biologiques adresserait un questionnaire incluant des questions sur l'utilité du rapport annuel à l'ensemble des Laboratoires de référence.

4.2. Manuels aquatiques et terrestres : sujets d'intérêt commun

4.2.1. Examen du tableau de la Commission des animaux aquatiques sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) par la Commission des normes biologiques

Le Bureau de la Commission des normes biologiques a été informé que la Commission des animaux aquatiques avait élaboré un tableau répertoriant les séquences d'amorces et de sondes ainsi que les paramètres des cycles pour les PCR, permettant ainsi de présenter de façon uniforme, dans l'ensemble du *Manuel aquatique*, les informations essentielles sur les méthodes PCR. Le Bureau de la Commission des normes biologiques a indiqué que ce format tabulaire était extrêmement utile et est convenu d'adopter cette technique de présentation dans les chapitres du *Manuel terrestre*.

4.2.2. Version révisée du chapitre du *Manuel terrestre* sur la validation

La Bureau de la Commission des normes biologiques a informé la Commission des animaux aquatiques que le chapitre 1.1.6. « Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses » du *Manuel terrestre* avaient fait l'objet d'importantes révisions et serait proposé à l'adoption lors de la Session générale en mai 2023. La Commission des animaux aquatiques a noté que le *Manuel aquatique* incluait un chapitre similaire et que la révision de ce chapitre dans le *Manuel terrestre* pourrait avoir des implications pour le chapitre 1.1.2. « Principes et méthodes de validation des épreuves diagnostiques pour les maladies infectieuses » du *Manuel aquatique*. La Commission des animaux aquatiques est convenue d'ajouter la révision du chapitre 1.1.2. à son plan de travail prévisionnel ; elle a souligné qu'elle prendrait en compte la version révisée du chapitre du *Manuel terrestre* et adresserait en retour toute information jugée pertinente sur son chapitre 1.1.6. à la Commission des normes biologiques.

4.2.3. Addition d'une nouvelle section dans les chapitres spécifiques aux maladies visant à justifier la sélection des tests destinés à diverses fins figurant dans le tableau 1 « Test methods available and their purpose » et à expliquer leur notation

Le Bureau de la Commission des normes biologiques a informé le Bureau de la Commission des animaux aquatiques qu'il œuvrait à inclure une nouvelle section dans les chapitres spécifiques des maladies du *Manuel terrestre* afin de justifier la sélection des tests destinés à diverses fins figurant dans le tableau 1 « *Test methods available and their purpose* » et leur notation. Ces travaux visent à répondre aux requêtes des Membres et à fournir des justifications pour les différents tests. Les travaux n'en sont qu'à un stade pilote et le format doit encore être finalisé afin d'offrir aux experts de la flexibilité dans la présentation des éléments justificatifs.

Le Bureau de la Commission des animaux aquatiques a noté que les travaux des deux Commissions avaient des objectifs similaires en fournissant des informations additionnelles sur l'aptitude à l'emploi d'essais particuliers. Le Bureau de la Commission des animaux aquatiques a constaté qu'il avait une approche différente dans le tableau 4.1. « *WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals* » du *Manuel aquatique*, qui inclut le stade du cycle de vie, le niveau de validation et la notation au regard de l'objectif de l'utilisation.

Le Bureau de la Commission des normes biologiques est convenu qu'il examinerait cette approche dans le cadre de ses travaux.

4.2.4. Élaboration d'un modèle de rapport de validation des tests dans le *Manuel terrestre*

Le Bureau de la Commission des normes biologiques a informé le Bureau de la Commission des animaux aquatiques qu'il avait développé un modèle pour la validation des données des tests recommandés dans le *Manuel terrestre*. Les Laboratoires de référence seront invités à renseigner le formulaire « rapport de validation », qui sera mis en ligne dans un répertoire accessible à toute personne à la recherche de données de validation disponibles pour le test. Comme première étape d'un projet pilote visant à tester la pertinence et l'ergonomie du modèle de document, celui-ci a été transmis à une sélection de Laboratoires de référence de l'OMSA afin qu'ils le complètent et fassent un retour.

La Bureau de la Commission des animaux aquatiques a rapporté qu'il avait reçu des commentaires de Laboratoires de référence sur le délai nécessaire à l'inclusion de méthodes nouvelles ou

modifiées dans le *Manuel aquatique*, car les informations relatives aux méthodes de validation doivent être publiées dans des revues à comité de lecture. Le Bureau de la Commission des animaux aquatiques a considéré que le modèle développé par la Commission des normes biologiques était utile pour faciliter l'inclusion d'essais nouveaux ou modifiés dans certaines situations. Il est convenu de l'examiner et de faire un retour.

4.3. Travaux sur la liste des réactifs de référence approuvés par l'OMSA

La Commission des normes biologiques gère la liste des Réactifs de référence internationaux approuvés par l'OMSA, disponible en ligne, et prévoit de l'allonger (<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-proposons/produits-veterinaires/>).

Les deux Commissions ont estimé que cette réunion était très utile pour identifier et discuter des domaines d'harmonisation.

5. Plan de travail et priorités

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, les Membres de la Région des Amériques de l'OMSA, la Norvège, le RU et l'UE.

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires reçus et a constaté qu'ils étaient en faveur de l'élaboration de nouveaux chapitres dans le plan de travail. La Commission a évalué l'avancement à ce jour de chacun des quatre nouveaux chapitres (4.X. « Préparation aux situations d'urgence sanitaire », 4.Y. « Gestion des foyers de maladie », 5.X. « Échanges commerciaux d'animaux aquatiques d'ornement », chapitre 5.Y. « Échanges commerciaux de matériel génétique ») et est convenue de poursuivre ses travaux pour tous les chapitres, avec comme objectif leur présentation pour avis dans le rapport de septembre 2023.

La Commission a approuvé un commentaire insistant sur l'importance d'adopter, dans le cadre d'une révision des chapitres 5.4. à 5.7. du *Code terrestre*, une approche alignée sur celle de la Commission du Code. Elle a expliqué que ces travaux seraient réalisés en lien avec la Commission du Code.

La Commission a approuvé un commentaire insistant sur la nécessité d'aligner la révision de l'emploi des termes « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente », « Autorité vétérinaire » et « Services vétérinaires » définis dans le Glossaire sur celle de la Commission du Code. Elle a indiqué que les propositions de modifications de l'usage de ces termes dans le *Code aquatique* et le *Code terrestre* avaient été alignées et seraient présentées aux Membres dans les rapports de la Commission des animaux aquatiques et de la Commission du Code de février 2023 afin qu'ils formulent leurs commentaires (voir point 8.1.)

La Commission a passé en revue les réponses au questionnaire relatif à la révision du chapitre 4.3. « Application de la compartimentation » et a remercié les Membres pour leurs réflexions et expériences en matière d'application des normes relatives à la compartimentation. La Commission a examiné les progrès accomplis à ce jour sur le document de discussion relatif à la compartimentation et est convenue de poursuivre ses travaux, avec comme objectif de présenter ce document pour avis dans le rapport de septembre 2023.

La Commission est convenue que l'examen et la révision du chapitre 3.1. « Qualité des Services chargés de la santé des animaux aquatiques » devaient être inclus dans son plan de travail prévisionnel, afin qu'il soit aligné sur le chapitre correspondant du *Code terrestre*, révisé et adopté en 2022. Estimant que le chapitre 3.2. « Communication » n'était pas très clair et nécessitait une mise à jour, la Commission est convenue que l'inclusion de son examen et de sa révision dans le plan de travail devrait également être envisagée. Cette prise en compte devrait être effectuée dans le plan de travail de la prochaine Commission, à partir de juin 2024.

La Commission a examiné l'état d'avancement des dossiers en cours figurant dans son plan de travail et a anticipé les points d'étapes nécessaires à leur finalisation. La Commission a examiné l'établissement des ordres de priorité des nouveaux sujets de travaux, en tenant compte d'un certain nombre de critères, notamment l'amélioration attendue des normes et leur impact, les bénéfices retirés par les Membres, les

commentaires des Membres, la pertinence de ces sujets au regard des activités menées dans le cadre de la Stratégie de l'OMSA pour la santé des animaux aquatiques, les commentaires des services du Siège de l'OMSA et l'état d'avancement des travaux en cours figurant dans le plan de travail.

La Commission a indiqué qu'elle anticipait que l'avancement des travaux du plan de travail qui étaient conditionnés par l'établissement de groupes *ad hoc* progresserait comme prévu en 2023. La liste des groupes *ad hoc* existants ou à établir en 2023 est disponible sur le site internet de l'OMSA.

La version actualisée du plan de travail est présentée aux Membres en **annexe 3** afin qu'ils formulent leurs commentaires.

6. Stratégie pour la santé des animaux aquatiques

Le Coordinateur de la Stratégie pour la santé des animaux aquatiques a fait un point sur la mise en œuvre de la Stratégie. La Commission a été informée des étapes clés et des accomplissements sur les 12 derniers mois, de l'état d'avancement des activités en cours et des priorités essentielles pour 2023. La Stratégie a été lancée en 2021 et 16 des 23 activités sont actuellement en cours de réalisation. Un plan de travail annuel sera élaboré en 2023 pour identifier les priorités et les ressources nécessaires, définir le calendrier et anticiper les possibles obstacles à leur bonne exécution. Cette démarche garantira que la Stratégie demeure pertinente et que les priorités identifiées seront réalisées. Parmi les accomplissements de l'année écoulée figurent les ressources dédiées à la Stratégie et l'avancement des activités prévues pour chacun des quatre objectifs de la Stratégie.

Le Code sanitaire pour les animaux aquatiques de l'OMSA

7. Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2023

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

Des commentaires ont été formulés par le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques a décidé d'amender l'article 9.3.1. afin d'en assurer la cohérence avec le nom de la maladie listée dans l'article 1.3.3. du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA ».

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission est convenue d'amender à nouveau l'article 9.3.1. afin d'y faire figurer la classification taxonomique correcte.

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

Rapport de février (partie B : point 2.1.2., page 6) ; rapport de septembre 2022 (point 5.2., page 7).

Réunion de février 2023

La Commission a examiné les commentaires reçus. Constatant que les Membres étaient favorables aux propositions de modifications, elle n'a pas proposé d'amendements supplémentaires.

La version révisée de l'article 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) » est présentée en **annexe 4** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

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

Des commentaires ont été formulés par le Canada, le RU, le Taipei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques est convenue d'amender l'article 9.4.1. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » afin de prendre en compte la mise à jour la plus récente de la classification taxonomique du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse ainsi que d'en assurer l'harmonisation avec les autres chapitres spécifiques aux maladies.

La Commission est également convenue d'amender la liste des espèces sensibles de l'article 9.4.2. en ligne avec la convention utilisée dans l'article X.X.2. du *Code aquatique*, consistant à lister le nom vernaculaire des espèces sensibles par ordre alphabétique.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a examiné les commentaires reçus. Constatant que les Membres étaient favorables aux propositions de modifications, elle n'a pas proposé d'amendements supplémentaires aux articles 9.4.1. et 9.4.2.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 2.1.3., page 6) ; rapport de septembre 2022 (point 5.3., page 9).

Réunion de février 2023

La version révisée de l'article 9.4.1. n'a fait l'objet d'aucun commentaire.

La Commission a accepté la proposition d'amender la liste des espèces sensibles figurant à l'article 9.4.2. en ligne avec la convention consistant à lister le nom vernaculaire des espèces sensibles par ordre alphabétique.

La version révisée des articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » est présentée en **annexe 5** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

7.3. Article 9.5.2 du chapitre 9.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse »

Des commentaires ont été formulés par le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques est convenue d'amender l'article 9.5.2. du chapitre 9.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse » afin d'y lister le nom vernaculaire des espèces sensibles par ordre alphabétique, en ligne avec la convention utilisée dans l'article X.X.2. du *Code aquatique*.

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

Rapport de septembre 2022 (point 5.4., page 10).

Réunion de février 2023

La Commission a examiné les commentaires reçus. Constatant que les Membres étaient favorables aux propositions de modifications, elle n'a pas proposé d'amendements supplémentaires.

La version révisée de l'article 9.5.2. du chapitre 9.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse » est présentée en **annexe 6** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

7.4. Article 10.9.2. du chapitre 10.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »

Des commentaires ont été formulés par le Canada, la Chine (Rép. populaire de), la Nouvelle-Zélande, le RU, le Taipei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques est convenue qu'en cas de disponibilité de nouveaux éléments de preuves scientifiques sur la sensibilité des espèces d'animaux aquatiques aux maladies listées par l'OMSA, les évaluations de la sensibilité de nouvelles espèces ou les réévaluations de la sensibilité d'espèces sensibles connues devraient être réalisées. La Commission a encouragé les Membres à lui transmettre tout nouvel élément de preuve sur la sensibilité des espèces aux fins des évaluations.

En réponse à un Membre fournissant de nouveaux éléments de preuve de la sensibilité d'une espèce, la Commission a demandé, en prévision de sa réunion de septembre 2022, que le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA évalue la sensibilité de *Percocypris pingi* à l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe (SVCV). Le groupe *ad hoc* a appliqué les critères du chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » à *P. pingi* afin d'évaluer sa sensibilité à l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a examiné l'évaluation réalisée par le groupe *ad hoc* et est convenue d'inclure *P. pingi* dans la liste des espèces sensibles de l'article 10.9.2. du chapitre 10.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe ».

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

Rapport de septembre 2022 (point 5.5., page 10).

Réunion de février 2023

La Commission a approuvé un commentaire précisant que le nom vernaculaire anglais de *P. pingi* devait être « Jingsha barbel carp » et non « Jingsha bass carp » car la taxonomie de l'espèce indique qu'elle est une « barbel carp ». La Commission a révisé le nom vernaculaire de *P. pingi* dans l'article 10.9.2.

La Commission a relevé que, dans l'article 10.9.2., les noms vernaculaires des espèces sensibles n'étaient pas en ligne avec la convention utilisée dans le *Code aquatique*, à savoir que l'utilisation des majuscules est réservée aux noms propres. La Commission est convenue de corriger, le cas échéant, l'emploi incorrect des majuscules dans cet article ou dans d'autres textes figurant dans la version 2023 du *Code aquatique*.

La version révisée de l'article 10.9.2. du chapitre 10.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe » est présentée en [annexe 7](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

7.5. Nouveau chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre »

Des commentaires ont été formulés par la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, La Commission a examiné le nouveau projet de chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre » et a décidé que la liste des espèces sensibles listées dans l'article 10. X.2. serait considérée comme étant « à l'étude », dans l'attente des résultats de l'évaluation réalisée au moyen des critères du chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique ». La Commission a également décidé de placer les produits issus d'animaux aquatiques listés aux points 1 et 2 de l'article 10.X.3. et au point 1.a) de

l'article 10.X.14. comme étant « à l'étude », dans l'attente des résultats de l'évaluation au moyen des critères du chapitre 5.4. « Critères d'évaluation de la sécurité des marchandises issues d'animaux aquatiques ». La Commission est convenue que les périodes établies par défaut pour les conditions élémentaires de sécurité biologique et pour la surveillance ciblée présentées dans le chapitre 1.4. « Surveillance des maladies des animaux aquatiques » seraient appliquées à l'infection par le virus du tilapia lacustre tant que l'évaluation de périodes établies par défaut spécifiques n'aurait pas été achevée.

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

Rapport de septembre 2022 (point 5.6., page 10).

Réunion de février 2023

Article 10.X.3.

La Commission est convenue d'amender la recommandation de couple temps/température caractérisant le traitement thermique nécessaire à l'inactivation du TiLV et de supprimer le terme « (à l'étude) » figurant à la fin du point 2), afin que le texte soit aligné sur le document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risque récemment mis à jour (voir point 8.4.).

Article 10.X.5.

Dans la première phrase, la Commission n'a pas accepté de remplacer « dans » par « entre », car les pays et les zones sont au pluriel dans la phrase.

La Commission a examiné une demande de clarification sur la façon dont la durée de six mois a été fixée comme période minimale pour les conditions élémentaires de sécurité biologique, au point 1. de l'article 10.X.5. et au point 1. de l'article 10.X.6. La Commission a indiqué que les périodes établies par défaut pour les conditions élémentaires de sécurité biologique et pour la surveillance ciblée présentées dans le chapitre 1.4. étaient appliquées à l'ensemble des maladies listées par l'OMSA, y compris l'infection par le TiLV. Les périodes établies par défaut seront appliquées tant qu'une évaluation des périodes pour les conditions élémentaires de sécurité biologique et pour la surveillance ciblée n'aura pas été réalisée au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.4. pour chacune des maladies listées. La Commission a indiqué avoir sollicité les conseils d'experts pour réaliser ces évaluations et qu'une fois revues par la Commission, des modifications seront proposées dans les chapitres spécifiques aux maladies.

Au point 3., la Commission a accepté un commentaire indiquant que la formulation pouvait être considérée comme ambiguë et a ajouté « et mises en œuvre » après « sans discontinuer » pour plus de clarté. La Commission est également convenue d'ajouter cette formulation au point 3. de l'article 10.X.6. et au point 1. de l'article 10.X.7. à des fins d'harmonisation dans l'ensemble du chapitre. Ces articles étant harmonisés dans l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies, la Commission a précisé que les modifications apportées, une fois adoptées, seraient appliquées à tous ces chapitres.

Au point 4.b), la Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter « les établissements d'aquaculture » après « les populations touchées » car l'éradication de l'ensemble des populations infectées serait un préalable nécessaire à une nouvelle auto-déclaration d'absence d'infection à l'échelle du pays.

Dans le dernier paragraphe du point 4., la Commission a amendé la formulation pour en améliorer la clarté et pour y introduire la référence appropriée aux conditions qui devraient être remplies préalablement à la déclaration d'une nouvelle zone indemne localisée en dehors des zones infectées et de protection. La Commission est convenue d'ajouter un nouveau paragraphe final reprenant la même formulation qu'au point 4. de l'article 10.X.5. afin d'harmoniser le texte des articles relatifs aux zone et pays indemne. Ces articles étant harmonisés dans l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies, la Commission a précisé que les modifications apportées, une fois adoptées, seraient appliquées à tous ces chapitres.

Article 10.X.7.

Au point 2.c), la Commission est convenue que les périodes établies par défaut pour la surveillance ciblée nécessaires au recouvrement du statut de compartiment indemne devaient être en cohérence avec les exigences de l'article 1.4.14 du chapitre 1.4. « Surveillance des maladies des animaux aquatiques ». La Commission a révisé la formulation. Ces articles étant harmonisés dans l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies, la Commission a précisé que les modifications apportées, une fois adoptées, seraient appliquées à tous ces chapitres.

Article 10.X.11. et Article 10.X.14.

La Commission n'a pas accepté d'ajouter « Si les animaux aquatiques ou les produits issus d'animaux aquatiques sont uniquement destinés à la consommation humaine, alors la réalisation de tests ou de surveillance additionnels ne doit pas être requise puisque l'agent pathogène n'est pas zoonotique » après la dernière phrase de l'article 10.X.11. et après la dernière phrase du point 1. de l'article 10.X.14., car l'objectif de ces articles est d'indiquer qu'il peut s'avérer nécessaire que des modalités de contrôle soient envisagées pour prévenir l'introduction de la maladie par l'utilisation non prévue de produits issus d'animaux aquatiques dans un pays. La Commission a également précisé que l'article 10.X.11. faisait référence à la sécurité sanitaire plutôt qu'à la sécurité sanitaire des aliments.

En réponse à un commentaire, la Commission a reconnu qu'il pouvait être difficile de trouver des ressources documentaires sur les désinfectants pour toutes les maladies listées mais a rappelé que le *Code aquatique* n'était pas le bon véhicule documentaire pour fournir de telles orientations. La Commission a orienté les Membres vers d'autres ressources documentaires sur la désinfection et leur a suggéré de commencer par le document « AQUAVETPLAN - Decontamination Manual » du Département australien de l'Agriculture, des pêches et de la forêt.

La version du nouveau projet de chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre » est présentée en [annexe 8](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

7.6. Article 11.2.2. du chapitre 11.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et article 11.3.2. du chapitre 11.3. « Infection à *Bonamia ostreae* »

Des commentaires ont été formulés par le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA. Elle a noté que le groupe *ad hoc* recommandait que certaines espèces appartenant au genre *Crassostrea* soient désignées selon une nouvelle nomenclature.

La Commission est convenue d'amender, dans l'ensemble des chapitres du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* où ils sont cités, le nom scientifique de [Suminoe oyster] en « *Magallana* [syn. *Crassostrea*] *ariakensis* » et celui de l'huître creuse du Pacifique en « *Magallana* [syn. *Crassostrea*] *gigas* ».

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

Article 11.2.2. du chapitre 11.2. Infection à *Bonamia exitiosa* – Rapport de septembre 2022 (point 5.7., page 11).

Article 11.3.2. du chapitre 11.3. Infection à *Bonamia ostreae* - Rapport de septembre 2022 (point 5.7., page 11).

Réunion de février 2023

La Commission a noté que le nom vernaculaire anglais de *Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis* figurant dans FAOTERM avait récemment été modifié en « Ariake cupped oyster ». Elle est convenue d'amender l'article 11.2.2. du chapitre 11.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et l'article 11.3.2. du

chapitre 11.3. « Infection à *Bonamia ostreae* » afin de prendre en compte ce changement. La Commission a rappelé aux Membres que le référentiel approuvé pour les noms vernaculaires des espèces sensibles listées était FAOTERM.

La Commission est également convenue d'amender la liste des espèces sensibles des articles 11.2.2. et 11.3.2, en ligne avec la convention utilisée dans l'article X.X.2. du *Code aquatique*, consistant à lister le nom vernaculaire des espèces sensibles par ordre alphabétique

La version révisée de l'article 11.2.2. du chapitre 11.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et la version révisée de l'article 11.3.2. du chapitre 11.3. « Infection à *Bonamia ostrae* » sont présentées respectivement en [annexe 9](#) et en [annexe 10](#). Elles seront proposées à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

7.7. Articles 11.4.1. et 11.4.2. du chapitre 11.4. « Infection à *Marteilia refringens* »

Des commentaires ont été formulés par les États-Unis d'Amérique, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA, qui a conduit des évaluations de la sensibilité des espèces à l'infection à *Marteilia refringens* au moyen des critères présentés dans le chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique ».

La Commission est convenue d'amender la liste des espèces sensibles figurant dans l'article 11.4.2. en ligne avec les recommandations du groupe *ad hoc*, à l'exception de celle proposant d'inclure le copépode *Paracartia grani*. Bien que ce copépode satisfasse aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à *M. refringens*, la Commission est convenue qu'il n'était pas pertinent de l'inclure dans l'article 11.4.2. du chapitre 11.4. « Infection à *Marteilia refringens* » du *Code aquatique*, estimant que cette espèce n'était pas concernée par les échanges de mollusques ou de produits issus de mollusques. La Commission a toutefois estimé que le copépode *Paracartia grani* devait être inclus dans la section 2.2.1. du chapitre 2.4.4. « Infection à *Marteilia refringens* » du *Manuel aquatique*.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 4.1., page 17) ; rapport de septembre 2022 (point 5.8., page 12).

Réunion de février 2023

La Commission a pris en considération un commentaire requérant que le champ d'application du chapitre inclue clairement les types O et M de *Marteilia refringens*. La Commission a indiqué que le chapitre s'appliquait aux deux types et est convenue d'ajouter « y compris les types O et M » après « l'agent pathogène *M. refringens* » dans l'article 11.4.1. afin d'en assurer l'alignement avec la section 1. du chapitre 2.4.4. « Infection à *Marteilia refringens* » du *Manuel aquatique*.

Dans l'article 11.4.2., la Commission a approuvé un commentaire et corrigé le nom vernaculaire anglais de l'espèce *Chamelea gallina* en « striped venus clam ».

La version révisée des articles 11.4.1. et 11.4.2. du chapitre 11.4. « Infection à *Marteilia refringens* » est présentée en [annexe 11](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

7.8. Modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

Des commentaires ont été formulés par le Canada, les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a noté que certains des amendements qui avaient été précédemment apportés aux Titres 8, 9 et 10 (maladies des amphibiens, des crustacés et des poissons) du *Code aquatique* n'avaient pas été systématiquement apportés aux articles concernés des chapitres du Titre 11 (maladies des mollusques). Par conséquent, la Commission a décidé d'amender les articles 11.X.9. à 11.X.14. afin qu'ils soient en ligne avec les modifications horizontales apportées précédemment aux autres chapitres spécifiques aux maladies. La Commission est convenue que les amendements figurant dans les modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. seraient apportés à l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies du Titre 11 une fois qu'ils auraient été adoptés.

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

Rapport de février 2018 (point 1.11., page 13) ; rapport de septembre 2022 (point 5.9., page 13).

Réunion de février 2023

La Commission a indiqué que certaines modifications additionnelles étaient requises dans ces modèles d'articles afin d'en garantir l'alignement avec ceux des autres chapitres spécifiques aux maladies et qu'après l'adoption de ces modifications, l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies serait passé en revue aux fins de l'harmonisation des libellés dans l'ensemble du *Code aquatique*.

Article 11.X.10.

Au point 1. b) de l'article 11.X.10., la Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter « et l'élimination dans des conditions de sécurité biologique, conformément avec le chapitre 4.8. ou » après « la mise à mort », car l'exigence d'élimination dans des conditions de sécurité biologique est traitée au point 1.c).

La Commission n'a pas accepté d'ajouter « d'accueil » après « d'origine » au point 1.b), car elle n'a pas considéré qu'il s'agissait d'une amélioration.

Article 11.X.11.

Au point 2. ou au point 3. de l'article 11.X.11. et au point 2. de l'article 11.X.12., la Commission n'a pas accepté de faire référence au chapitre 4.1., car ces points font spécifiquement référence à l'inactivation des agents pathogènes et à l'élimination dans des conditions de sécurité biologique, et non à la sécurité biologique dans son ensemble. Le champ d'application du chapitre 4.1. « Sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture » a été jugé trop étendu pour l'inclure comme référence dans ces points.

En réponse à un commentaire sur le point 2. de l'article 11.X.11., la Commission a orienté les Membres vers d'autres ressources documentaires sur les désinfectants (voir le point 7.5.).

Comme pour le chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre », la Commission n'a pas accepté d'ajouter « Si les animaux aquatiques ou les produits issus d'animaux aquatiques sont uniquement destinés à la consommation humaine, alors la réalisation de tests ou de surveillance additionnels ne doit pas être requise puisque l'agent pathogène n'est pas zoonotique » après la dernière phrase de l'article 11.X.11. ainsi qu'après la dernière phrase du point 1. et la dernière phrase du point 2. de l'article 11.X.14. (voir le point 7.5.).

Article 11.X.13.

À l'article 11.X.13., en réponse à un commentaire concernant l'inclusion d'orientations sur l'importation de produits issus d'animaux aquatiques destinés aux laboratoires, aux animaux des parcs zoologiques comme aliment ou à la recherche comme matériau cellulaire ou tissulaire, la Commission a indiqué que des amendements additionnels n'étaient pas nécessaires puisque ces points étaient traités dans l'article 11.X.12.

La Commission a rappelé aux membres qu'une fois adoptés, les modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. seraient appliqués à l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies du Titre 11.

La version révisée des modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. est présentée aux Membres en [annexe 12](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

8. Points portés à l'attention des Membres pour avis

8.1. Définitions des termes « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire » figurant dans le glossaire

Contexte

Lors de la 89^e Session Générale en mai 2022, la version révisée des définitions des termes « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire » figurant dans le Glossaire du *Code aquatique* a été adoptée. La version révisée des définitions des termes « Autorité compétente », « Autorité vétérinaire » et « Services vétérinaires » figurant dans le Glossaire du *Code terrestre* a été adoptée en mai 2022. La révision de ces définitions a été effectuée de façon coordonnée avec la Commission du Code et les deux Commissions sont convenues de coordonner leurs travaux de révision de l'usage respectif de ces définitions dans le *Code aquatique* et dans le *Code terrestre*, afin d'en assurer l'harmonisation en tant que de besoin.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques et la Commission du Code sont convenus de coordonner leurs travaux d'examen de l'usage respectif de ces définitions dans le *Code aquatique* et dans le *Code terrestre*, afin d'en assurer l'harmonisation en tant que de besoin.

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

Rapport de septembre 2022 (point 6.1., page 14).

Réunion de février 2023

Lors de sa réunion de février 2023, la Commission des animaux aquatiques a passé en revue toutes les occurrences des termes « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire » dans le *Code aquatique* et est convenue de :

- Remplacer « Services chargés de la santé des animaux aquatiques » par « Autorité compétente » dans certains cas afin de refléter la responsabilité appropriée pour l'encadrement de l'industrie aquacole, notamment en ce qui concerne les compartiments et la délivrance des certificats sanitaires internationaux pour les animaux aquatiques. Par exemple, dans l'article 3.1.2. du chapitre 3.1. « Qualité des Services chargés de la santé des animaux aquatiques », remplacer « Services chargés de la santé des animaux aquatiques » par « Autorité compétente » dans la mesure où il s'agit de la délivrance des certificats sanitaires internationaux pour les animaux aquatiques. Cette modification garantit la cohérence du texte dans l'ensemble du *Code aquatique* en ce qui concerne l'autorité responsable pour la délivrance des certificats sanitaires internationaux pour les animaux aquatiques.
- Remplacer « Autorité compétente » par « Autorité vétérinaire » lorsqu'il s'agit d'une notification de maladie. Ce rôle différencié de l'Autorité vétérinaire, y compris concernant les exigences en matière de notification des maladies et la démonstration de la conformité aux normes internationales pour les échanges commerciaux internationaux ou pour le statut indemne au regard d'une maladie, a été pris en considération lors de l'élaboration de la définition figurant dans le Glossaire.
- Supprimer le terme « Services vétérinaires » dans l'ensemble du *Code aquatique*, car son usage n'y est plus pertinent.

-
- D'ajouter, au point B.5. du Guide de l'utilisateur, « Services chargés de la santé des animaux aquatiques et les » avant « Autorités compétentes » afin de garantir l'alignement du texte sur les propositions de modifications apportées au Guide de l'utilisateur du *Code terrestre*.
 - De ne pas apporter de modification à ces définitions dans le chapitre 3.2. « Communication », en dépit de l'usage parfois incorrect qui en est fait, considérant qu'elle ne pouvait procéder à la correction de l'usage sans qu'elle soit assortie d'une révision complète du chapitre. Par conséquent, la Commission a décidé d'ajouter la révision du chapitre 3.2. à son plan de travail prévisionnel, y compris l'usage du terme « Services chargés de la santé des animaux aquatiques » dans tout le chapitre, afin qu'il soit cohérent avec la version révisée des définitions. Toutefois, dans le second paragraphe de l'article 3.2.1., la Commission a décidé de supprimer la phrase « La communication entre les Services chargés de la santé des animaux aquatiques et les Services vétérinaires (en particulier lorsque les Services chargés de la santé des animaux aquatiques sont distincts et indépendants des Services vétérinaires) est capitale. », estimant que ce texte n'était pas nécessaire.

La Commission des animaux aquatiques a souhaité préciser que les amendements proposés pour l'usage des termes « Autorité compétente », « Autorité vétérinaire » et « Services vétérinaires » dans le *Code terrestre* ont été présentés dans le rapport de février 2023 de la Commission du Code. La Commission a encouragé les Membres à examiner les deux rapports préalablement à la formulation de leurs commentaires en raison des travaux menés antérieurement pour garantir l'harmonisation des deux Codes, lorsque cela est pertinent.

Les amendements proposés pour l'usage des termes « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire » sont présentés aux Membres en [annexe 13](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

8.2. Article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques »

Contexte

Lors de la réunion de février 2019, la Commission du Code terrestre est convenue de supprimer l'article 1.1.5., considérant que l'information y figurant était traitée par le chapitre 1.6. « Procédures pour la reconnaissance officielle d'un statut zoosanitaire, la validation d'un programme officiel de contrôle, et la publication d'une auto-déclaration d'absence de maladie, par l'OMSA ». L'amendement du chapitre 1.1. du *Code terrestre* consistant en la suppression de l'article 1.1.5. a été adopté en mai 2021.

Réunion de février 2023

La Commission est convenue que les exigences incluses dans l'article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques » étaient désormais traitées dans la version récemment révisée et adoptée du chapitre 1.4. « Surveillance de la santé animale ». La Commission a décidé de supprimer l'article 1.1.5. pour éviter les doublons dans le *Code aquatique* et afin de garantir l'alignement du texte de ce chapitre sur celui du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques » du *Code terrestre*.

La version révisée de l'article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques » est présentée aux Membres en [annexe 14](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

8.3. Article 1.3.1. du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA » - Inclusion de l'infection par tous les génogroupes de l'espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, le Japon, les Membres de la Région des Amériques de l'OMSA, le RU, le Taipei chinois,

la Thaïlande, l'UE et par une déclaration commune du Brésil, Canada, Chili, Nouvelle-Zélande et États-Unis d'Amérique.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques a indiqué que d'autres virus du genre *Megalocytovirus*, en plus de l'iridovirus de la daurade japonaise, pouvaient causer des maladies sévères chez les poissons. Parmi ces virus figurent deux autres génogroupes de l'espèce de virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV), à savoir le génogroupe de l'iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV) et le génogroupe du virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV). Les génogroupes ISKNV et TRBIV n'entrent pas dans le champ d'application du chapitre 10.8. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise » du *Code aquatique*.

La Commission a indiqué que l'inscription dans la Liste des génogroupes ISKNV et TRBIV (en plus du RSIV) serait conditionnée par la réalisation préalable d'une évaluation au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.2. « Critères d'inclusion dans la Liste des maladies de l'OMSA ». La Commission a demandé au groupe *ad hoc* d'évaluer la sensibilité des espèces à l'infection par les trois génogroupes de l'espèce de virus ISKNV (c'est-à-dire le RSIV, l'ISKNV et le TRBIV) afin qu'il lui fournisse les informations nécessaires à l'établissement de la Liste.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a examiné le rapport intermédiaire du groupe *ad hoc* et a pris note de l'information selon laquelle il n'était pas toujours possible de distinguer les espèces sensibles à l'échelle du génogroupe (c'est-à-dire la sensibilité à l'infection par le RSIV, l'ISKNV ou le TRBIV).

La Commission a procédé à l'évaluation de l'espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (espèce ISKNV), et notamment de ses trois génogroupes que sont le RSIV, l'ISKNV et le TRBIV, au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.2. « Critères d'inclusion des maladies des animaux aquatiques dans la liste de l'OMSA ». La Commission a conclu que l'espèce ISKNV, y compris le génogroupe RSIV (actuellement listé dans le *Code aquatique*) ainsi que les deux génogroupes ISKNV et TRBIV satisfaisaient aux critères 1, 2, 3 et 4b. Par conséquent, la Commission a proposé que le nom de la maladie listée soit remplacé par « Infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV) » et que sa définition inclue les trois génogroupes de l'espèce ISKNV (c'est-à-dire l'ISKNV, le RSIV et le TRBIV) mais exclue la maladie de la perte des écailles (« scale drop disease » ou SDDV), l'autre espèce reconnue de *Megalocytovirus*.

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

Rapport de février 2022 (partie B, point 3.1.2.3, page 13) ; rapport de septembre 2022 (point 5.1., page 8).

Réunion de février 2023

La Commission a renouvelé sa proposition de remplacer le nom de la maladie listée « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise (RSIV) » par « Infection par l'espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV) ». Cette proposition permettrait le maintien du génogroupe RSIV dans la liste des maladies tout en incluant le génogroupe ISKNV et le génogroupe TRBIV. La Commission a précisé que si plusieurs Membres approuvaient la proposition de modification, d'autres y étaient défavorables.

La Commission a noté que la nomenclature des mégalocytovirus prêtait à confusion. Cela est dû au fait qu'ISKNV est à la fois le nom de l'espèce de virus reconnu par l'ICTV et celui de l'un des trois génogroupes reconnus comme appartenant à cette espèce de virus. La Commission a examiné et mis à jour l'évaluation de l'infection par l'espèce ISKNV au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.2. « Critères d'inclusion des maladies des animaux aquatiques dans la liste de l'OMSA » à des fins de clarté et d'harmonisation des termes désignant l'espèce virale ISKNV et le génogroupe ISKNV, dans l'ensemble du document.

La Commission a examiné les propositions de désigner la maladie par le nom « Infection à *Megalocytivirus* ». La Commission a indiqué que le genre *Megalocytivirus* incluait deux espèces reconnues, à savoir l'ISKNV et le virus de la maladie de la perte des écailles (SDDV). L'inclusion du SDDV dans la Liste n'est pas envisagée. Par conséquent, le nom tel que proposé pour désigner la maladie serait problématique, car il serait nécessaire de préciser, dans sa définition, qu'il inclut l'espèce ISKNV mais exclut le SDDV. La Commission a proposé de modifier le nom de la maladie figurant dans l'article 1.3.1. en « Infection par tous les génogroupes de l'espèce ISKNV » afin de rendre le champ d'application de la maladie plus clair. Cette approche est similaire à celle employée pour l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon, qui est incluse dans le chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA » sous la désignation « Infection par des variants délétés dans la RHP du virus de l'anémie infectieuse du saumon ou par des variants RHP0 de ce virus ».

La Commission a suggéré aux Membres de se référer au rapport d'avril et de novembre - décembre 2022 du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA pour disposer du détail des évaluations réalisées pour la sensibilité à l'infection par l'espèce ISKNV. Le rapport du groupe *ad hoc* répertorie les espèces sensibles à l'infection par l'espèce de virus ISKNV et, lorsque c'est possible, la sensibilité à chaque génogroupe. Le rapport du groupe *ad hoc* aidera les Membres à déterminer le champ d'application des normes relatives à l'infection par l'espèce de virus ISKNV. S'appuyant sur les recommandations du rapport du groupe *ad hoc*, la Commission est convenue de retarder l'amendement du texte de l'article 10.8.2. du chapitre 10.8. « Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise » tant que la proposition de lister l'infection par l'espèce ISKNV n'aura pas été examinée par les Membres. Il est possible d'accéder au rapport du groupe *ad hoc* sur le site internet de l'OMSA (<https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/groupe-ad-hoc/>).

La Commission a examiné les commentaires reçus et a conclu que les informations présentées dans l'évaluation de l'infection par l'espèce ISKNV au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.2. « Critères d'inclusion des maladies des animaux aquatiques dans la liste de l'OMSA » étaient robustes. Elle a rappelé que les résultats de l'évaluation étaient en faveur de l'inclusion dans la Liste de tous les génogroupes, c'est-à-dire RSIV, ISKNV, et TRBIV. La Commission a indiqué que l'inclusion de l'échelon équivalent à celui de l'espèce dans la Liste était justifiée par de solides arguments puisque les trois génogroupes présentaient des similitudes en matière d'espèces sensibles, d'épidémiologie et de méthodes de diagnostic, comme souligné dans le rapport du groupe *ad hoc*.

La Commission a indiqué que la plupart des commentaires reçus concernaient essentiellement trois points : la large distribution du génogroupe ISKNV, la validation des tests de diagnostic pour le génogroupe TRBIV et l'intérêt de l'inclusion dans la Liste. La Commission a décidé d'apporter des réponses collectives sur ces trois points plutôt que de répondre individuellement à chacun des commentaires.

1) La large distribution du génogroupe ISKNV

Plusieurs commentaires ont questionné la satisfaction du critère n°2, en raison de la large distribution du génogroupe ISKNV, particulièrement présent chez les poissons d'ornement. La Commission a indiqué que la satisfaction au critère n°2 requiert qu'au moins un pays peut démontrer l'absence de la maladie sur son territoire ou dans une zone chez les animaux aquatiques sensibles, conformément aux dispositions prévues au chapitre 1.4. La Commission a noté que certains pays avaient réuni les conditions élémentaires de sécurité biologique pour l'ensemble des génogroupes de l'espèce ISKNV et avaient mis en place une surveillance ciblée. La Commission a indiqué qu'elle était convaincue qu'au moins un Membre serait capable de revendiquer l'absence de l'espèce ISKNV.

La Commission a relevé certains commentaires indiquant qu'en l'absence d'inclusion dans la Liste (et de disponibilité des normes de l'OMSA associées), la conception des programmes de surveillance existants ne pourrait pas forcément prendre en compte toutes les espèces sensibles connues et la distribution géographique réelle de la maladie faisant l'objet de l'évaluation pourrait demeurer inconnue. La Commission a indiqué que cet argument pouvait être utilisé pour n'importe quelle nouvelle inclusion dans la Liste et qu'à cet égard, le critère impliquait une éventualité, à

savoir qu'« au moins un pays peut... ». La Commission a indiqué qu'elle était convaincue qu'au moins un Membre serait capable de revendiquer l'absence de l'infection par tous les génogroupes de l'espèce ISKNV.

2) Validation des tests de diagnostic pour le génogroupe TRBIV

La Commission a approuvé les commentaires selon lesquels il y avait quelques obstacles à la validation des tests de diagnostic pour la détection du génogroupe TRBIV pour des raisons de disponibilité des tissus infectés par le TRBIV. Toutefois, la Commission a relevé qu'il y avait une variété de méthodes pouvant détecter les trois génogroupes (Kawato *et al.*, 2021a, Koda *et al.*, 2023 and Kim *et al.*, 2022). Kawato *et al.*, 2021a, ont montré que trois des quatre essais PCR en temps réel testés permettaient de détecter les génogroupes RSIV, ISKNV et TRBIV ; néanmoins, dans le cas du TRBIV, la mise en évidence a été réalisée au moyen de plasmides de synthèse et non d'échantillons tissulaires.

La Commission a approuvé un commentaire demandant de réaliser des travaux spécifiques en vue de procéder à une comparaison interlaboratoire pour évaluer la performance des méthodes de diagnostic utilisables sur les trois génotypes RSIV, ISKNV et TRBIV. Cependant, la Commission a souligné que la réalisation de tels travaux serait limitée par la disponibilité de tissus infectés par le TRBIV. La Commission a demandé aux Membres qui auraient accès à des tissus infectés par le TRBIV d'en informer l'OMSA afin que des travaux additionnels de validation des méthodes disponibles puissent être réalisés.

En conclusion, la Commission a indiqué qu'il y avait suffisamment d'outils de diagnostic disponibles pour détecter l'espèce ISKNV, ses trois génogroupes compris, et pour élaborer des définitions de cas appropriées. Des études supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la précision du diagnostic, et doivent notamment être réalisées sur des tissus infectés par le TRBIV. Toutefois, cela ne constitue pas un obstacle à la satisfaction du critère.

3) Intérêt de l'inclusion dans la Liste

La Commission a indiqué que dans l'ensemble, l'évaluation de l'infection par l'espèce ISKNV au moyen des critères d'inclusion dans la Liste des maladies des animaux aquatiques démontrait que l'ensemble des critères pertinents en faveur de son inclusion avaient été satisfaits. En outre, la Commission a souhaité souligner que le groupe *ad hoc* avait informé que l'identification des espèces sensibles à l'échelon d'un génogroupe spécifique de l'espèce ISKNV n'était pas toujours possible et que les trois génogroupes présentaient des similitudes en matière de signes cliniques, d'histopathologie et d'épidémiologie. La Commission a également indiqué que la proposition d'inclusion dans la Liste était compatible avec celle employée pour d'autres maladies dont l'agent pathogène peut appartenir à différents génotypes ou souches.

La Commission a examiné certains commentaires indiquant que l'inclusion de l'espèce ISKNV dans la Liste poserait des problèmes logistiques et de ressources, notamment dans les cas où les espèces sensibles sont des poissons d'ornement faisant l'objet d'échanges internationaux. La Commission a indiqué que si les normes sont correctement appliquées, les mesures commerciales prises en lien avec l'espèce ISKNV ont une portée significative uniquement dans le cas d'échanges entre pays ayant un statut différent au regard de cette maladie. La Commission a également indiqué que les normes ont pour objectif de faciliter les échanges en fournissant un ensemble de mesures sanitaires communes.

La Commission a souhaité rappeler aux Membres que l'une des recommandations de la Conférence mondiale sur la santé des animaux aquatiques qui s'est tenue en 2019 au Chili, à la demande des Membres, était de disposer, dans le *Code aquatique*, d'orientations supplémentaires pour les échanges commerciaux d'animaux aquatiques d'ornement. Le génogroupe ISKNV est un agent pathogène important et préoccupant chez les espèces de poissons d'ornement faisant l'objet d'échanges commerciaux internationaux, ce qui est en faveur de la proposition d'inclusion dans la Liste. La Commission a noté que si le génogroupe ISKNV ne cause pas systématiquement de mortalités et morbidités importantes chez les espèces de poissons d'ornement, il peut toutefois

avoir des conséquences sur d'autres espèces importantes en aquaculture [par exemple le tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*), la perche barramundi (*Lates calcarifer*), l'archigan à grande bouche (*Micropterus salmoides*), le mérou tâches oranges (*Epinephelus coioides*), le mérou malabar (*Epinephelus malabaricus*) et *Siniperca chuatsi*] et qui font l'objet d'échanges commerciaux internationaux.

La version révisée de l'évaluation de la sensibilité à l'infection par tous les génogroupes de virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.2. « Critères d'inclusion dans la Liste des maladies de l'OMSA » est présentée aux Membres en **annexe 16** à titre informatif.

La version révisée de l'article 1.3.1. du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA » est présentée aux Membres en **annexe 15** afin qu'ils formulent leurs commentaires.

8.4. Marchandises dénuées de risque – Articles X.X.3. destinés aux 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 selon lesquels les couples temps/températures 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.

Entre septembre 2020 et février 2022, la Commission a présenté des propositions d'amendements des articles X.X.3. dans l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies du *Code aquatique* afin qu'ils prennent en compte cette approche révisée. En mai 2022, les propositions d'amendements des articles 9.X.3. et 10.X.3. ont été adoptés.

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission a relevé que les évaluations réalisées antérieurement au moyen des « Critères d'évaluation de la sécurité des produits issus d'animaux aquatiques importés (ou en transit) indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de la maladie X » (tels que décrits dans l'article 5.4.1.) nécessitaient d'être revues sur la base de nouvelles preuves de la stabilité thermique. Elle a demandé qu'un consultant soit engagé afin de procéder à cette révision.

Réunion de février 2023

La Commission a examiné le document sur les évaluations des marchandises dénuées de risque qui ont été réalisées pour l'ensemble des produits issus d'animaux aquatiques listés dans l'article X.X.3. de l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies en utilisant la nouvelle approche et les informations scientifiques récentes, lorsqu'elles étaient pertinentes. La Commission a souhaité saluer le travail considérable qui a été nécessaire à la réalisation de cette révision.

La Commission a approuvé tous les amendements recommandés pour les couples temps/températures d'inactivation identifiés dans les évaluations.

La Commission a encouragé les chercheurs travaillant sur l'inactivation des agents pathogènes à appliquer une large gamme de combinaisons de temps et de températures afin de disposer de suffisamment d'informations pour obtenir des valeurs z. Cela offrirait un appui aux Membres pour déterminer les couples temps/températures équivalents permettant l'inactivation des agents pathogènes.

La Commission a demandé que le document intitulé « Safe commodity assessments for WOA listed aquatic animal diseases », actuellement disponible sur le site internet de l'OMSA, soit mis à jour en y intégrant la version révisée des évaluations. En parallèle, les évaluations des marchandises dénuées de risque actualisées seront publiées sur le site internet de l'OMSA à titre informatif. Les Membres sont

encouragés à se référer à ces évaluations lorsqu'ils examineront les propositions de modifications apportées aux articles X.X.3. présentés pour avis (voir les points 8.4.1. à 8.4.4.). Les évaluations des marchandises dénuées de risque peuvent être consultées sur le site internet de l'OMSA à l'adresse suivante : <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/commission-des-animaux-aquatiques/#ui-id-4>

8.4.1. Articles 8.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens

Des commentaires ont été formulés par la Norvège, la Suisse, le Taipei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission a amendé les articles 8.X.3. afin qu'ils soient alignés sur la version récemment adoptée des articles 9.X.3. et 10.X.3., révisée selon une nouvelle approche pour les couples temps/température caractérisant les traitements thermiques. Elle a présenté ces amendements pour avis.

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

Rapport de septembre 2020 (point 4.7., page 10) ; rapport de février 2021 (partie B : point 1.4., page 8) ; rapport de septembre 2021 (point 5.1.5., page 24) ; rapport de février 2022 (partie B : point 2.1.1.1., page 5).

Réunion de février 2023

La Commission a pris en compte la version révisée du document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risques pour les produits listés dans les articles 8.X.3. et a amendé ces articles en conséquence.

S'agissant du point 2., la Commission a approuvé le commentaire selon lequel les produits à base d'amphibiens séchés par un procédé mécanique sont une sous-catégorie des produits issus d'animaux aquatiques ayant subi un traitement thermique et a proposé de supprimer ce point pour éviter les doublons.

À des fins d'harmonisation des chapitres spécifiques aux maladies, la Commission est convenue de supprimer, lorsque cela était pertinent, les produits séchés par un procédé mécanique dans l'ensemble des articles X.X.3.

La version révisée des articles 8.1.3, 8.2.3. et 8.3.3. est présentée en **annexe 17**, respectivement avec et sans marques de modifications, afin que les Membres forment leurs commentaires.

8.4.2. Articles 9.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des crustacés

Réunion de février 2023

La Commission a pris en compte la version révisée du document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risques pour les produits listés dans les articles 9.X.3. et a amendé ces articles en conséquence.

La Commission a décidé de ne présenter que les articles 9.X.3. dans lesquels les couples temps/température caractérisant les traitements thermiques ont été modifiés pour prendre en compte la mise à jour du document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risque. La Commission a précisé que la précédente version des articles 9.X.3. n'incluait pas de produits à base de crustacés séchés par un procédé mécanique. Par conséquent, il n'y avait pas d'autres modifications apportées aux chapitres spécifiques aux maladies des crustacés à des fins d'harmonisation.

La version révisée des articles 9.3.3., 9.5.3., 9.6.3., 9.7.3. et 9.10.3. est présentée en **annexe 18**, respectivement avec et sans marques de modifications, afin que les Membres formulent leurs commentaires.

8.4.3. Articles 10.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des poissons

Réunion de février 2023

La Commission a pris en compte la version révisée du document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risques pour les produits listés dans les articles 10.X.3. et a amendé ces articles en conséquence.

S'agissant du point 2., la Commission est convenue que les produits à base de poissons éviscérés séchés par un procédé mécanique étaient une sous-catégorie des produits issus d'animaux aquatiques ayant subi un traitement thermique et a proposé de supprimer ce point pour éviter les doublons.

À des fins d'harmonisation des chapitres spécifiques aux maladies, la Commission est convenue de supprimer, lorsque cela était pertinent, les produits séchés par un procédé mécanique dans l'ensemble des articles X.X.3.

La version révisée des articles 10.1.3., 10.2.3., 10.3.3., 10.4.3., 10.5.3., 10.6.3., 10.7.3., 10.8.3., 10.9.3. et 10.10.3. est présentée en **annexe 19**, respectivement avec et sans marques de modifications, afin que les Membres formulent leurs commentaires.

8.4.4. Articles 11.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

Des commentaires ont été formulés par la Chine (Rép. populaire de), la Norvège, la Suisse et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission a amendé les articles 11.X.3. afin qu'ils soient alignés sur la version récemment adoptée des articles 9.X.3. et 10.X.3. et révisée selon une nouvelle approche pour les couples temps/température caractérisant les traitements thermiques. Elle a présenté ces amendements pour avis.

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

Rapport de septembre 2020 (point 4.7., page 10) ; rapport de février 2021 (partie B : point 1.4., page 8) ; rapport de septembre 2021 (point 5.1.5., page 24) ; rapport de février 2022 (partie B : point 2.1.1.1., page 5).

Réunion de février 2023

La Commission a pris en compte la version révisée du document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risques pour les produits listés dans les articles 11.X.3. et a amendé ces articles en conséquence.

S'agissant du point 2. de l'article 11.1.3., la Commission est convenue que les produits à base d'ormeaux séchés par un procédé mécanique étaient une sous-catégorie des produits issus d'animaux aquatiques ayant subi un traitement thermique. À des fins d'harmonisation des chapitres spécifiques aux maladies, la Commission est convenue de supprimer, lorsque cela était pertinent, les produits séchés par un procédé mécanique dans l'ensemble des articles X.X.3.

La Commission a noté que le document relatif aux évaluations des marchandises dénuées de risque incluait une évaluation des couples temps/températures d'inactivation de tous les agents pathogènes des mollusques. Par conséquent, la Commission a décidé d'ajouter, dans

l'article 11.2.3. du chapitre 11.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et l'article 11.3.3. du chapitre 11.3. « Infection à *Bonamia ostreae* », un nouveau point 1. afin d'inclure les produits issus d'animaux aquatiques ayant subi un traitement thermique dans la liste des marchandises dénuées de risque, à l'instar de ce qui figure dans les autres chapitres spécifiques aux maladies.

La version révisée des articles 11.1.3., 11.2.3., 11.3.3., 11.4.3., 11.5.3., 11.6.3. et 11.7.3. est présentée en **annexe 20**, respectivement avec et sans marques de modifications, afin que les Membres formulent leurs commentaires.

8.5. Articles 11.5.1. et 11.5.2. du chapitre 11.5. « Infection à *Perkinsus marinus* »

Contexte

Le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA s'est réuni en novembre/ décembre 2022 afin de poursuivre ses travaux d'évaluation de la sensibilité au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.5 « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique ». Lors de cette réunion, le groupe *ad hoc* a évalué la sensibilité des espèces de mollusques à l'infection à *Perkinsus marinus*.

Réunion de février 2023

La Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA et a remercié ses membres pour leur travail complet.

La Commission est convenue d'amender la liste des espèces sensibles figurant dans l'article 11.5.2., en ligne avec les recommandations du groupe *ad hoc*, c'est-à-dire :

- Deux espèces actuellement incluses dans l'article 11.5.2. ont été évaluées et satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à l'infection *P. marinus* : l'huître creuse américaine (*Crassostrea virginica*) et *Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis*. Leur maintien dans cet article est donc proposé.
- Deux nouvelles espèces sensibles, l'huître creuse de Cortez (*Crassostrea corteziensis*) et l'huître palmée (*Saccostrea palmula*), ont été évaluées et satisfont aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à l'infection à *P. marinus*. Leur ajout dans cet article est donc proposé.
- Quatre espèces actuellement listées dans l'article 11.5.2., c'est-à-dire *Macoma balthica*, la praire (*Mercenaria mercenaria*), l'huître creuse du Pacifique (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *gigas*) et la mye des sables (*Mya arenaria*), ont été évaluées et ne satisfont pas aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à l'infection à *P. marinus*. Leur suppression de cet article est donc proposée.

Les sections concernées du chapitre 2.4.4. « Infection à *Perkinsus marinus* » figurant dans le *Manuel aquatique* ont également été amendées en ligne avec les recommandations de groupe *ad hoc* (voir le point 11.2.1.).

La Commission a encouragé les Membres à consulter le rapport du groupe *ad hoc* de novembre - décembre 2022, disponible sur le site internet de l'OMSA, afin de disposer des détails sur les évaluations réalisées par le groupe *ad hoc*.

La Commission a également amendé l'article 11.5.1. en vue d'assurer sa cohérence avec l'approche utilisée dans les autres chapitres spécifiques aux maladies des mollusques.

La version révisée des articles 11.5.1. et 11.5.2. du chapitre 11.5. « Infection à *Perkinsus marinus* » est présentée en **annexe 21** afin que les Membres formulent leurs commentaires.

9. Points portés à l'attention des Membres à titre informatif

9.1. Maladies émergentes

Contexte

Un point permanent de l'ordre du jour de chacune des réunions de la Commission des animaux aquatiques est consacré à l'examen des informations scientifiques sur les maladies émergentes afin de déterminer si une maladie doit être considérée comme une maladie émergente par les Membres de l'OMSA ou si d'autres mesures sont justifiées. La Commission prend également en compte les requêtes émanant d'autres sources telles que les Membres, les experts et les Centres de Référence de l'OMSA.

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

Des commentaires ont été formulés par le Japon.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2020, la Commission des animaux aquatiques a examiné les informations scientifiques sur l'infection par le virus de l'œdème de la carpe. Elle en a conclu que cette dernière répondait à la définition de « maladie émergente » de l'OMSA et qu'à ce titre, les Membres devraient déclarer sa présence conformément aux dispositions de l'article 1.1.4. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques » du *Code aquatique*.

Lors de ses réunions de février et de septembre 2021, la Commission a examiné les commentaires des Membres et passé en revue les éléments probants scientifiques les plus récents et en a conclu que cette dernière répondait à la définition de « maladie émergente » de l'OMSA tout en notant que la présence de l'infection par le virus de l'œdème de la carpe continuait à être rapportée 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.

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission a examiné les éléments probants scientifiques récents. Elle a constaté que de plus en plus de rapports sur les détections et les mortalités causées par l'infection par le virus de l'œdème de la carpe étaient publiés chaque année. La Commission a reconnu que des incertitudes demeuraient quant à l'impact sur la production et l'étendue de la propagation de la maladie au niveau mondial, en particulier en Europe, et a rappelé qu'elle satisfaisait à la définition de maladie émergente de l'OMSA.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a examiné les éléments probants scientifiques récents sur l'infection par le virus de l'œdème de la carpe. Elle a constaté que, depuis sa réunion de février 2022, l'apparition de plusieurs autres foyers de la maladie avait été rapportée dans la région Asie-Pacifique. La Commission a conclu que l'infection par le virus de l'œdème de la carpe satisfaisait toujours à la définition de maladie émergente de l'OMSA. Une nouvelle fois, la Commission a demandé aux Membres de bien vouloir lui communiquer toute information pertinente sur l'infection par le virus de l'œdème de la carpe pour lui permettre de vérifier que les critères d'inclusion dans la Liste des maladies (chapitre 1.2.) s'appliquaient ou de conclure que la maladie ne devrait plus être considérée comme une maladie émergente.

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

Rapports de février 2020 (point 7.3.3., page 17), septembre 2020 (point 6.3., page 17), février 2021 (partie B : point 2.2., page 11), septembre 2021 (point 5.2.1.1., page 27) et février 2022 (partie B : point 2.2.1.1., page 6) ; rapport de septembre 2022 (point 6.2.1., page 15).

Réunion de février 2023

La Commission a indiqué qu'elle n'avait reçu qu'un commentaire en réponse à sa demande d'information pertinente sur l'infection par le virus de l'œdème de la carpe, information qui devait lui permettre de vérifier si les critères d'inclusion dans la Liste des maladies s'appliquaient ou si elle devait conclure que la maladie ne devrait plus être considérée comme une maladie émergente.

La Commission a examiné les éléments de preuve fournis et a constaté que l'infection par le virus de l'œdème de la carpe pouvait être une maladie importante au niveau régional. Toutefois, il y a des différences entre les souches et les degrés de virulence.

La Commission est consciente qu'à ce jour, l'infection par le virus de l'œdème de la carpe ne justifie pas la réalisation d'une évaluation au moyen des critères d'inclusion dans la Liste. Elle a noté que les Membres ne semblaient pas montrer un intérêt pour la mise à disposition de normes les aidant dans la gestion de l'infection par le virus de l'œdème de la carpe. En outre, il n'y a eu aucune notification par les Membres de l'infection par le virus de l'œdème de la carpe au titre de maladie émergente via le système mondial d'information sanitaire WAHIS de l'OMSA depuis que la Commission a indiqué qu'il s'agissait d'une maladie émergente, en février 2020.

La Commission a conclu que l'infection par le virus de l'œdème de la carpe ne satisfaisait plus à la définition de maladie émergente. La Commission a précisé que si la situation au regard l'infection par le virus de l'œdème de la carpe venait à changer et que de nouveaux éléments probants scientifiques étaient fournis, il pourrait être à nouveau envisagé, dans le futur, de procéder à son évaluation au moyen des critères d'inclusion dans la Liste.

La Commission a rappelé que si certains Membres souhaitaient mettre en place, à titre individuel, des mesures pour l'infection par le virus de l'œdème de la carpe, ils pouvaient le faire sur la base d'une analyse de risques.

La Commission a examiné la fiche technique dédiée à l'infection par le virus de l'œdème de la carpe. Elle a accepté la proposition d'ajouter le traitement au sel comme possible mesure de contrôle. La Commission a informé les Membres que la version révisée de la fiche technique dédiée à l'infection par le virus de l'œdème de la carpe demeurera disponible sur le site internet de l'OMSA : <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/commission-des-animaux-aquatiques/#ui-id-4>.

9.1.2. Covert mortality nodavirus

Aucun Membre n'a adressé de commentaires.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné les informations scientifiques disponibles sur « Covert mortality nodavirus ». Elle a conclu que cette dernière satisfaisait à la définition de maladie émergente et, qu'à ce titre, elle devait être rapportée à l'OMSA conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

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

Rapport de septembre 2022 (point 6.2.2., page 15).

Réunion de février 2023

Aucun Membre n'a adressé de commentaires.

La Commission a examiné les informations scientifiques sur « Infection with Covert mortality nodavirus ». Elle a conclu que cette dernière satisfaisait toujours à la définition de maladie émergente et, qu'à ce titre, elle devait être rapportée à l'OMSA conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

La Commission a encouragé les Membres à enquêter sur les épisodes de mortalités et morbidités chez l'ensemble des espèces d'animaux aquatiques infectés, insistant sur le fait qu'une meilleure connaissance du virus était essentielle aux efforts pour contrôler sa possible propagation et ses conséquences sur les populations d'animaux aquatiques.

La Commission a souhaité informer les Membres qu'une fiche technique dédiée à cette maladie avait été élaborée et était disponible sur le site internet de l'OMSA : <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/commission-des-animaux-aquatiques/#ui-id-4>.

Le Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques

La Commission des animaux aquatiques s'est engagée dans un processus 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 de septembre 2019, que seules les versions 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 peut être généré par un logiciel informatique. Ce document n'est pas inclus dans le rapport de la Commission mais sera disponible sur demande auprès du Service des normes de l'OMSA (AAC.secretariat@woah.org).

La Commission a réfléchi sur la meilleure façon de présenter aux Membres les amendements apportés au *Manuel aquatique* afin qu'ils visualisent et comprennent plus facilement les décisions prises en réponse aux commentaires. La Commission a décidé, dans le présent rapport, d'utiliser comme format un tableau répertoriant la partie concernée du chapitre, le résumé du commentaire et la décision prise. La Commission souhaiterait que les Membres lui fassent un retour sur ce nouveau format de rapport.

Certains Membres ont soumis les mêmes commentaires pour l'ensemble des chapitres du *Manuel aquatique* présentés dans le rapport de septembre. La Commission des animaux aquatiques les a traités de la façon suivante :

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.3.6. Geographical distribution	Remplacer le terme « Geographical » par « Geographic » dans le titre.	Rejeté : « geographical » est le terme correct en anglais britannique, qui est utilisé par l'OMSA

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
3.5.2. Preservation of samples for molecular detection	Fournir une référence justifiant l'affirmation selon laquelle la congélation des échantillons est acceptable.	<p>Ajouter la phrase suivante dans les chapitres relatifs à l'information générale : « Surveillance samples for demonstration of freedom from disease should be collected, stored and tested in a time frame to minimise sample degradation and maximise the likelihood that the analyte would be detected if present. should not be frozen for a long period of time ».</p> <p>Ajouter également le texte suivant à tous les chapitres dédiés aux maladies des crustacés : « Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 <i>General information</i> (diseases of crustaceans) »</p>
4.4. Nucleic acid amplification, paragraph: Extraction of nucleic acids	Clarifier le texte.	Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.
4.4.1. Real-time PCR and 4.4.2. Conventional PCR: tables on primer and probe sequences and PCR cycling parameters	Clarifier le texte et les titres.	Remplacer le terme « product » size par « amplicon » size ; supprimer le terme « probes » du tableau dédié à la PCR conventionnelle ; dans la cas de la PCR nichée, désigner les séquences par les termes « primary » et « nested » plutôt que les termes « inner » et « outer ».
4.5. Amplicon sequencing	Clarifier le texte.	The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
6. Corroborative diagnostic criteria	Supprimer l'exigence d'adresser tous les tests positifs suspects au Laboratoire de référence de l'OMSA approprié : ce n'est pas nécessaire si le pays dispose de la capacité de confirmer le test positif suspect. Le résultat positif sera transmis à l'OMSA via le système mondial d'information sanitaire WAHIS. Par ailleurs, il peut ne pas y avoir de Laboratoire de référence de l'OMSA spécifique pour la maladie en question. Cette exigence n'est pas cohérente avec les dispositions du <i>Manuel terrestre</i> .	<p>Supprimer : « 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 WOAHO Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. »</p> <p>Illustrer que le paragraphe est concerné par la capacité de diagnostic en apportant les modifications à la phrase suivante : « If a <u>laboratory-Competent Authority</u> does not have the <u>capacity capability</u> to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOAHO Reference Laboratory, <u>and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.</u> »</p> <p>Dans le cas des maladies pour lesquelles il n'y a pas de Laboratoires de référence de l'OMSA, la phrase suivante peut être ajoutée : « there are currently no WOAHO Reference Laboratories designated for this disease »</p>
6. Corroborative diagnostic criteria	Quelle est la position de la Commission sur l'ADNe ?	La position de la Commission sur les méthodes de l'ADNe est détaillée dans son document de discussion : <u>L'utilisation des méthodes de l'ADN environnemental à des fins de surveillance des maladies des animaux aquatiques listées de l'OMSA</u> . A ce jour, les méthodes de l'ADNe ne sont recommandées que pour une seule espèce listée (<i>Gyrodactylus salaris</i>).
6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status	Remplacer « hydrographical proximity » par « hydrographic linkage ».	Conserver « hydrographical » proximity car c'est le terme correct.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals and 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals	Un essai biologique n'est pas assez spécifique pour être utilisé comme un test de confirmation.	Accepté. En cas de résultat positif obtenu par un essai biologique, il y a suspicion d'infection. Toutefois, il est nécessaire de disposer d'une autre méthode telle qu'un test d'identification de l'agent pour confirmer l'infection. « Bioassay » sera supprimé de toutes les définitions de cas confirmé.
6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests, Table 6.3.2. For surveillance of apparently healthy animals	Suppression du tableau 6.3.2. tant qu'aucune donnée ne sera disponible.	Conserver le tableau 6.3.2 mais ajouter « no data are currently available » dans le texte du premier paragraphe de la section. La Commission a précédemment fait le choix de conserver les tableaux vides dans la section 6 afin de mettre en exergue l'absence de données sur la performance des tests de diagnostic.

Les amendements présentés ci-dessus seront apportés à tous les chapitres qui seront proposés à l'adoption en mai 2023 ou transmis pour avis, ainsi que le modèle, le cas échéant.

10. Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2023

10.1. Titre 2.2. Maladies des crustacés

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

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU le Taïpei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë », qui a été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a amendé la proposition de chapitre après avoir examiné les commentaires des Membres. La Commission, avec le concours des deux Laboratoires de référence de l'OMSA, a décidé d'examiner les informations publiées sur les espèces autres que *Vibrio parahaemolyticus* et qui ont été associées avec des cas de maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 3.1.1.1., page 9) ; rapport de septembre (point 7.1.2., page 15).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
1. Scope	Supprimer la dernière phrase car d'autres espèces de <i>Vibrio</i> sont porteurs des plasmides responsables de la pathogénicité et causant la mort des crevettes.	Accepté. La Commission continuera à solliciter l'avis des Laboratoires de référence pour suivre l'évolution des connaissances scientifiques susceptibles d'induire des modifications du champ d'application du chapitre.
2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes	Clarifier le texte car couler au fond des bassins est une modification du comportement et non un signe clinique.	Accepté et amendement du texte en conséquence.
3.2. Selection of organs or tissues	Ajouter l'estomac comme organe recommandé pour le prélèvement.	Rejeté car aucune référence n'a été fournie pour justifier le commentaire.
Table 4.1. WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals	Remplacer « cell culture » par « isolation » car la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë est une infection causée par des souches de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> porteuses de plasmides responsables de la pathogénicité, et qui ne nécessitent pas leur mise en culture sur lignée cellulaire.	Accepté et ajout dans la colonne « presumptive diagnosis of clinically affected animals » car c'est décrit dans le chapitre.
		Suppression de « bioassay » aux fins de la confirmation d'un résultat suspect obtenu dans le cadre de la surveillance ou de diagnostic présumé (voir ci-dessus le tableau figurant dans l'introduction de la partie relative au <i>Manuel aquatique</i> du présent rapport).
4.2. Histopathology and cytopathology	Réécrire le libellé de la section car il n'est pas aligné sur celui des autres chapitres et ajouter plus de références récentes telles que Ananda Raja <i>et al.</i> (2017).	Rejeté : il est important de décrire les phases de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë. Ananda Raja <i>et al.</i> ne décrivent pas les manifestations pathologiques de cette maladie. Ils décrivent les manifestations pathologiques induites par des <i>V. parahaemolyticus</i> qui ne causent pas la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë. Les modifications histopathologiques induites par des <i>V. parahaemolyticus</i> qui ne causent pas la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë sont très différentes. De plus amples détails ont été ajoutés au texte.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
4.4. Nucleic acid amplification	La méthode LAMP (Loop-mediated amplification protocol) est mentionnée dans le tableau 4.1 et est utilisée aux fins du diagnostic corroborant présenté dans la section 6. « Corroborative diagnostic criteria ». Toutefois, aucun détail sur la méthode ne figure dans la section 4.4.	Accepté : une nouvelle section 4.4.3. « <i>Isothermal loop-mediated amplification protocol</i> » a été ajoutée : elle inclut un tableau répertoriant les paramètres, semblable à celui utilisé pour les protocoles des PCR.
4.4.2. Conventional PCR, Table of the cycling parameters	Fusionner les méthodes 7 et 8 car elles constituent les deux étapes de la même PCR nichée.	Accepté. Les méthodes 1 et 2 ont également été supprimées car des méthodes améliorées ont été développées.
6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals	Ajouter « a positive result by isolation and by bioassay ».	Rejeté : il est peu probable que ces tests soient utilisés chez des animaux apparemment en bonne santé.
6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals	Ajouter « a positive result by isolation and by bioassay ».	Accepté.

La version révisée du chapitre 2.2.1. « Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë » est présentée en [annexe 22](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale.

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

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) », qui avait été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a amendé la proposition de chapitre après avoir examiné les commentaires des Membres.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 3.1.1.2., page 10) ; rapport de septembre 2022 (point 7.1.4., page 20).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence	Clarifier que la période d'incubation et la sévérité de la maladie dépendent, dans une certaine mesure, de la taille ou de l'âge.	Ajouter « with juveniles always being the most severely affected »
2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence	Supprimer le texte : il n'y a pas d'intérêt pratique à comparer les mortalités des géniteurs affectés par l'hépatopancréatite nécrosante avec celles des géniteurs non affectés par l'hépatopancréatite nécrosante	Accepté
3.2. Selection of organs or tissues	Expliquer les raisons pour lesquelles l'hépatopancréas est l'organe à prélever de façon préférentielle.	Rejeté : la phrase est claire telle que rédigée.
Table 4.1. WOAH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals	Supprimer l'essai biologique pour la réalisation d'un diagnostic de confirmation en cas de résultat suspect car l'obtention d'un résultat positif à un essai biologique indique une suspicion d'infection qui doit toutefois être confirmée par une autre méthode.	Accepté et, par conséquent, suppression de « bioassay » dans la section 6.2.2. « Definition of a confirmed case in clinically affected animals » (voir le tableau répertoriant les modifications harmonisées destinées à tous les chapitres)
4.2. Histopathology and cytopathology	Ajouter que les méthodes moléculaires sont recommandées pour le dépistage de <i>H. penaei</i> dans la population (« screening population for infection with » <i>H. penaei</i>) afin d'être en ligne avec le <i>Code aquatique</i> .	Accepté.
4.4.1. Real-time PCR and 4.4.2. Conventional PCR: tables on primer and probe sequences and PCR cycling parameters	Ajouter le nom du gène dans les tableaux.	Accepté : ajout également du nom de l'agent pathogène car le titre de la colonne prévoit « pathogen/target gene ». Remplacement de « Flg » par « flagella hook gene » dans le texte lorsque cela est pertinent.

La version révisée du chapitre 2.2.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) » est présentée en **annexe 23** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale.

10.1.3. Chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse »

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU, le Taipei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de février 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuses », qui avait été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a amendé la proposition de chapitre après avoir examiné les commentaires des Membres.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 3.1.1.3., page 10) ; rapport de septembre 2022 (point 7.1.5., page 21).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.1.1. Aetiological agent	Ajouter une phrase indiquant qu'il a été montré que des génotypes du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuses en Équateur et au Pérou appartenaient à une lignée séparée de celle des génotypes du type 2 du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuses circulant dans ces pays	Accepté.
2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility	Vérifier si les cinq espèces de poissons qui ont été supprimées du texte doivent être listées dans le tableau.	Ces espèces doivent être listées dans le tableau. La règle est que s'il y a plus de 10 espèces, elles doivent être listées sous forme d'un tableau. Comme leur nombre est supérieur à 10, toutes les espèces initialement listées dans le texte sont désormais incluses dans le tableau.
	Ajouter une légende au tableau.	Rejeté, il n'y en a nul besoin.
2.3. Disease pattern	Remanier les informations dans les sections 2.3.1.-2.3.3. permettant d'adopter une approche différente pour décrire les caractéristiques de la maladie : infection chronique ou aiguë, prévalence, transmission, infection expérimentale etc.	Rejeté : l'approche employée ici est utilisée depuis longtemps et dans tous les chapitres dédiés aux maladies des crustacés ; il n'y a pas de valeur ajoutée à procéder au remaniement proposé.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence	Supprimer la phrase sur le tableau clinique de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique au Pérou et en Équateur car il est trompeur de suggérer que le génotype n'est pas virulent.	Rejeté : la phrase ne fait que reprendre précisément les résultats de l'étude à laquelle il est fait référence.
3.1. Selection of populations and individual specimens	Ajouter une phrase sur les spécimens recommandés pour procéder à des tests de dépistage de l'infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique.	Accepté.
	Ajouter « using the tests in Table 4.1. » à la fin de la seconde phrase car les limites de détection dépendent des tests et de la stratégie de surveillance.	Rejeté : l'objectif de cette section est de décrire quels échantillons sont les plus adéquats pour démontrer le statut indemne ; tous les tests notés dans le tableau 4.1. sont recommandés.
3.4. Non-lethal sampling	Fournir des références ou des données sur les paramètres du diagnostic réalisé sur de l'hémolymphe ou des pléopodes prélevés de façon non létale comme méthode de dépistage du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique dans les populations apparemment en bonne santé.	Rejeté : la performance du diagnostic s'étend au-delà du champ d'application de cette section, dont l'objet est la sélection du type de tissu. Acceptation d'inclure la phrase suivante : « <u>If non-lethal sample types are used, the diagnostic performance of the method for a specific purpose of use should be considered.</u> »
3.5.1. Samples for pathogen isolation	Remplacer le titre « Samples for pathogen isolation » par « Samples for bioassay » et supprimer la mention sur l'isolement de l'agent pathogène dans la première phrase car le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique ne se développe pas <i>in vitro</i> .	Accepté.
Table 4.1. WOAHP recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals	Ajouter l'essai biologique aux fins du diagnostic présumé des animaux cliniquement atteints car il est décrit dans le chapitre et est approprié pour le diagnostic du virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique.	Accepté : l'essai biologique a été ajouté au tableau aux fins de cet objectif. Par conséquent, il a été ajouté dans la section 6.2.1. « Definition of suspect case in clinically affected animals »

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
Table 4.4.2.1. Recommended primer sets for conventional PCR detection of IHHNV	Corriger les séquences présentées pour les amorces sens et antisens dans la méthode 2.	Accepté.
6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals	L'histopathologie devrait être l'une des méthodes de diagnostic listées dans la section 6.2.2.	Rejeté : l'histopathologie seule est insuffisante à confirmer un cas positif.

La version révisée du chapitre 2.2.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse » est présentée en **annexe 24** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale.

10.1.4. Chapitre 2.2.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse »

Des commentaires ont été formulés par le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse », qui avait été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

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

Rapport de septembre 2022 (point 7.1.6., page 22).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.1.1. Aetiological agent		Clarification que le virus de la myonécrose infectieuse est temporairement classé dans la famille des <i>Totiviridae</i> et mise à jour des références justifiant cette affirmation.
3.1. Selection of populations and individual specimens	Ajouter « using the tests in Table 4.1. » à la fin de la seconde phrase car les limites de détection dépendent des tests et de la stratégie de surveillance.	Rejeté : l'objectif de cette section est de décrire les échantillons qui sont les plus adéquats pour démontrer le statut indemne ; tous les tests notés dans le tableau 4.1. sont recommandés.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
3.4. Non-lethal sampling	Fournir des références ou des données sur les paramètres du diagnostic réalisé sur de l'hémolymphe ou des pléopodes prélevés de façon non létale comme méthode de dépistage du virus de la myonécrose infectieuse dans les populations apparemment en bonne santé.	Rejeté : la performance du diagnostic s'étend au-delà du champ d'application de cette section, dont l'objet est la sélection du type de tissu. Ajout d'une phrase sur la prise en considération de l'impact sur la performance du diagnostic.
6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals	Supprimer l'histopathologie de la définition car elle ne peut pas être recommandée pour des animaux apparemment en bonne santé.	Accepté.
6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals	Supprimer l'hybridation <i>in situ</i> de la définition car elle n'est pas suffisamment spécifique.	Accepté.
6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals	Ajouter l'histopathologie dans la définition.	Rejeté : l'histopathologie n'est pas assez spécifique pour confirmer un cas positif.

La version révisée du chapitre 2.2.5 « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse » est présentée en [annexe 25](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

10.1.5. Chapitre 2.2.7. « Infection par le virus du syndrome de Taura »

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.7. « Infection par le virus du syndrome de Taura », qui a été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

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

Rapport de septembre 2022 (point 7.1.7., page 23).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
3.1. Selection of populations and individual specimens	Ajouter « using the tests in Table 4.1. » à la fin de la seconde phrase car les limites de détection dépendent des tests et de la stratégie de surveillance.	Rejeté : l'objectif de cette section est de décrire les échantillons qui sont les plus adéquats pour détecter le virus du syndrome de Taura ; tous les tests notés dans le tableau 4.1. sont recommandés. Suppression du texte faisant référence à la certification du statut indemne d'infection par le virus du syndrome de Taura dans la dernière phrase car il est inutile.
3.4. Non-lethal sampling	Fournir des références ou des données sur les paramètres du diagnostic réalisé sur de l'hémolymphe ou des pléopodes prélevés de façon non létale comme méthode de dépistage du virus du syndrome de Taura dans les populations apparemment en bonne santé.	Rejeté : la performance du diagnostic s'étend au-delà du champ d'application de cette section, dont l'objet est la sélection du type de tissu. Acceptation d'inclure la phrase suivante : « <u>If non-lethal sample types are used, the diagnostic performance of the method for a specific purpose of use should be considered.</u> »
3.5.1 Samples for pathogen isolation	Remplacer le paragraphe par la mention « not available » car la culture cellulaire ne peut pas être utilisée pour isoler le virus du syndrome de Taura.	Remplacement de « pathogen isolation » par « bioassay » dans le titre et le texte. Ainsi la section couvre désormais le matériel pour l'essai biologique.
4.2.1. Acute phase of Taura syndrome	Supprimer la première phrase car elle n'est pas pertinente pour l'histopathologie et la cytopathologie.	Rejeté : le commentaire est incorrect – une nécrose est observée sur les coupes histologiques.
4.2.3. Chronic phase of infection with Taura syndrome virus	Supprimer la première phrase car elle n'est pas pertinente pour l'histopathologie et la cytopathologie.	Rejeté : la phrase sert d'introduction au texte sur les résultats en histologie.
6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals	Supprimer l'histopathologie de la définition car elle ne peut pas être recommandée pour des animaux apparemment en bonne santé.	Accepté mais conservation de l'histopathologie dans le tableau 4.1. car c'est une méthode utile pour détecter le virus du syndrome de Taura pendant les phases aiguës et chroniques de l'infection.
6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals	Supprimer l'hybridation <i>in situ</i> dans la définition car elle est n'est pas suffisamment spécifique pour confirmer un cas dans cette population.	Accepté.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals	Ajouter l'histopathologie dans la définition.	Rejeté : l'histopathologie n'est pas assez spécifique pour confirmer un cas positif.

La version révisée du chapitre 2.2.7. « Infection par le virus du syndrome de Taura » est présentée en [annexe 26](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

10.1.6. Chapitre 2.2.8. « Infection par le virus du syndrome des points blancs »

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.8. « Infection par le virus du syndrome des points blancs », qui a été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre. La Commission a noté que les résultats des évaluations réalisées par le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA, en juin 2016, pour l'infection par le virus du syndrome des points blancs, n'avaient pas été utilisés par la Commission, car l'article 1.5.9. du chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » n'avait pas encore été adopté. La Commission a indiqué que le texte actuellement en vigueur demeurerait inchangé dans la section 2.2.1. du chapitre 2.2.8. du *Manuel aquatique* tant que ses travaux sur ce point ne seraient pas achevés.

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

Rapport de septembre 2022 (point 7.1.8., page 23).

Réunion de février 2023

La Commission a noté que la littérature scientifique portant sur la sensibilité des crustacés à l'infection par le virus du syndrome des points blancs n'avait fait l'objet d'aucun examen depuis la dernière réunion du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA, en juin 2016. La Commission a indiqué que l'application des critères figurant dans le chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » pouvait avoir des conséquences sur l'identification de nouvelles espèces sensibles et sur l'application des critères figurant dans l'article 1.5.9. La Commission a constaté que le groupe *ad hoc* avait à nouveau été réuni pour achever des évaluations sur les dernières maladies listées par l'OMSA qu'il n'avait pas encore réalisées ; elle a demandé que le groupe *ad hoc* mette à jour les évaluations de la sensibilité à l'infection par le virus du syndrome des points blancs afin de s'assurer que la liste des espèces sensibles était établie au regard de la littérature actuelle. Une fois que le groupe *ad hoc* aura achevé ces travaux, la Commission appliquera l'article 1.5.9. du chapitre 10.5. afin d'amender l'article 9.8.2. du *Code aquatique* et les sections 2.2.1. et 2.2.2. du *Manuel aquatique*.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
3.4. Non-lethal sampling	Ajouter une référence à la section 6. « Corroborative diagnostic criteria » pour la détermination de la taille de l'échantillon lors de la sélection d'animaux dans des populations soit apparemment en bonne santé soit atteintes cliniquement.	Rejeté : il n'est ni nécessaire ni approprié d'inclure ici la taille d'échantillon. Il y a de multiples aspects qui doivent être pris en considération dans la conception d'une étude, y compris la prévalence escomptée, la confiance etc. Acceptation d'inclure la phrase suivante : « <u>If non-lethal sample types are used, the diagnostic performance of the method for a specific purpose of use should be considered.</u> »
4.4.1. Real-time PCR	Ajouter le numéro d'accèsion de Genbank et corriger les paramètres du cycle.	Accepté.
6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals	Supprimer l'hybridation <i>in situ</i> dans la définition car elle n'est pas suffisamment spécifique pour confirmer un cas dans cette population.	Accepté mais suppression de cette méthode en raison de la sensibilité dans cette population.
6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals	Ajouter l'histopathologie à la définition.	Rejeté : l'histopathologie n'est pas assez spécifique pour confirmer un cas positif.

La version révisée du chapitre 2.2.8. « Infection par le virus du syndrome des points blancs » est présentée en [annexe 27](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

10.2. Titre 2.3. Maladies des poissons

10.2.1. Chapitre 2.3.1. « Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique) »

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU, le Taipei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa 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 et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission a amendé la proposition de chapitre après avoir examiné les commentaires des Membres.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 3.1.2.1., page 10) ; rapport de septembre 2022 (point 7.2.1., page 24).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.4.6. Disinfection of eggs and larvae: first sentence	Supprimer le texte et le remplacer par « Not applicable » car les œufs et larves de poissons ne sont pas infectées par <i>A. invadans</i>	Amendement du texte afin d'indiquer que « There are no published protocols for <i>A. invadans</i> disinfection »
4.1. Observation for clinical signs	Inclure une description des signes cliniques car ils sont mentionnés dans le tableau 4.1. comme méthode recommandée pour la surveillance ciblée.	Accepté : ajout d'une nouvelle section et par conséquent, amendement de la section 5. « Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations »
4.4.2. Conventional PCR, Diagnostic PCR techniques	Ajouter des détails sur la spécificité et la sensibilité des trois amorces PCR et protocoles afin d'aider l'utilisateur à faire son choix.	Ces détails figurent dans les publications et le tableau répertoriant les paramètres de cycle de PCR. Ajout d'une phrase sur la réaction croisée pour l'un des essais PCR avec <i>A. frigidophilus</i> .
4.6. In-situ hybridisation		Raccourcissement de la description de la procédure car elle contient des détails non nécessaires.
5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations	Il est nécessaire d'indiquer ici que l'examen des signes pathognomoniques des populations cible est le test utilisé aux fins de la surveillance pour déclarer l'absence de l'infection par <i>A. invadans</i> .	Accepté : remplacement du texte existant par la phrase proposée et introduction d'une référence à la nouvelle section 4.1. « Observation for clinical signs ».

La version révisée du chapitre 2.3.1. « Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique) » est présentée en [annexe 28](#) et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

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

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU, la Thaïlande et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2021, 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 par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Lors de ses réunions de février et de septembre 2022, la Commission a amendé la proposition de chapitre après avoir examiné les commentaires des Membres.

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

Rapports de septembre 2021 (point 6.1.3., page 31) ; février 2022 (partie B : point 3.1.2.2., page 11) ; rapport de septembre 2022 (point 7.2.2., page 25).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.2.1. Susceptible host species and 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility	Une référence devrait être indiquée pour chacune des espèces.	Les références figurant dans le rapport du groupe <i>ad hoc</i> sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA.
2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations	Supprimer « other » dans la phrase car il n'y a aucune description de l'infection des œufs ou des stades précoces du cycle de vie, quelle que soit l'espèce de poisson.	Accepté.
2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection	Ajouter une phrase sur l'apparition sporadique de foyers observée dans les zones où le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique est endémique et donner les raisons pour lesquelles il n'est spécifiquement fait référence qu'à la perche européenne et la truite arc-en-ciel.	En se fondant sur le retour de l'expert du Laboratoire de référence, suppression et remplacement du texte existant par « None known »
2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence	Ajouter une phrase indiquant qu'il a été démontré que des perches européennes provenant de zones géographiques distinctes étaient sensibles à l'infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique dans certaines conditions expérimentales.	Accepté.
2.3.6. Geographical distribution	Développer la phrase sur le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique en Australie en y incluant les observations publiées sur l'apparition sporadique de foyers affectant de petits nombres de perches européennes.	Accepté.
3.1. Selection of populations and individual specimens, point i)	Supprimer « rainbow trout » car la perche européenne est beaucoup plus sensible au virus de la nécrose hématopoïétique épizootique.	Indication que la perche européenne doit être prélevée lorsqu'elle est présente et que dans le cas contraire, il faut prélever la truite arc-en-ciel ou les autres espèces listées dans la section 2.2.1.
3.1., point ii)	Remplacer « lots of population » par « epidemiological units ».	Accepté.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
3.1., point iii)	Proposition de modifications mineures du texte afin que la phrase traite du prélèvement des échantillons dans des foyers de la maladie qui apparaissent à l'extérieur de l'environnement de la ferme de poissons.	Accepté.
3.4. Non-lethal sampling	Ajouter une référence pour justifier l'affirmation ou supprimer le texte.	Remplacement du texte par « Not applicable ».
4. Diagnostic methods, premier paragraphe	Supprimer « surveillance of » au point i).	Rejeté : le texte reprend le titre des colonnes A, B et C dans le tableau 4.1.
Table 4.1. WOH recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals	Diminuer les notations pour la culture cellulaire aux fins des trois objectifs car si elle peut être appropriée pour la surveillance des animaux apparemment en bonne santé pendant/après un épisode d'infection par le virus de la nécrose hématoïétique épizootique, il n'y a aucune preuve que ce soit le cas pour la surveillance générale de cette maladie.	Accepté après consultation du Laboratoire de référence : la culture cellulaire est moins souvent utilisée depuis l'essor des tests moléculaires. En outre, elle demande du temps et beaucoup de travail.
4.3.2. Cell culture	Remplacer le titre par « Cell lines for virus isolation » car la section ne fait que décrire les lignées cellulaires utilisées pour l'incubation du virus de la nécrose hématoïétique épizootique.	Accepté.
	Supprimer la dernière phrase car elle fait référence à l'identité des virus en culture cellulaire et n'est pas pertinente dans cette section.	Accepté : la phrase a été transférée dans la section 4.3.4. « Interpretation of results ».
4.4.1. Real-time PCR, table of PCR cycling parameters	Réintroduire les techniques de PCR en temps réel décrites par Jaramillo <i>et al.</i> (2012) et Stilwell <i>et al.</i> (2018) sur la base du texte et des références originels.	Accepté : ajout des deux méthodes assorties de détails.
4.9. Antibody- or antigen-based detection methods	Transférer dans cette section la phrase sur l'ELISA indirecte figurant dans la section 4.10. « Other methods » car elle y est plus adéquate.	Accepté.
4.10. Other methods	Supprimer la première phrase car elle est en contradiction avec la littérature publiée.	Accepté.

La version révisée du chapitre 2.3.2. « Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique » est présentée en **annexe 29** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

10.2.3. Section 2.2.1. du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »

Des commentaires ont été formulés par la Chine (Rép. populaire de), le RU, le Taipei chinois et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques est convenue d'inclure *Percocypris pingi* dans la liste des espèces sensibles figurant dans la section 2.2.1. du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe ».

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

Rapport de septembre 2022 (point 7.2.3., page 26).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.2.1. Susceptible host species	Le nom vernaculaire anglais de <i>Percocypris pingi</i> devrait être « Jingsha barbel carp », car cette espèce est classé d'un point de vue taxonomique comme appartenant au genre des « barbel carp », à la sous-famille des Barbinae et à la famille des Cyprinidae.	« Jingsha bass carp » a été remplacé par « Jingsha barbel carp » (voir le point 7.4.)
2.2.1. Susceptible host species	Les noms vernaculaires désignant les espèces sensibles ne respectent pas la convention utilisée dans le <i>Code aquatique</i> ; l'usage de la majuscule doit être réservé aux noms propres.	La première lettre en majuscule des noms vernaculaires ne commençant pas par un nom propre a été remplacée par une lettre en minuscule. Tous les cas où la convention n'est pas respectée seront amendés dans l'édition 2023 du <i>Manuel aquatique</i> .

La version révisée du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe » est présentée en **annexe 30** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

10.3. Titre 2.4. Maladies des mollusques

10.3.1. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.3. « Infection à *Bonamia ostreae* »

Des commentaires ont été formulés par le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques est convenue d'amender les sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et du chapitre 2.4.3. « Infection à *Bonamia exitiosa* » afin qu'elles respectent la nouvelle nomenclature pour [Suminoe oyster] et l'huitre creuse du Pacifique (voir le point 7.6.).

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

Les sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » - Rapport de février 2022 (partie B ; point 7.3.1., page 26).

Les sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à *Bonamia ostrae* » - Rapport de février 2022 (partie B ; point 7.3.1., page 26).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
Chapitre 2.4.2., Section 2.2.1. et Chapitre 2.4.3., Section 2.2.1.	Dans FAOTERM, le nom vernaculaire anglais désignant <i>Magallana</i> (Syn. <i>Crassostrea</i>) <i>ariakensis</i> a récemment été modifié et est désormais [Ariake cupped oyster].	Le nom vernaculaire anglais de <i>Magallana</i> (Syn. <i>Crassostrea</i>) <i>ariakensis</i> été remplacé par [Ariake cupped oyster] (voir le point 7.6.).

Les versions révisées des sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et des sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.3. « Infection à *Bonamia ostrae* » sont présentées respectivement en **annexes 31** et **32** et seront proposées à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

10.3.2. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. « Infection à *Marteilia refringens* »

Des commentaires ont été formulés par les États-Unis d'Amérique, le RU et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA, qui a procédé à des évaluations de la sensibilité des espèces à l'infection à *Marteilia refringens* au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique ». La Commission est convenue d'amender les sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. « Infection à *Marteilia refringens* » en ligne avec les recommandations du groupe *ad hoc*, à l'exception de celle préconisant de lister le copépode *Paracartia grani*. La Commission a décidé d'ajouter un nouveau paragraphe dans la section 2.2.1., afin que soit pris en compte le cas particulier où le risque est associé à un hôte intermédiaire comme le copépode *Paracartia grani*.

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

Rapport de février 2022 (partie B : point 7.3.1., page 27).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.2.1. Susceptible host species	Le nom vernaculaire anglais désignant « <i>Chamelea gallina</i> » doit être complété par l'insertion, en dernière position, du terme « clam ».	« striped venus » a été remplacé par « striped venus clam » (voir le point 7.7.).

La version révisée des sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. « Infection à *Marteilia refringens* » est présentée en **annexe 33** et sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

11. Points portés à l'attention des Membres pour avis

11.1. Titre 2.2. Maladies des crustacés

11.1.1. Chapitre 2.2.0. « Informations générales : maladies des crustacés »

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, le RU, la Thaïlande et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a amendé le chapitre 2.2.0. « Informations générales (maladies des crustacés) », avec le concours des experts des Laboratoires de référence des crustacés.

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

Rapport de septembre 2022 (point 7.1.1., page 17).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
Commentaire d'ordre général sur les références croisées dans les chapitres du <i>Manuel aquatique</i> .	Les références croisées dans les chapitres doivent être indiquées de façon uniforme dans l'ensemble du <i>Manuel aquatique</i> .	Accepté : la convention à utiliser est d'indiquer, la première fois qu'il est mentionné, le numéro et le titre complet du chapitre, en italique ; les références ultérieures à ce chapitre seront réduites à son numéro. Etant donné que les chapitres relatifs aux informations générales ont des sections distinctes, la même règle est appliquée mais elle est adaptée : dans chaque section, le titre complet est indiqué la première fois qu'il est mentionné puis seulement son numéro les fois suivantes.
A.1.2. Specifications according to	Remplacer « lots » par « epidemiological units »	Accepté.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
crustacean populations	Modifier les articles i) à iv) qui font référence aux prélèvements d'animaux malades alors que le paragraphe introductif de la section 1.2. traite des motifs divers justifiant les prélèvements.	Rejeté : le paragraphe introductif fait référence à la conception du système de surveillance pour la démonstration du statut indemne à l'échelle du pays, d'une zone ou d'un compartiment. Ainsi, dans ces circonstances, choisir des animaux malades est approprié. Amendement de cette section pour qu'elle soit alignée sur celle du chapitre 2.3.0. « Informations générales (maladies des poissons).
A.1.3. Specifications according to clinical status	Ajouter des informations sur les prélèvements d'échantillons dans les populations apparemment en bonne santé à des fins de démonstration de l'absence de maladie ou de surveillance.	Rejeté : cette proposition est déjà traitée dans la section 1.2.
	Supprimer la dernière phrase car l'information figure déjà dans le paragraphe précédent.	Accepté : suppression de la dernière phrase.
A.2.2.2. Virus isolation	Supprimer le texte et le remplacer par « Not applicable »	Accepté : le nodavirus de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> peut être isolé au moyen de lignées cellulaires d'insectes ou SSN-1 mais ce n'est pas une méthode recommandée. Inclusion d'une phrase explicative.
A.2.3. Bacteriological examination	Suppression des informations concernant des agents pathogènes spécifiques dans le chapitre relatif aux informations générales afin qu'il soit en ligne avec l'approche utilisée pour le chapitre relatif aux informations générales pour les poissons.	Rejeté : amendement du texte afin de clarifier que l'examen bactériologique, bien que non employé en routine pour les maladies listées, peut être utilisé pour certaines d'entre elles.
B.1.3.2. Virus production	Clarifier le texte car il indique que l'infection des espèces hôtes reconnues comme étant sensibles est la méthode de prédilection pour la production de virus à des fins expérimentales.	Accepté : ajout de « for experimental purposes » au titre de la section.
B.5. Techniques	Supprimer la recommandation d'utiliser 50 à 150 post-larves pour le mélange car elle contredit les recommandations figurant dans la plupart des chapitres spécifiques aux maladies.	Accepté.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
B.5.5. Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis	Supprimer le troisième paragraphe sur les protocoles de PCR car il n'est pas aligné sur ceux des chapitres spécifiques aux maladies ; il devrait être en adéquation avec l'approche actuelle sur l'utilisation de la PCR.	Rejeté : le paragraphe inclut des informations importantes sur les dysfonctionnements possiblement rencontrés avec la PCR et qui ne sont décrits nulle part. Le paragraphe est également inclus dans le chapitre 3.3.0. Il ne traite pas de la performance du diagnostic et ne contrevient pas à ce qui figure dans les chapitres spécifiques aux maladies.
B.5.5.1. Sample preparation and types		Ajout d'un nouveau point vi) sur les tissus fixés aux fins de l'hybridation <i>in situ</i> car il était manquant.
B.5.5.3. Nucleic acid extraction	Ajout de texte indiquant que l'aptitude des kits d'extraction doit être confirmée.	Rejeté car ce point est traité dans la phrase suivante.

La version révisée du chapitre 2.2.0. « Informations générales (maladies des crustacés) » est présentée aux Membres en [annexe 34](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

11.1.2. Chapitre 2.2.2. « Infection à *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) »

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, la Chine (Rép. populaire de), les États-Unis d'Amérique, la Nouvelle-Zélande, le RU, la Thaïlande et l'UE.

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.2. « Infection à *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) », qui a été mis à jour par les experts du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

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

Rapport de septembre 2022 (point 7.1.3, page 19).

Réunion de février 2023

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
Dans l'ensemble du chapitre	Supprimer le terme « highly susceptible » avant « crayfish species » car il n'est pas en ligne avec la définition d'espèce sensible, conformément au chapitre 1.5. du <i>Code aquatique</i> .	Accepté : reformulation en « species that are prone to development of clinical disease ».

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.1.1. Aetiological agent	Cinq groupes (A à E) d' <i>A. astaci</i> sont décrits mais aucune information n'est fournie sur le groupe E.	Accepté : ajout d'une phrase et d'une référence sur une espèce dont il a été démontré qu'elle était porteuse du groupe E.
2.2.1. Susceptible host species	Indiquer que la liste est « under study » car le groupe <i>ad hoc</i> sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA n'a pas encore achevé ses travaux sur cette maladie.	Alignement du texte sur celui du <i>Code aquatique</i> et inclusion d'une note indiquant que l'évaluation du groupe <i>ad hoc</i> n'a pas été encore achevée.
2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility	Indiquer que la liste est « under study » car le groupe <i>ad hoc</i> sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA n'a pas encore achevé ses travaux sur cette maladie.	Accepté.
2.2.3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations	Supprimer le texte : l'information figurant dans cette section doit décrire les différences de manifestations cliniques de la maladie entre les espèces, s'il y a lieu ainsi que les stades de leur cycle de vie ciblés par l'infection. S'il n'y a pas d'informations alors il doit être indiqué dans la section « not applicable ».	Reformulation du texte pour indiquer les différences dans l'expression des manifestations cliniques de la maladie et les mortalités. Ajout de nouveau texte contenant certaines des informations ayant été supprimées dans la section 2.2.1.
2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection	Réécrire afin de mieux expliquer la phrase sur la « colonisation of habitats ». Supprimer l'utilisation incorrecte du terme « susceptibility » et expliciter le sens des termes « carrier », « animal reservoir » et « vector » aux fins de cette section.	Accepté : reformulation du texte sur la colonisation, remplacement de « carriers » par « reservoirs » et suppression du terme « highly susceptible ».
2.2.6. Vectors	Transférer le texte dans la section 2.3.4. « Modes of transmission and life cycle » car il y est plus adéquat.	Accepté : ajout du texte à la fin de la section, où il constitue le quatrième paragraphe. En outre, transfert des deux premiers paragraphes après le troisième paragraphe.
2.3.6. Geographical distribution	Clarifier le texte afin de s'assurer que les informations présentées aux membres sont justifiées par les éléments de preuve.	Accepté : suppression du texte sur les zones géographiques où l'infection est potentiellement présente.

Section/ paragraphe	Commentaire	Décision
2.4.2. Chemotherapy including blocking agents	Simplifier le texte en supprimant la partie superflue.	Accepté.
2.4.3. Immunostimulation	Simplifier le texte en supprimant la partie superflue.	Accepté.
2.4.4. Breeding resistant strains	Supprimer le texte sur la possible sélection de souche résistante d'écrevisse d'Amérique du Nord car elle est inexacte.	Accepté.
2.4.7. General husbandry	Supprimer tout le texte car l'information n'est pas en ligne avec celle figurant dans les autres chapitres et n'est pas spécifique de la peste de l'écrevisse.	Rejeté : le texte est en ligne avec les autres chapitres et fournit des informations utiles.
4.4.1. Real-time PCR, first paragraph following the table of PCR cycling parameters	Supprimer le texte « which is equivalent to less than one <i>A. astaci</i> genome » car il rend confuse la phrase sur la limite de détection de la méthode.	Accepté.

La version révisée du chapitre 2.2.2. « Infection à *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) » est présentée aux Membres en [annexe 35](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

11.1.3. Chapitre 2.2.6. « Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (maladie des queues blanches) »

Réunion de février 2023

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.6. « Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (maladie des queues blanches) » qui a été mis à jour par l'expert du Laboratoire de référence de l'OMSA et un membre de la Commission, et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Parmi les principales modifications figurent :

Section/ paragraphe	Modification
2.1.1. Aetiological agent	Mise à jour de cette section afin que les descriptions des deux virus associés à la maladie des queues blanches soient clairement différenciées.
2.2.3 Vectors	Élargissement de cette section à du texte et des références aux insectes vecteurs.
Table 4.1.	Complétude du tableau 4.1. et alignement de son contenu sur les définitions de cas figurant dans la section 6.
4.2. Histopathology and cytopathology	Ajout d'une description sur les caractéristiques histopathologiques et les références.
4.6. In-situ hybridisation	Ajout de texte et d'une référence.

Section/ paragraphe	Modification
6. Corroborative diagnostic criteria	Révision des définitions de cas suspect et confirmé chez les animaux apparemment en bonne santé et cliniquement atteints.
7. References	Mise à jour des références.

La version révisée du chapitre 2.2.6. « Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (maladie des queues blanches) » est présentée aux Membres en [annexe 36](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

11.1.4. Chapitre 2.2.9. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune »

Réunion de février 2023

La Commission des animaux aquatiques a examiné le chapitre 2.2.9. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune » qui a été mis à jour par l'expert du Laboratoire de référence de l'OMSA et reformaté selon le nouveau modèle de chapitre.

Parmi les principales modifications figurent :

Section/ paragraphe	Modification
2.1.1. Aetiological agent	Suppression des informations sur des génotypes autres que YHV1.
Table 4.1.	Complétude du tableau 4.1. et alignement de son contenu sur les définitions de cas figurant dans la section 6.
4.4.2. Conventional RT-PCR	Mise à jour du texte : les méthodes utilisées pour le virus de la tête jaune sont très compliquées en raison de l'existence de différents génotypes et de la nécessité de les différencier. Par conséquent, description de certains détails de l'application des méthodes qui ne pourraient pas autrement figurer dans les tableaux.
4.6. In-situ hybridisation	Simplification de la description du test car les détails figurent dans les références.
4.8. Bioassay	Simplification de la description du test car les détails figurent dans les références.
5. Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations	Expliquer que la RT-PCR nichée est recommandée. La Commission est informée que la méthode RT-PCR spécifique a été validée et que la publication est imminente.
6. Corroborative diagnostic criteria	Révision des définitions de cas suspect et confirmé chez les animaux apparemment en bonne santé et cliniquement atteints.
7. References	Mise à jour des références.

La version révisée du chapitre 2.2.9. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune » est présentée aux Membres en [annexe 37](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

11.2. Titre 2.4. Maladies des mollusques

11.2.1. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.5. « Infection à *Perkinsus marinus* »

Contexte

Le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA s'est réuni en novembre - décembre 2022 afin de poursuivre ses travaux d'évaluation de la sensibilité au moyen des critères figurant dans le chapitre 1.5 « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique ». Lors de cette réunion, le groupe *ad hoc* a procédé aux évaluations de la sensibilité des espèces de mollusques à l'infection à *Perkinsus marinus*.

Réunion de février 2023

La Commission des animaux aquatiques a amendé les sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.5. « Infection à *Perkinsus marinus* », en ligne avec les recommandations du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA (voir le point 8.5.).

La version révisée des sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.5. « Infection à *Perkinsus marinus* » est présentée aux Membres en [annexe 38](#) afin qu'ils formulent leurs commentaires.

11.3. Développement d'un dispositif visant à accélérer le processus d'actualisation des méthodes de diagnostic dans le *Manuel aquatique*, les rendant ainsi plus rapidement disponibles pour les Membres

Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2022, la Commission des animaux aquatiques a identifié deux situations dans lesquelles la diffusion rapide d'information nouvelle et importante sur les tests de diagnostic figurant dans le *Manuel aquatique* s'avérait nécessaire. La première correspondait au signalement de problèmes liés à la performance d'un test ayant été adopté et inclus dans le *Manuel aquatique*. La Commission a décidé que, dans ce type de situation, une note de bas de page pouvait être immédiatement insérée dans le chapitre afin de détailler la nature du problème rencontré et de fournir des instructions sur la façon de le gérer.

La seconde situation correspondait à l'ajout de nouveaux tests de diagnostic dans le *Manuel aquatique*. La Commission a été informée que la Commission des normes biologiques travaillait à l'élaboration d'un modèle de validation des données que les candidats souhaitant que leur test soit inclus dans le *Manuel terrestre* devraient fournir. La Commission est convenue de discuter plus amplement de ce modèle lors de sa réunion de février 2023, et notamment de sa pertinence et de son applicabilité au *Manuel aquatique*.

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

Rapport de février 2022 (point 3.3.1., page 16) ; rapport de septembre 2022 (point 8.3., page 28).

Réunion de février 2023

La Commission des animaux aquatiques a échangé sur le modèle et les amendements à apporter pour le simplifier et le rendre applicable au *Manuel aquatique*, en remplaçant par exemple les sept usages attendus d'un test de diagnostic dans le *Manuel terrestre* par les trois prévus dans le *Manuel aquatique*. La Commission des normes biologiques a décidé que le modèle devait être utilisé comme un formulaire de « rapport de validation » pour les tests recommandés dans le *Manuel terrestre*.

La Commission des animaux aquatiques a souligné l'importance de la validation des tests de diagnostic pour les maladies des animaux aquatiques. Elle a considéré que la publication des études de précision diagnostique dans des journaux à comité de lecture était préférable ; toutefois, dans certains cas, ce formulaire de rapport de validation permettait d'offrir une solution pour l'inclusion de méthodes nouvelles ou révisées pendant la période précédant leur publication. La Commission a identifié un expert d'un Laboratoire de référence de l'OMSA qui est dans les dernières phases de la mise au point d'une nouvelle

méthode PCR. Une fois que des modifications auront été apportées au modèle, celui-ci sera transmis à l'expert pour avis. Le retour de l'expert sera examiné lors de la prochaine réunion.

12. Groupes *ad hoc*

12.1. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA

Le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA s'est réuni en novembre/décembre 2022 afin d'achever ses évaluations de la sensibilité des espèces de mollusques à l'infection à *Perkinsus marinus* (voir les points 8.5. et 11.2.1.)

La Commission a été informée que le groupe *ad hoc* avait prévu de se réunir en juin 2023 pour poursuivre ses travaux d'évaluation de la sensibilité des espèces à *Perkinsus olseni*.

Le rapport du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA est disponible sur le site internet de l'OMSA : <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/groupes-ad-hoc/#ui-id-3>.

12.2. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA

Le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA s'est réuni en avril puis en novembre/décembre 2022 afin d'achever les évaluations de la sensibilité des espèces de poissons à l'infection par le génogroupe de l'iridovirus de la daurade japonaise, le génogroupe de l'infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique, le génogroupe de l'iridovirus du corps rougeâtre du turbot et l'espèce de virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (voir le point 8.3.).

La Commission a été informée que le groupe *ad hoc* avait prévu de se réunir en avril 2023 pour poursuivre ses travaux d'évaluation de la sensibilité de espèces au virus du tilapia lacustre.

Le rapport du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA est disponible sur le site internet de l'OMSA : <https://www.woah.org/fr/ce-que-nous-faisons/normes/processus-detablissement-des-normes/groupes-ad-hoc/#ui-id-3>.

12.3. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA

La Commission a été informée que le groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA serait à nouveau réuni afin d'appliquer les critères figurant dans le chapitre 1.5. « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » aux maladies listées depuis sa dernière réunion (en 2016). Le groupe *ad hoc* prévoit de se réunir en mars 2023 afin de mener des travaux d'évaluation de la sensibilité de espèces de crustacés à l'infection par le virus 1 iridescent des décapodes.

13. Centres de référence ou changement d'experts

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

La Commission des animaux aquatiques a examiné la candidature pour un Centre collaborateur pour l'économie de la santé animale de l'OMSA. La Commission a été impressionnée par cette candidature convaincante, qui est en lien avec l'autre Centre collaborateur de l'OMSA dans ce domaine ainsi qu'avec le projet mené par l'OMSA sur le poids des maladies animales dans le monde (GBADs – Global burden of animal diseases). La Commission était satisfaite que le domaine des animaux aquatiques soit l'un des

domaines d'activité principalement ciblés. La Commission a pleinement approuvé la recommandation et en a recommandé l'acceptation :

Centre collaborateur pour l'économie de la santé animale de l'OMSA dans la région des Amériques

Department of Agricultural Economics, Kansas State University, UNITED STATES OF AMERICA

Tél. : (+1-785 532.35.25)

Courriel : dpendell@ksu.edu

Site internet : www.ksu.edu

Point de contact : Dustin L. Pendell.

Ce Centre collaborateur de l'OMSA multinational œuvrera avec la participation des institutions suivantes :

Department of Economics, Business and Sociology (ESALQ/USP), University of São Paulo, BRAZIL et
Faculty of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasília, BRAZIL

Tél. : (+55-19) 34.29.44.44 and (+55-61) 992.09.06.66

Courriel : shgdmira@usp.br / vitorspg@unb.br

Site internet : www.esalq.usp.br / www.unb.br

Points de contact désignés : Dr Silvia Helena Galvão de Miranda / Prof. Vitor Salvador Picão Gonçalves.

Department of Business, Economics and Rural Development, Faculty of Veterinary Medicine and
Husbandry, Universidad Nacional Autonoma De México, MEXICO

Tél. : (+1-52) 56.22.59.05

Courriel : jldf@fmvz.unam.mx

Site internet : www.fmvz.unam.mx

Point de contact désigné : Prof. José Luis Dávalos Flores.

School of Economic Sciences, Paul G. Allen School for Global Health, Washington State University,
UNITED STATES OF AMERICA

Tél. : (+1-509) 335.85.97

Courriel : tl_marshall@wsu.edu

Site internet : www.wsu.edu

Point de contact désigné : Prof. Thomas L. Marsh.

14. Sujets divers

14.1. Enregistrement des kits de diagnostic

14.1.1. Registre des kits de diagnostic de l'OMSA

La Commission a été informée des possibilités d'améliorer le service rendu par l'OMSA à ses Membres dans le domaine des kits de diagnostic. Après 20 ans d'existence, et seulement 14 kits inscrits dans le Registre de l'OMSA, une consultation interne a été menée avec les principales parties prenantes dans ce domaine, aussi bien internes qu'externes. Elle a permis de dégager trois options méritant d'être explorées :

- Explorer les mécanismes qui peuvent être mis en place pour faciliter l'harmonisation de la réglementation relative aux kits de diagnostic.
- Examiner l'intérêt d'établir les critères minimaux requis pour un enregistrement fiable des kits de diagnostic, facilitant l'accès aux Membres, indépendamment de leur capacité de réglementation.

-
- Uniformiser les procédures de reconnaissance des kits et aligner les activités des Laboratoires de référence de l'OMSA sur celles du Secrétariat pour l'enregistrement des kits de diagnostic de l'OMSA.

Cela pourrait mener à un renouvellement du Secrétariat pour l'enregistrement des kits de diagnostic. Dans l'attente que les options susmentionnées soient évaluées, aucun nouveau dossier de demande ne sera examiné. Seuls ceux actuellement en cours d'évaluation ou ceux faisant potentiellement l'objet d'un renouvellement seront traités. Une exception sera faite dans les cas où les dossiers seront déposés dans le cadre d'une situation d'urgence en santé animale.

14.1.2. Kit de test rapide « Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit »

La Commission des animaux aquatiques a été informée que l'évaluation du nouveau dossier de demande d'enregistrement du kit de test rapide « Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit, (Innocreate Bioscience Co., Ltd) » avait été achevée. Après examen du rapport final du Panel d'experts évaluateurs de l'OMSA, la Commission a avalisé sa recommandation d'approuver l'ajout du kit dans le Registre des kits de diagnostic de l'OMSA, dont l'aptitude à l'emploi a été validée (kit de détection qualitative de l'espèce de *Whispovirus* responsable de l'infection par le virus du syndrome des points blancs (WSSV) chez les crevettes). Ce dispositif d'immunodosage à flux latéral a été conçu pour les objectifs suivants :

- Diagnostic de confirmation des cas cliniques sur le terrain (inclut la confirmation des cas suspects et un résultat positif à un test de dépistage).
- Estimation de la prévalence de l'infection afin de faciliter l'analyse de risque dans les fermes d'élevages produisant des crevettes et d'améliorer les pratiques de gestion. IMPORTANT – le kit de test ne doit pas être utilisé pour estimer la prévalence chez les crevettes au stade de géniteurs ou de post-larves aux fins de l'analyse de risque préalablement à leur transfert dans d'autres fermes ou pour traverser les frontières.
- Utilisation conjointe avec d'autres tests ou de procédures de diagnostic, comme aide au diagnostic ou aux fins d'autres évaluations cliniques ou épidémiologiques.

Le résumé des études de validation élaboré par le fabricant et approuvé par le Panel d'experts évaluateurs a été avalisé par la Commission et est présenté dans l'[annexe 39](#).

L'ajout du kit de test rapide « Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit, (Innocreate Bioscience Co., Ltd) » dans le Registre des kits de diagnostic de l'OMSA, dont l'aptitude à l'emploi a été validée, sera proposée à l'adoption lors de la 90^e Session générale en mai 2023.

.../Annexes

Annexe 1. Point 2 – Ordre du jour adopté

COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OMSA

Réunion en format hybride, le 19 janvier et du 15 au 22 février 2023

1. Accueil par la Directrice générale adjointe pour le Service des Normes internationales et la Science
2. Adoption de l'ordre du jour
3. Réunion avec la Directrice générale
4. Coopération avec la Commission des normes sanitaires pour les animaux terrestres
 - 4.1. Point d'actualité sur le chapitre 6.10. révisé « Usage responsable et prudent des agents antimicrobiens en médecine vétérinaire » du *Code terrestre*
 - 4.2. Point d'actualité sur le Groupe *ad hoc* chargé de la révision des chapitres 5.4. to 5.7. du *Code terrestre*
 - 4.3. Définitions du Glossaire : « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire »
 - 4.4. Chapitre 4.3. « Application de la compartimentation »
5. Coopération avec la Commission des normes biologiques
 - 5.1. Centres de référence : discussion sur les modèles de rapports annuels et l'utilisation des données collectées
 - 5.2. Manuels aquatiques et terrestres : domaines d'intérêt commun
 - 5.2.1. Examen du tableau de la Commission des animaux aquatiques sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) par la Commission des normes biologiques
 - 5.2.2. Version révisée du chapitre du *Manuel terrestre* sur la validation
 - 5.2.3. Addition d'une nouvelle section dans les chapitres spécifiques aux maladies visant à justifier la sélection des tests destinés à diverses fins figurant dans le tableau 1 « Test methods available and their purpose » et à expliquer leur notation
 - 5.2.4. Élaboration d'un modèle de rapport de validation des tests dans le *Manuel terrestre*
 - 5.3. Travaux sur la liste des réactifs de référence approuvés par l'OMSA
6. Plan de travail de la Commission des animaux aquatiques
7. Stratégie pour la santé des animaux aquatiques
8. *Code aquatique*
 - 8.1. Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2023
 - 8.1.1. Article 9.3.1. du chapitre 9.3. « Infection à *Hepatobacter penaei* (hépatopancréatite nécrosante) »
 - 8.1.2. Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. « Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse »
 - 8.1.3. Article 9.5.2 du chapitre 9.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse »
 - 8.1.4. Article 10.9.2. du chapitre 10.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »

-
- 8.1.5. Nouveau chapitre 10.X. « Infection par le virus du tilapia lacustre »
 - 8.1.6. Article 11.2.2. du chapitre 11.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* » et article 11.3.2. du chapitre 11.3. « Infection à *Bonamia ostreae* »
 - 8.1.7. Articles 11.4.1. et 11.4.2. du chapitre 11.4. « Infection à *Marteilia refringens* »
 - 8.1.8. Modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques
 - 8.2. Points portés à l'attention des Membres pour avis
 - 8.2.1. Remplacement de OIE par OMSA dans le *Code aquatique*
 - 8.2.2. Définitions du Glossaire : « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire »
 - 8.2.3. Article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologiques »
 - 8.2.4. Chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA »
 - 8.2.4.1. Infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique
 - 8.2.5. Chapitre 4.3. « Application de la compartimentation »
 - 8.2.6. Nouveau chapitre 4.X. « Préparation aux situations d'urgence sanitaire »
 - 8.2.7. Nouveau chapitre 4.Y. « Gestion des foyers de maladie »
 - 8.2.8. Nouveau chapitre 5.X. « Animaux aquatiques d'ornement »
 - 8.2.9. Nouveau chapitre 5.Y. « Echanges commerciaux de matériel génétique »
 - 8.2.10. Marchandises dénuées de risque – Articles X.X.3. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies
 - 8.2.10.1. Rapport d'un consultant sur les marchandises dénuées de risque
 - 8.2.10.2. Articles 8.X.3. révisés destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens
 - 8.2.10.3. Articles 9.X.3. révisés destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des crustacés
 - 8.2.10.4. Articles 10.X.3. révisés destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des poissons
 - 8.2.10.5. Articles 11.X.3. révisés destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques
 - 8.2.11. Modèles d'articles X.X.4.-X.X.8.
 - 8.2.12. Évaluation des périodes établies par défaut dans les articles X.X.4.-X.X.8. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies
 - 8.2.13. Article 9.8.2. du chapitre 9.8. « Infection par le virus du syndrome des points blancs »
 - 8.2.14. Articles 11.5.1. et 11.5.2. du chapitre 11.5. « Infection à *Perkinsus marinus* »
 - 8.2.15. Examen des maladies émergentes
 - 8.2.15.1. Infection par le virus de l'œdème de la carpe
 - 8.2.15.2. Covert mortality nodavirus (CMNV) chez le poisson zèbre
 - 8.2.16. Consultants en stratégie de la faune sauvage

9. *Manual aquatique*

9.1. Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2023

9.1.1. Section 2.2. Maladies des crustacés

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

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

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

9.1.2. Section 2.3. Maladies des poissons

9.1.2.1. Chapitre 2.3.1. « Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique) »

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

9.1.2.3. Section 2.2.1. du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »

9.1.3. Section 2.4. Maladies des mollusques

9.1.3.1. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.2. « Infection à *Bonamia exitiosa* »

9.1.3.2. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.3. « Infection à *Bonamia ostreae* »

9.1.3.3. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. « Infection à *Marteilia refringens* »

9.2. Éléments à prendre en considération

9.2.1. Remplacement de « OIE » par « OMSA » dans le *Manuel aquatique*

9.2.2. Chapitre 1.1.2. Principes et méthodes de validation des épreuves de diagnostic pour les maladies infectieuses

9.2.3. Section 2.2. Maladies des crustacés

9.2.3.1. Chapitre 2.2.0. « Informations générales : maladies des crustacés »

9.2.3.2. Chapitre 2.2.2. « Infection à *Aphanomyces astaci* (peste de l'écrevisse) »

9.2.3.3. Chapitre 2.2.5. « Infection par le virus de la myonécrose infectieuse »

9.2.3.4. Chapitre 2.2.6. « Infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* (maladie des queues blanches) »

9.2.3.5. Chapitre 2.2.7. « Infection par le virus du syndrome de Taura »

9.2.3.6. Chapitre 2.2.8. « Infection par le virus du syndrome des taches blanches »

9.2.3.7. Chapitre 2.2.9. « Infection par le génotype 1 du virus de la tête jaune »

9.2.4. Section 2.4. Maladies des mollusques

9.2.4.1. Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.5. « Infection à *Perkinsus marinus* »

9.2.5. Développement d'un dispositif visant à accélérer le processus d'actualisation des méthodes de diagnostic dans le *Manuel aquatique*, les rendant ainsi plus rapidement disponibles pour les Membres

10. Groupes *ad hoc*

10.1. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de crustacés à une infection par une maladie listée par l'OMSA

10.2. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons à une infection par une maladie listée par l'OMSA

-
- 10.3. Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques à une infection par une maladie listée par l'OMSA
 - 11. Centres de référence ou changement d'experts
 - 11.1. Évaluation des candidatures au statut de Centre de référence de l'OMSA dans le domaine de la santé des animaux aquatiques ou changements d'experts
 - 12. Sujets divers
 - 12.1. Pour discussion
 - 12.1.1. Enregistrement des kits de diagnostic
 - 12.1.2. Auto-déclarations d'absence de maladie
 - 12.1.3. Rapports des Commissions – présentation des annexes séparément du texte du rapport
 - 12.2. Pour information
 - 12.2.1. L'impact mondial des maladies animales (GBADs) – présentation des projets
 - 13. Revue de la réunion
 - 14. Prochaine réunion : 13 - 20 septembre 2023

Annexe 2. Point 2 – Liste des participants

COMMISSION DES NORMES SANITAIRES POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OMSA

Réunion en format hybride, le 19 janvier et du 15 au 22 février 2023

MEMBRES DE LA COMMISSION

Dr Ingo Ernst
(Président)
Director Aquatic Pest and Health
Policy,
Department of Agriculture, Fisheries
and Forestry,
Canberra,
AUSTRALIE

Dr Alicia Gallardo Lagno
(Vice-président)
Senior advisor FARMAVET,
University of Chile,
La Pintana,
CHILI

Dr Prof. Hong Liu
(Membre)
Deputy Director,
Animal and Plant Inspection and
Quarantine Technical Centre,
Shenzhen City,
CHINE (République populaire de)

Dr Fiona Geoghegan
(Vice-président)
Legislative Officer,
European Commission,
DG SANTE
Brussels,
BELGIQUE

Dr Kevin William Christison
(Membre)
Specialist Scientist,
Department of Forestry, Fisheries
and the Environment,
Vlaeberg,
AFRIQUE DU SUD

Dr Espen Rimstad
(Membre)
Professor in Virology,
Norwegian University of Life
Sciences
Ås,
NORVÈGE

AUTRES PARTICIPANTS

Dr Mark Crane
CSIRO Honorary Fellow,
Research Group Leader | AAHL Fish
Diseases Laboratory
Australian Centre for Disease
Preparedness (ACx DP) | CSIRO,
Geelong,
AUSTRALIE

Prof Edmund Peeler
Epidemiologist
Aquatic Pests and Pathogens,
Barrack Road, Weymouth
Dorset, DT4 8UB
ROYAUME-UNI

SIÈGE DE L'OMSA

Dr Gillian Mylrea
Cheffe
Service des Normes

Dr Kathleen Frisch
Coordinatrice scientifique pour la
santé des animaux aquatiques
Service des Normes

Ms Sara Linnane
Agent scientifique – Normes
internationales
Service des Sciences

Dr Bernita Giffin
Coordinatrice scientifique pour la santé
des animaux aquatiques
Service des Normes

Dr Gounalan Pavade
Coordinateur scientifique
Service des Sciences

Annexe 3. Point 5. – Plan de travail et priorités

PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES

(y compris le calendrier prévisionnel pour le recueil des commentaires et pour adoption)

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Suivi des maladies émergentes et examen des actions à prendre	En cours				
Définitions du Glossaire : Autorité compétente, Autorité vétérinaire et Services chargés de la santé des animaux aquatiques	Examen de l'usage dans le <i>Code aquatique</i> et présentation des amendements pour commentaire		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 1.3. Maladies listées par l'OMSA – Inclusion de l'infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique dans la Liste des maladies de l'OMSA	Examen des commentaires des Membres (premier cycle de consultation)		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Procédures officielles pour l'auto-déclaration de statut indemne	Rédaction d'un modèle d'auto-déclaration afin d'accompagner les Membres lors de la soumission de leurs auto-déclarations	Mise en ligne sur le site web de l'OMSA avant la Session générale			
Article 1.1.5. du chapitre 1.1. Notification des maladies et communication des informations épidémiologique	Révision et amendement de l'article 1.1.5. et soumission pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 4.3. Application de la compartimentation	Examen des réponses des Membres au questionnaire et lancement du travail sur le projet de document de discussion		Soumission du document de discussion pour avis	Examen des réponses fournies au sujet du document de discussion	
Chapitre 4.X. Nouveau projet de chapitre sur la préparation aux situations d'urgence	Poursuite des travaux sur le projet de chapitre 4.X.		Soumission du projet pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Chapitre 4.Y. Nouveau projet de chapitre sur la gestion des foyers de maladie	Poursuite des travaux sur le projet de chapitre 4.Y.		Soumission du projet de chapitre pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitres 5.6. – 5.9.	Examen du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> rattaché à la Commission du Code		Examen du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> rattaché à la Commission du Code		
Chapitre 5.X. Commerce d'animaux aquatiques d'ornement	Révision d'une ébauche de projet de chapitre		Soumission du projet de chapitre pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 5.Y. Commerce de matériels génétiques	Révision d'une ébauche de projet de chapitre		Soumission du projet de chapitre pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 6.2. Principes d'usage prudent et responsable des agents antimicrobiens chez les animaux aquatiques	Mise à disposition d'un rapport de suivi par la Commission du Code sur la révision en cours du chapitre 6.10. du <i>Code terrestre</i>		Rapport de suivi remis par la Commission du Code sur la révision en cours du chapitre 6.10. du <i>Code terrestre</i>	Rapport de suivi remis par la Commission du Code sur la révision en cours du chapitre 6.10. du <i>Code terrestre</i>	
Espèces sensibles Évaluation de nouvelles espèces ou de nouveaux éléments probants portant sur des maladies précédemment évaluées si besoin	En cours				
Marchandises dénuées de risques – chapitres spécifiques aux maladies Articles 8.X.3.– Amphibiens Articles 9.X.3.– Crustacés Articles 10.X.3.– Poissons Articles 10.X.3.– Mollusques	Amphibien : Revue des commentaires des Membres (premier cycle de consultation), et amendement des articles en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
	Crustacé : articles modifiés en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques et soumission pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
	Poissons : articles modifiés en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques et soumission pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
	Mollusques : Revue des commentaires des Membres (premier cycle de consultation), et amendement des articles en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Évaluation des périodes établies par défaut dans les articles X.X.4. – X.X.8. des chapitres spécifiques aux maladies			Soumission de l'évaluation des périodes établies par défaut pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Espèces sensibles – Maladies des crustacés – Articles 9.X.1. et 9.X.2. pour :	Nouvelle convocation d'un Groupe <i>ad hoc</i> et tenue de la prochaine réunion en mars 2023		Infection par le virus iridescent des décapodes : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
– l'infection par le virus iridescent des décapodes					
– l'infection par le virus du syndrome des points blancs					
– l'infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse)				Infection par le virus du syndrome des points blancs : revue du rapport du	
– l'examen de nouveaux éléments					

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
probants portant sur des maladies précédemment évaluées				Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	
Article 9.3.1. du chapitre 9.3. Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Article 9.5.2. du chapitre 9.5. Infection par le virus de la myonécrose infectieuse	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Espèces sensibles – Maladies des poissons – Articles 10.X.1. et 10.X.2. pour : <ul style="list-style-type: none"> – l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise – l'infection par le virus du tilapia lacustre – l'infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (syndrome ulcératif épizootique) 	Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i>				
	Infection par le virus du tilapia lacustre : tenue de la prochaine réunion du Groupe <i>ad hoc</i> en avril 2023		Infection par le virus du tilapia lacustre : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
				Syndrome ulcératif épizootique : revue du rapport d'étape du Groupe <i>ad hoc</i>	
Article 10.9.2. du chapitre 10.9. Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 10.X. Infection par le virus du tilapia lacustre	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Espèces sensibles – Maladies des mollusques – Articles 11X.1. et 11X.2. pour : – l’infection à <i>Marteilia refringens</i> – l’infection à <i>Perkinsus marinus</i> – l’infection à <i>Xenohaliotis californiensis</i> – l’infection à <i>Perkinsus olseni</i>	<i>Marteilia refringens</i> : examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			
	<i>Perkinsus marinus</i> : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption
			<i>Perkinsus olseni</i> : revue du rapport d’étape du Groupe <i>ad hoc</i>	<i>Perkinsus olseni</i> : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	
Espèces sensibles – Article 11.2.2. du chapitre 11.2. Infection à <i>Bonamia exitiosa</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			
Espèces sensibles – Article 11.3.2. du chapitre 11.3. Infection à <i>Bonamia ostrea</i> »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			
Modèles d’articles 11.X.9. – 11.X.14. : harmonisation avec d’autres chapitres spécifiques aux maladies	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			

Manual aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Section 2.2.0. Dispositions générales – Crustacés	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption
Chapitre 2.1.1. Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			

Manual aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Chapitre 2.2.2. Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse)	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 2.2.3. Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.4. Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuses	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.5. Infection par le virus de la myonécrose infectieuse	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.6. Infection par le nodavirus de <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (maladie des queues blanches)	Examen de la version réactualisée du projet de texte et soumission pour commentaire		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 2.2.7. Infection par le virus du syndrome de Taura	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.8. Infection par le virus du syndrome des points blancs	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.X. Infection par le virus 1 iridescent des décapodes			Examen de la version réactualisée du projet de texte et soumission pour commentaire	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 2.3.1. Infection à <i>Aphanomyces invadans</i> (syndrome ulcératif épizootique)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.3.2. Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Sections 2.2.2. du chapitre 2.3.9. Infection	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			

Manual aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
par le virus de la virémie printanière de la carpe	de consultation)				
Chapitre 2.3.X. Infection par le virus du tilapia lacustre			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 2.4.0. Informations générales			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 2.4.1. Infection par l'herpesvirus de l'ormeau			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. Infection à <i>Marteilia refringens</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Section 2.2.2. du chapitre 2.4.2. Infection à <i>Bonamia exitiosa</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.4.3. Infection à <i>Bonamia ostreae</i>			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Section 2.2.2. du chapitre 2.4.2. Infection à <i>Bonamia ostreae</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.4.7. Infection à <i>Xenohaliotis californiensis</i>			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis		

CHAPITRE 9.3.

INFECTION À *HEPATOBACTER PENA EI* (HEPATOPANCRÉATITE
NÉCROTISANTE)

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*~~ *Hepatobacter penaei* ; appartenant à la famille des Holosporaceae et à l'ordre des Rickettsiales 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*.

[...]

Annexe 5. Point 7.2. – Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

CHAPITRE 9.4.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HYPODERMIQUE ET HÉMATOPOÏÉTIQUE INFECTIEUSE

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 penstyldensovirus penstylhamaparvovirus 1 des décapodes, ~~communément désigné comme le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique~~ ; il s'agit d'un *agent pathogène* appartenant au genre *Penstyldensovirus* 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*) et la crevettes à pattes jaunes (*Penaeus californiensis*).

[...]

CHAPITRE 9.5.
INFECTION PAR LE VIRUS
DE LA MYONÉCROSE INFECTIEUSE

[...]

Article 9.5.2.

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 tigrée brune (*Penaeus esculentus*), la crevette banana banane (*Penaeus merguensis*), la crevette tigrée sombre (*Penaeus esculentus*)~~ et la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*).

[...]

CHAPITRE 10.9.
INFECTION PAR LE VIRUS
DE LA VIRÉMIE PRINTANIÈRE DE LA CARPE

[...]

Article 10.9.2.

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. :

Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Bbrème (= brème d'eau douce)
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Carpe à grosse tête
	<i>Carassius auratus</i>	Ccyprin doré (= poisson rouge; = carpe dorée)
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Ccarpe herbivore (= carpe chinoise; = carpe de roseau)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Ccarpe commune (toutes les variétés et sous-espèces)
	<i>Danio rerio</i>	Ppoisson zèbre
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	[Ggolden shiner]
	<i>Pimephales promelas</i>	Ttête de boule-vairon à grosse tête (=méné à grosse tête du Nord ; = vairon à grosse tête)
	<i>Percocypris pingi</i>	[Jinsha barbel base carp]
	<i>Rutilus kutum</i>	[Caspian white fish]
	<i>Rutilus rutilus</i>	Ggardon
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Ssilure glane

[...]

Annexe 8. Point 7.5. – Chapitre 10.X. Infection par le virus du tilapia lacustre

CHAPITRE 10.X.

INFECTION PAR LE VIRUS DU TILAPIA LACUSTRE

Article 10.X.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus du tilapia lacustre » désigne une *infection* causée par *Tilapia tilapiaevirus*. Il s'agit d'un *agent pathogène* appartenant au genre *Tilapiaevirus* et à la famille des *Amnoonviridae*.

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

Article 10.X.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. : [*Oreochromis aureus*, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*, *Sarotherodon galilaeus*, Tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), *Oreochromis niloticus*, *Tilapia zilli*, *Barbonymus schwanenfeldii*, *Tristramella simonis* et *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*] (à l'étude).

Article 10.X.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 le virus du tilapia lacustre

Les *produits issus d'animaux aquatiques* ~~suivants 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 au virus du tilapia lacustre, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre :

- 1) ~~{~~ *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 5660°C pendant au moins ~~une~~ 120 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du tilapia lacustre ;
- 2) *farine* de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 5660°C pendant au moins ~~une~~ 120 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du tilapia lacustre ; ~~(à l'étude)~~
- 3) huile de poisson ;
- 4) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

Article 10.X.4.

Exigences pour l'auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre

Un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour l'intégralité du pays, une *zone* ou un *compartiment* conformément aux dispositions des articles 10.X.5. à 10.X.8., le cas échéant. L'auto-déclaration

d'absence de maladie doit également être déposée conformément aux autres exigences pertinentes du *Code aquatique*, qui prévoient entre autres que l'État membre satisfasse aux conditions suivantes :

- 1) il respecte les dispositions du chapitre 3.1., et
- 2) il utilise des méthodes de *diagnostic* appropriées, telles que recommandées dans le *Manuel aquatique*, et
- 3) il répond à toutes les exigences mentionnées dans le chapitre 1.4. qui sont pertinentes pour l'auto-déclaration d'absence de maladie.

Article 10.X.5.

Pays indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

En cas de partage des étendues d'eau avec d'autres pays, un pays ne peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre que si toutes les étendues d'eau partagées sont situées dans des pays ou des zones déclarés indemnes de cette *infection* (voir l'article 10.X.6.).

Comme indiqué à l'article 1.4.4., un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour l'ensemble de son *territoire* s'il peut démontrer :

- 1) qu'aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 10.X.2. n'est présente dans le pays et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* sont réunies sans discontinuer depuis au moins [six mois] ;

OU

- 2) qu'aucune infection par le virus du tilapia lacustre n'est apparue depuis au moins [10] ans, et :
 - a) que l'État membre peut démontrer que les conditions propices à l'expression clinique de l'infection par le virus du tilapia lacustre sont réunies, comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
 - b) que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* telles que décrites dans le chapitre 1.4. sont réunies sans discontinuer depuis au moins [10] ans ;

OU

- 3) qu'une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre depuis au moins [deux] ans sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* ont été réunies sans discontinuer et mises en œuvre au moins [un] an avant le commencement de la *surveillance ciblée* ;

OU

- 4) que le pays, après avoir déposé une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du tilapia lacustre, mais que les conditions suivantes sont remplies :
 - a) dès la détection du virus du tilapia lacustre, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
 - b) les populations touchées par l'*infection* de la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité de nouvelle transmission du virus du tilapia lacustre, et les opérations appropriées de *désinfection* (décrites au chapitre 4.4.) ont été menées à bien et suivies d'une période de *vide sanitaire* comme indiqué au chapitre 4.7., et
 - c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du tilapia lacustre, et
-

-
- d) une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est exercée :
- i) depuis au moins [deux] ans sur les *espèces sensibles* d'élevage et sauvages sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, ou
 - ii) depuis au moins [un] an sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée dans le cas où les *établissements d'aquaculture* touchés ne présentent aucun lien épidémiologique avec des populations sauvages d'*espèces sensibles*.

Entre-temps, la partie du pays située en dehors de la zone infectée et des zones de protection tout ou partie du pays, à l'exclusion des zones infectées et des zones de protection, peut être déclarée zone indemne conformément à l'article 1.4.4. pour autant que les points 4 a) à 4 c) se soient concrétisés, sous réserves que les conditions énoncées au point 2 de l'article 10.X.6. soient remplies.

Article 10.X.6.

Zone indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

En cas d'extension au-delà du *territoire* de plus d'un pays, une *zone* ne peut être déclarée indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué dans l'article 1.4.4., un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour une *zone* établie sur son *territoire* s'il peut démontrer :

- 1) qu'aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 10.X.2. n'est présente et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* sont réunies sans discontinuer depuis au moins [six mois] ;

OU

- 2) qu'aucune infection par le virus du tilapia lacustre n'est apparue depuis au moins [dix] ans, et :
 - a) que l'État membre peut démontrer que les conditions propices à l'expression clinique de l'infection par le virus du tilapia lacustre sont réunies, comme décrit à l'article 1.4.8. du chapitre 1.4., et
 - b) que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* telles que décrites dans le chapitre 1.4. sont réunies sans discontinuer dans la *zone* depuis au moins [dix] ans ;

OU

- 3) qu'une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre dans la *zone* depuis au moins [deux] ans sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* ont été réunies sans discontinuer et mises en œuvre au moins [un] an avant le commencement de la *surveillance ciblée* ;

OU

- 4) que le pays, après avoir déposé une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du tilapia lacustre dans cette *zone*, mais que les conditions suivantes sont remplies :
 - a) dès la détection du virus du tilapia lacustre, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
 - b) les populations touchées par l'*infection* de la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité de nouvelle transmission du virus du tilapia lacustre, et les opérations appropriées de *désinfection* (décrites au chapitre 4.4.) ont été menées à bien et suivies d'une période de *vide sanitaire* comme indiqué au chapitre 4.7., et

-
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du tilapia lacustre, et
 - d) une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre depuis au moins [deux] ans sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée.

Entre-temps, une partie de la zone située en dehors de la zone infectée et des zones de protection peut être déclarée comme une nouvelle zone indemne conformément à l'article 1.4.4., pour autant que les points 4 a) à 4 c) se soient concrétisés.

Article 10.X.7.

Compartiment indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Comme indiqué dans l'article 1.4.4., un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour un *compartiment* établi sur son *territoire* s'il peut démontrer :

- 1) qu'une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre dans le *compartiment* depuis au moins [un] an sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* ont été réunies sans discontinuer et mises en œuvre au moins [un] an avant le commencement de la *surveillance ciblée* ;

OU

- 2) que le pays, après avoir déposé une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour un *compartiment*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du tilapia lacustre dans ce *compartiment*, mais que les conditions suivantes sont remplies :

- a) tous les *animaux aquatiques* détenus dans le *compartiment* ont été abattus et éliminés par des moyens réduisant autant que possible la probabilité de nouvelle transmission du virus du tilapia lacustre, les opérations de *désinfection* appropriées (décrites au chapitre 4.4.) ont été menées à bien, et un *vide sanitaire* a été mis en place dans le *compartiment* comme indiqué au chapitre 4.7., et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement, incluant le *plan de sécurité biologique* applicable au *compartiment*, ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis le repeuplement avec des *animaux aquatiques* issus d'une source agréée indemne d'agents pathogènes, dans le respect des exigences mentionnées dans l'article 10.X.9. ou dans l'article 10.X.10. selon le cas, et
- c) une surveillance ciblée, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre dans le compartiment depuis au moins [un] an une étude concernant l'infection par le virus du tilapia lacustre a été réalisée au moins [six mois] après le repeuplement (comme décrit à l'article 1.4.14.) sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée.

Article 10.X.8.

Maintien du statut indemne

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* qui est déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre conformément aux dispositions prévues aux articles 10.X.4. à 10.X.7. (selon le cas) peut conserver son statut indemne au regard de cette *infection* sous réserve que les exigences mentionnées à l'article 1.4.15. soient constamment respectées.

Article 10.X.9.

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

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., ou de *produits issus d'animaux aquatiques* dérivés de ces espèces, à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le virus du

tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente* du *pays exportateur*. Le *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* ou des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une zone ou un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre sur la base des procédures définies par les articles 10.X.5., 10.X.6. ou 10.X.7. (selon le cas) et 10.X.8.

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

Le présent article ne s'applique pas aux *produits issus d'animaux aquatiques visés énumérés* à l'article 10.X.3.

Article 10.X.10.

Importation d'animaux aquatiques à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2. à des fins d'*aquaculture* à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé à cette importation conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures d'atténuation du *risque* prévues aux points 1 et 2 ci-dessous.

- 1) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et
 - b) avant leur départ de *quarantaine* (qu'il s'agisse de l'installation d'origine ou d'une autre installation de *quarantaine* jusqu'à laquelle les animaux ont été transportés dans des conditions de *sécurité biologique* adéquates), la mise à mort et la transformation des *animaux aquatiques* en l'un ou plusieurs des *produits issus d'animaux aquatiques* visés à l'article 10.X.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
 - c) le traitement de toute l'eau utilisée pour le transport ainsi que de tous les équipements, effluents et déchets afin d'inactiver le virus du tilapia lacustre conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5.

OU

- 2) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'*aquaculture*, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) dans le *pays exportateur* :
 - i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des *animaux aquatiques* qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'*animaux aquatiques* présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre ;
 - b) dans le *pays importateur* :
 - i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de *quarantaine* ;
 - ii) tester la population F-0 aux fins de la recherche du virus du tilapia lacustre conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en *quarantaine* ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de *quarantaine* pendant une durée suffisante, et dans des conditions propices, pour permettre l'expression clinique de l'infection par le virus du tilapia lacustre, et prélever des

échantillons et tester la présence du virus du tilapia lacustre chez cette population conformément au chapitre 1.4. du *Code aquatique* et au chapitre X.X.6. du *Manuel aquatique* ;

- v) si le virus du tilapia lacustre n'est pas détecté dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre et libérée de sa *quarantaine* ;
- vi) si le virus du tilapia lacustre est détecté dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine*, et sera tuée puis éliminée de manière biosécurisée, conformément au chapitre 4.8.

Article 10.X.11.

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

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., ou de *produits issus d'animaux aquatiques* dérivés de ces espèces, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou d'entreposage jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits visés à l'article 10.X.3. ou au point 1 de l'article 10.X.14. ou en ~~l'un des~~ autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, *conteneurs* et matériaux d'emballage utilisés lors du transport ~~en vue d'assurer l'inactivation dans des conditions permettant d'inactiver~~ le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

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

Article 10.X.12.

Importation d'animaux aquatiques ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, ~~et~~ les usages agricoles, industriels, ~~ou~~ pharmaceutiques ~~ou~~ ~~de~~ la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., ou de *produits issus d'animaux aquatiques* dérivés de ces espèces, destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, ~~et~~ les usages agricoles, industriels, ~~ou~~ pharmaceutiques ~~ou~~ ~~de~~ la recherche, à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou d'entreposage jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits visés à l'article 10.X.3. ou en l'un des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, *conteneurs* et matériaux d'emballage utilisés lors du transport ~~en vue d'assurer l'inactivation dans des conditions permettant d'inactiver~~ le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

Article 10.X.13.

Importation d'animaux aquatiques destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2. qui sont destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit veiller :

- 1) à la livraison directe du chargement, ainsi qu'à son maintien, dans des installations de *quarantaine* agréées par l'*Autorité compétente*, et
- 2) au traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, *conteneurs* et matériaux d'emballage utilisés lors du transport en vue d'assurer l'inactivation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) au traitement de tous les effluents et déchets issus des installations de *quarantaine* des laboratoires ou des établissements zoologiques dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8., et
- 4) à l'élimination des cadavres conformément au chapitre 4.8.

Article 10.X.14.

Importation ou transit par le territoire de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre

- 1) [Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée au virus du tilapia lacustre quand elles autorisent l'importation (ou le transit par leur territoire) des marchandises produits issus d'animaux aquatiques suivantes qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.2. :

- a) filets ou de darnes ou pavés de poisson (à l'état réfrigéré)] (à l'étude).

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

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

- 2) Lors d'une importation de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., à l'exclusion de ceux visés au point 1 qui précède, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation et appliquer des mesures appropriées visant à atténuer ce *risque*.

CHAPITRE 11.2.
INFECTION À *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Article 11.2.2.

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. : l'huître argentine (*Ostrea puelchana*), *Magallana* [syn. *Crassostrea*] *ariakensis*, l'huître plate australienne (*Ostrea angasi*), l'huître plate chilienne (*Ostrea chilensis*), *Ostrea equestris*, l'huître creuse américaine (*Crassostrea virginica*), l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), et l'huître plate indigène (*Ostrea lurida*). et l'huître creuse de Suminoe (*Magallana* (syn. *Crassostrea*) *ariakensis*).

[...]

CHAPITRE 11.3.
INFECTION À *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Article 11.3.2.

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. : *Magallana* [syn. *Crassostrea*] *ariakensis*, l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), l'huître plate chilienne (*Ostrea chilensis*) et l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), *Magallana* (syn. *Crassostrea*) *ariakensis*.

[...]

CHAPITRE 11.4.
INFECTION À *MARTEILIA REFRINGENS*

Article 11.4.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection à *Marteilia refringens* » désigne une infection causée exclusivement par *Marteilia refringens* (y compris les types O et M); il s'agit d'un agent pathogène appartenant à la famille des Marteiliidae.

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

Article 11.4.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent à la moule commune (*Mytilus edulis*), à l'huitre naine (*Ostrea stentina*), à l'huitre plate européenne (*Ostrea edulis*), au couteau d'Europe (*Solen marginatus*), à *Xenostrobus securis*, à l'huitre plate australienne (*Ostrea angasi*), à l'huitre plate argentine (*Ostrea puelchana*), à l'huitre plate chilienne (*Ostrea chilensis*), à la moule commune (*Mytilus edulis*) et à la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) et à la petite praire (*Chamelea gallina*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

[...]

Annexe 12. Point 7.8. – Modèles d'articles 11.X.9. – 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

Modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

CHAPITRE 11.X.

INFECTION PAR [L'AGENT PATHOGÈNE X]

[...]

Article 11.X.9.

Importation d'animaux aquatiques ~~et~~ ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* ~~et de produits issus d'animaux aquatiques~~ appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des espèces visées à l'article 11.2.2. dérivés de ces espèces, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur, ~~ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur, et attestant~~ Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* ~~et~~ ou des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X] sur la base des procédures définies par les articles 11.X.4~~5~~, ~~ou~~ 11.X.5-6, ou 11.X.7. (selon le cas) et 11.X.6~~8~~.

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

Le présent article ne s'applique pas aux ~~marchandises~~ produits issus d'animaux aquatiques visés ~~énumérés~~ au point 1 de l'article 11.X.3.

Article 11.X.10.

Importation d'animaux aquatiques à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2. à des fins d'aquaculture à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures d'atténuation du *risque* prévues aux points 1 et 2 ci-dessous.

- 1) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et
 - b) avant leur départ de quarantaine (qu'il s'agisse de l'installation d'origine ou d'une autre installation de quarantaine jusqu'à laquelle les animaux ont été transportés dans des conditions de sécurité biologique adéquates), la mise à mort et la transformation des animaux aquatiques en l'un ou plusieurs des produits issus d'animaux aquatiques visés au point 1 de l'article 11.X.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et

-
- c) le traitement de toute l'eau utilisée pour le transport ainsi que de tous les équipements, effluents et déchets afin d'inactiver [l'agent pathogène X] conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5.

OU

- 2) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants :
- a) dans le *pays exportateur* :
- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des *animaux aquatiques* qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'*animaux aquatiques* présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par [l'agent pathogène X] ;
- b) dans le *pays importateur* :
- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de *quarantaine* ;
 - ii) tester la population F-0 aux fins de la recherche de [l'agent pathogène X] conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en *quarantaine* ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de *quarantaine* pendant une durée suffisante, et dans des conditions propices, pour permettre l'expression clinique de l'infection par [l'agent pathogène X] (tels qu'ils sont décrits au chapitre 2.4.X. du *Manuel aquatique*), et prélever des échantillons et tester la présence de [l'agent pathogène X] chez cette population conformément au chapitre 1.4. du *Code aquatique* et du chapitre 2.4.X. du *Manuel aquatique* ;
 - v) si [l'agent pathogène X] n'est pas détecté dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par [l'agent pathogène X] et libérée de sa *quarantaine* ;
 - vi) si [l'agent pathogène X] est détecté dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine*, et sera tuée puis éliminée de manière biosécurisée conformément au chapitre 4.8.

Article 11.X.11.

Importation d'animaux aquatiques et/ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors de l'importation, d'*animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques dérivés de ces espèces*, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques dérivés de ces espèces*, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'*Autorité compétente* du *pays importateur* doit apprécier le *risque* associé à cette importation et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, *ainsi que son maintien et son entreposage* dans des installations de *quarantaine* ou *d'entreposage jusqu'à ce qu'il soit transformé* de confinement jusqu'au moment de sa transformation en l'un des produits visés au point 1 de l'article 11.X.3. ou *produits décrits* au point 1 de l'article 11.X.12-14., ou *encore* en d'autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) *ainsi que de l'ensemble des équipements, conteneurs et matériaux d'emballage* utilisés lors du transport *et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation* dans des conditions permettant d'inactiver en vue d'assurer l'inactivation de [l'agent pathogène X] ou de les

éliminer de manière à empêcher leur contact avec des espèces sensibles biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et

- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

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

Article 11.X.12.

Importation d'animaux aquatiques ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, et les usages agricoles, industriels, ou pharmaceutiques ou et de la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors de l'importation d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques dérivés de ces espèces, destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, et les usages agricoles, industriels, ou pharmaceutiques ou et de la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien, dans des installations de quarantaine ou d'entreposage en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits visés au point 1 de l'article 11X.3. ou en d'autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, conteneurs et matériaux d'emballage utilisés lors du transport résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver en vue d'assurer l'inactivation de [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

Le présent article ne s'applique pas aux merchandises visées au point 1 de l'article 11.2.3.

Article 11.X.13.

[Note : il s'agit d'un nouvel article devant être aligné sur les autres chapitres spécifiques aux maladies figurant dans le *Code aquatique*.]

Importation d'animaux aquatiques destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors d'une importation d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2. qui sont destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit veiller :

- 1) à la livraison directe du chargement, ainsi qu'à son maintien, dans des installations de quarantaine agréées par l'Autorité compétente, et
- 2) au traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, conteneurs et matériaux d'emballage utilisés lors du transport en vue d'assurer l'inactivation dedans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) au traitement de tous les effluents et déchets issus des installations de quarantaine des laboratoires ou des établissements zoologiques dans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8., et

4) à l'élimination des cadavres conformément au chapitre 4.8.

Article 11.X.1314.

Importation ~~(ou transit par le territoire)~~ d'animaux aquatiques et de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X] indépendamment du statut sanitaire du pays exportateur ou de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par [l'agent pathogène X]

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par [l'agent pathogène X], les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à ~~l'infection par~~ [l'agent pathogène X] quand elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* des ~~marchandises~~ produits issus d'animaux aquatiques suivantes qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions énoncées à l'article 5.4.2. :

a) [...].

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

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

- 2) Lors d'une importation ~~d'animaux aquatiques~~ et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., à l'exclusion de ceux visés au point 1 qui précède, ~~dérivés d'une des espèces visées à l'article 11.X.2.~~ à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation et appliquer des mesures appropriées visant à réduire atténuer ce *risque*.

Annexe 13. Point 8.1. – Définitions du Glossaire : « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire »

Article	Numéro de page dans le Code aquatique de 2022	Usage
Guide de l'utilisateur : B.5.	vii	5) Les normes figurant dans les chapitres du titre 3 ont pour objet la mise en place, le maintien et l'évaluation des Services chargés de la santé des animaux aquatiques, y compris les questions afférentes à la communication. Ces normes visent à aider les <u>Services chargés de la santé des animaux aquatiques et les Autorités compétentes des États membres</u> à atteindre leurs objectifs d'amélioration de la santé des animaux aquatiques et du bien-être des poissons d'élevage, ainsi qu'à instaurer et préserver la confiance dans leurs certificats sanitaires internationaux relatifs aux animaux aquatiques.
Guide l'utilisateur : C.8.	xi	8) Certificats sanitaires internationaux pour les animaux aquatiques Un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques est un document officiel que l'Autorité compétente du pays exportateur délivre conformément aux chapitres 5.1. et 5.2. Il énonce les exigences auxquelles répondent les marchandises exportées en matière de santé des animaux aquatiques. C'est de la qualité des Services chargés de la santé des animaux aquatiques du pays exportateur, notamment des principes éthiques <u>de l'Autorité compétente pertinente</u> régissant l'établissement des certificats sanitaires et de l'expérience <u>des Services chargés de la santé des animaux aquatiques de l'Autorité vétérinaire</u> dans la satisfaction des obligations en matière de notification, que dépend l'assurance qu'auront les partenaires commerciaux de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques.
Glossaire	xiii	NOTIFICATION désigne la procédure par laquelle : a) l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> porte à la connaissance du <i>Siège</i> , b) le <i>Siège</i> porte à la connaissance des Autorités compétentes <u>de l'Autorité vétérinaire</u> des États membres l'apparition d'une <i>maladie</i> , conformément aux dispositions prévues au chapitre 1.1.
Article 1.1.1.	1	Aux fins du <i>Code aquatique</i> et conformément aux dispositions prévues aux articles 5, 9 et 10 des Statuts organiques de l'OMSA, les États membres reconnaissent au <i>Siège</i> le droit de communiquer directement avec l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> de son ou de ses <i>territoires</i> . Toute <i>notification</i> ou toute information adressée par l'OMSA à l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> est considérée comme ayant été adressée à l'État dont elle relève et toute <i>notification</i> ou toute information adressée à l'OMSA par l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> est considérée comme ayant été envoyée par l'État dont elle relève.
Article 1.1.3. paragraphe 1	2	Sous la responsabilité du Délégué, l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> adressera au <i>Siège</i> :

Article 1.1.4. paragraphe 1	2	Sous la responsabilité du Délégué, L'Autorité compétente <u>L'Autorité vétérinaire</u> adressera au <i>Siège</i> :
Article 1.1.5. point 1	2	L'Autorité compétente <u>L'Autorité vétérinaire</u> d'un pays comptant une <i>zone</i> ou un <i>compartiment</i> infecté avisera le <i>Siège</i> dès que ce pays, cette <i>zone</i> ou ce <i>compartiment</i> aura recouvré le statut indemne au regard de la <i>maladie</i> considérée.
Article 1.1.5. point 3	2	L'Autorité compétente <u>L'Autorité vétérinaire</u> d'un État membre qui a établi une ou plusieurs <i>zones indemnes</i> ou un ou plusieurs <i>compartiments indemnes</i> , doit en informer le <i>Siège</i> en donnant les détails nécessaires, notamment les critères sur lesquels repose le statut de territoire indemne et les conditions applicables de maintien de ce statut, et en indiquant clairement l'emplacement de ces <i>zones</i> et de ces <i>compartiments</i> sur une carte du territoire de l'État membre.
Article 3.1.2. point 7 paragraphe 3	36	Les Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>Les Autorités compétentes</u> doivent définir et consigner par écrit les responsabilités et l'organisation (notamment de la chaîne de commandement) de la structure chargée de la délivrance des <i>certificats sanitaires internationaux applicables aux animaux aquatiques</i> .
Article 3.1.2. point 10	37	10. <u>Demandes d'information, réclamations et recours</u> Les Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>L'Autorité compétente pertinente</u> doivent s'engager à répondre aux sollicitations des Services chargés de la santé des animaux aquatiques de l'Autorité compétente des autres États membres ou de toute autre autorité , en veillant notamment à ce que les demandes d'information, les réclamations et les recours soient traités dans un délai raisonnable. Un relevé de toutes ces réclamations et de tous ces recours, ainsi que des suites que les Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>L'Autorité compétente</u> leur auront réservées, doit être tenu.
Article 3.1.5. paragraphe 4	38	L'(les) expert(s) réalise(nt) l'évaluation des <i>Services chargés de la santé des animaux aquatiques</i> de l'État membre en prenant pour guide l'ouvrage « <i>Outil de l'OMSA pour l'évaluation des performances des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques (Outil PVS de l'OMSA : animaux aquatiques)</i> ». La mise en pratique de l'outil doit être adaptée au contexte de l'évaluation. L'(les) expert(s) rédige(nt) un rapport après consultation des <i>Services chargés de la santé des animaux aquatiques</i> de l'État membre.
Article 3.2.1. paragraphe 2	39	Il est primordial de reconnaître la communication en tant que discipline au sein des <i>Services chargés de la santé des animaux aquatiques</i> et de l'y intégrer afin de permettre le bon fonctionnement de ces <i>Services</i> . L'intégration de compétences en santé des <i>animaux aquatiques</i> et en communication est essentielle pour une communication efficace. La communication entre les Services chargés de la santé des animaux aquatiques et les Services vétérinaires (en particulier lorsque les Services chargés de la santé des animaux aquatiques sont distincts et indépendants des Services vétérinaires) est capitale.
Article 4.2.3. point 1	55	1) L'étendue d'une <i>zone</i> doit être fixée par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>L'Autorité compétente</u> , en s'appuyant sur la définition du terme <i>zone</i> , et être rendue publique par des canaux officiels.

Article 4.2.3. point 3	55	3) Les facteurs définissant un <i>compartiment</i> doivent être établis par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>l'Autorité compétente</u> , en s'appuyant sur des critères pertinents tels que les pratiques de gestion et d'élevage reposant sur la sécurité biologique. Ils doivent être rendus publics par des canaux officiels.
Article 4.2.3. Point 6	56	6) Le <i>plan de sécurité biologique</i> fourni pour un <i>compartiment</i> doit consigner par écrit le partenariat entre l'entreprise ou le secteur industriel concerné et le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>l'Autorité compétente</u> , ainsi que leurs responsabilités respectives (procédures de supervision de l'opération relative au <i>compartiment</i> par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>l'Autorité compétente</u> y compris).
Article 5.3.4. point 2) a)	93	a) infrastructure : comprend le support réglementaire (par exemple, les lois relatives à la santé des animaux aquatiques) et les systèmes administratifs (par exemple, organisation des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>de l'Autorité compétente</u>) ;
Article 5.3.7. point 1) d) i)	96	i) l'évaluation des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques du pays exportateur ;
Article 5.3.7. point 2) e) i)	97	ii) l'évaluation des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques du pays exportateur ;

Annexe 14. Point 8.2. – Article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologique »

CHAPITRE 1.1.

NOTIFICATION DES MALADIES ET COMMUNICATION DES
INFORMATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

[...]

Article 1.1.5.

- 1) ~~L'Autorité compétente d'un pays comptant une zone ou un compartiment infecté avisera le Siège dès que ce pays, cette zone ou ce compartiment aura recouvré le statut indemne au regard de la maladie considérée.~~
- 2) ~~Un pays, une zone ou un compartiment peut être considéré comme ayant recouvré le statut indemne d'une maladie déterminée s'il remplit toutes les conditions énoncées dans le Code aquatique.~~
- 3) ~~L'Autorité compétente d'un État membre qui a établi une ou plusieurs zones indemnes ou un ou plusieurs compartiments indemnes, doit en informer le Siège en donnant les détails nécessaires, notamment les critères sur lesquels repose le statut de territoire indemne et les conditions applicables de maintien de ce statut, et en indiquant clairement l'emplacement de ces zones et de ces compartiments sur une carte du territoire de l'État membre.~~

Article 1.1.65.

- 1) Bien qu'ils soient tenus de notifier seulement les *maladies listées* et les *maladies émergentes*, les États membres sont encouragés à fournir à l'OMSA toute autre information importante relative à la santé des *animaux aquatiques*.
- 2) Le Siège transmettra aux *Autorités compétentes* par courrier électronique ou par le biais de l'application WAHIS toutes les *notifications* reçues conformément aux articles 1.1.2. à 1.1.54, ainsi que toute autre information jugée pertinente.

[...]

Annexe 15. Point 8.3. – Article 1.3.1. du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA » – Inclusion de l'infection par tous les génogroupes de l'espèce de virus *virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique*

CHAPITRE 1.3.
MALADIES LISTÉES PAR L'OMSA

[...]

Article 1.3.1.

Les *maladies* suivantes de poissons, sont des *maladies listées* :

- Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique)
- Infection à *Gyrodactylus salaris*
- Infection par des variants délétés dans la RHP du virus de l'anémie infectieuse du saumon ou par des variants RHP0 de ce virus
- Infection par l'alphavirus des salmonidés
- Infection par l'herpèsvirus de la carpe koï
- Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise
- Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique
- Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse
- Infection par le-tous les génogroupes de l'espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique
- Infection par le virus de la septicémie hémorragique virale
- Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe
- Infection par le virus du tilapia lacustre.

[...]

Annexe 16. Point 8.3. – Évaluation de l’infection par tous les génogroupes de l’espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique

ÉVALUATION DE L’INFECTION PAR TOUS LES GÉNOGROUPE DE L’ESPÈCE VIRUS DE LA NÉCROSE INFECTIEUSE RÉNALE ET SPLÉNIQUE (ISKNV) EN VUE DE SON INCLUSION DANS LA LISTE DES MALADIES DU CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L’OMSA

Récapitulatif de l’évaluation

1. La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques a évalué l’infection par l’espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV), et notamment ses trois génogroupes que sont l’iridovirus de la daurade japonaise (RSIV), le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV) et l’iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV) au regard des critères d’inclusion dans la liste des maladies figurant à l’article 1.2.2. du *Code aquatique*.
2. La Commission des animaux aquatiques est convenue que le génogroupe RSIV, actuellement listé dans le *Code aquatique*, ainsi que les deux génogroupes ISKNV et TRIBV satisfaisaient aux critères 1, 2, 3, et 4b (voir Tableau 1 ci-dessous).
3. La Commission des animaux aquatiques a noté que les trois génogroupes présentaient des similitudes en matière d’espèces sensibles, d’épidémiologie et de méthodes de diagnostic. À ce titre, la Commission a estimé que la maladie devait être listée sous la désignation « Infection par tous les génogroupes de l’espèce ISKNV ». Il est proposé que la définition de l’infection par tous les génogroupes de l’espèce ISKNV désigne une infection causée par les trois génogroupes (ISKNV, RSIV and TRBIV) mais exclue une autre espèce de *Megalocytivirus*, le virus de la maladie de perte d’écailles (« scale drop disease virus »).

	Critères d’inclusion dans la Liste de l’OMSA						Conclusion
	1	2	3	4a	4b	4c	
Infection par tous les génogroupes de l’espèce virale ISKNV	+	+	+	NA	+	-	La maladie satisfaisait aux critères d’inclusion dans la Liste de l’OMSA.

NA = non applicable.

Critères d’inclusion figurant au chapitre 1.2. du *Code aquatique*

Les critères d’inclusion d’une maladie dans la liste de l’OMSA sont les suivants :

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

ET

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

ET

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

ET

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

OU

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

OU

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

Contexte

Le genre *Megalocytivirus* est un des sept genres de la famille des *Iridoviridae*. À l'instar des genres *Ranavirus* et *Lymphocystivirus*, il appartient à la sous-famille des Alphairidovirinae (Chinchar *et al.*, 2017 ; Chinchar *et al.*, 2020). Les mégalocytivirus se différencient des ranavirus et des lymphocystivirus par leur capacité à induire une augmentation marquée de la taille des cellules des tissus infectés et par l'analyse séquentielle des gènes viraux principaux (Chinchar *et al.*, 2017). Les mégalocytivirus sont les agents étiologiques de maladies graves associées à des mortalités importantes chez plusieurs espèces de poissons marins et dulçaquicoles (Kurita & Nakajima, 2012 ; Hick *et al.*, 2016).

Le Comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) reconnaît deux espèces appartenant au genre *Megalocytivirus* : le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV) et le virus de la maladie de perte d'écaillés (SDDV) (Chinchar *et al.*, 2017). Le SDDV se distingue d'un point de vue génétique et épidémiologique de l'ISKNV et donc n'est pas inclus dans la présente évaluation.

Au sein de l'espèce ISKNV ont été reconnus trois génogroupes : l'ISKNV, le RSIV et le TRBIV (Song *et al.*, 2008). Toutefois, il n'a pas encore été déterminé si ces trois génogroupes correspondaient à des espèces distinctes ou à des souches distinctes d'une seule et même espèce (Chinchar *et al.*, 2017). Les mégalocytivirus portent des noms variés et choisis d'après l'espèce dans laquelle ils ont été détectés pour la première fois ; toutefois, tous les variants de l'espèce ISKNV dont le génome a été analysé ont été placés dans un des trois génogroupes (ISKNV, RSIV and TRBIV) (Chinchar *et al.*, 2017).

Le nom « ISKNV » est employé pour désigner une des deux espèces reconnues du genre *Megalocytivirus* mais également pour désigner un des trois génogroupes de cette espèce. Dans le présent document, l'emploi du terme « génogroupe ISKNV » fait référence au génogroupe ISKNV alors que le terme « espèce ISKNV » fait référence à l'espèce ISKNV.

L'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise (RSIV) a été listée par l'OMSA dans le *Code sanitaire¹ pour les animaux aquatiques* pour la première fois en 2003. Son inclusion dans la liste a été maintenue depuis et il figure dans l'édition de 2022 du *Code aquatique*. La maladie causée par le RSIV a été détectée pour la première fois dans un élevage de dorades roses (*Pagrus major*), au Japon, en 1990 (Inouye *et al.*, 1992). Le RSIV a été principalement détecté chez des poissons marins. Parmi les espèces listées comme étant sensibles² à l'infection par le RSIV dans le *Code aquatique* de l'OMSA figurent la dorade rose (*Pagrus major*), la sériole du Japon (*Seriola quinqueradiata*), la sériole couronnée (*Seriola dumerilii*), une espèce de *Lateolabrax*, la perche barramundi (*Lates calcarifer*), le thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), *Oplegnathus fasciatus*, la carangue dentue (*Caranx delicatissimus*), *Siniperca chuatsi*, le tambour rouge (*Sciaenops ocellatus*), le mullet à grosse tête (*Mugil cephalus*) et des espèces de mérour (*Epinephelus spp.*).

Le génogroupe ISKNV n'est actuellement pas listé dans le *Code aquatique* de l'OMSA. La morphologie des virions est évocatrice de celle des iridovirus. En outre, l'augmentation de la taille des cellules présentant des corps d'inclusion similaires à ceux des mégalocytivirus a été rapportée chez des espèces de poissons dulçaquicoles depuis la fin des années 80 et des années 90 (par exemple, Armstrong & Ferguson, 1989 ; Anderson *et al.*, 1993). Le génogroupe ISKNV a été détecté dans des échantillons de poissons d'ornements provenant d'archives datant de 1996 (Go *et al.*, 2006 ; Go *et al.*, 2016 ; Becker *et al.*, 2022). L'infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique a été décrite chez *Siniperca chuatsi* (He *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2002). En 2001, le génome du génogroupe ISKNV a été analysé et il a été conclu qu'il était similaire à celui du RSIV (He *et al.*, 2001). Le génogroupe ISKNV a été détecté chez de nombreux poissons dulçaquicoles, notamment de nombreuses espèces de la filière des poissons d'ornement (voir la revue de Johan & Zainathan, 2020). La présence de ce génotype a été rapportée chez de nombreuses espèces de poissons d'ornement

¹ Le RSIV a été inclus dans le *Code aquatique* avant 2003, mais comme « autre maladie d'importance ».

² Il faut noter que la liste des espèces sensibles à l'infection par le RSIV conformément au chapitre 1.5. du *Code aquatique* n'a pas été révisée pour suivre les recommandations du Groupe *ad hoc*.

faisant l'objet d'échanges commerciaux au niveau international (voir la publication de Johan & Zainathan, 2020; Becker *et al.*, 2022). Il a été également rapporté que le génogroupe ISKNV était responsable de mortalités massives d'espèces importantes pour la consommation humaine (par exemple, Subramaniam *et al.*, 2016 ; Ramirez-Paredes *et al.*, 2020 ; Fusianto *et al.*, 2021).

Le génogroupe de l'iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV) n'est actuellement pas inclus dans le *Code aquatique* de l'OMSA. Il a été décrit pour la première fois comme responsable de la maladie chez le turbot *Scophthalmus maximus* (Shi *et al.*, 2004). Le TRBIV est connu comme la cause principale de maladie chez les poissons plats en Chine et en Corée (par exemple Shi *et al.*, 2004 ; Do *et al.*, 2005). En outre, il a également été détectée chez d'autres espèces, notamment celles de la filière de poissons d'ornement (Go *et al.*, 2016 ; Koda *et al.*, 2018). Le TRBIV est également à l'origine de maladie chez d'autres espèces d'élevage présentant une importance économique telles que la perche barramundi (*Lates calcarifer*) (Tsai *et al.*, 2020) et *Oplegnathus fasciatus* (Huang *et al.*, 2011).

La Commission des animaux aquatiques a précédemment proposé une approche pour différencier les souches d'agents pathogènes (se référer aux rapports de la Commission de [février](#) et [octobre 2011](#)). Les trois principaux critères qui ont été pris en compte pour l'applicabilité de la différenciation des souches de l'agent pathogène dans les normes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* étaient les suivants : 1) les variants de l'agent pathogène sont clairement identifiées dans la littérature scientifique et les caractéristiques des maladies qu'ils causent sont différentes ; 2) il existe des méthodes robustes qui permettent de toujours les différencier ; 3) il y a ou il peut possiblement y avoir une gestion différenciée des variants dans ou entre les pays. Dans le cas de l'espèce ISKNV, le RSIV a été listé avant même que soit conduits les travaux de recherche pour définir ses trois génogroupes au sein de l'espèce ISKNV ainsi que pour établir leurs liens épidémiologiques et génétiques. Etant donné que la Liste inclut le RSIV et non l'ISKNV ou le TRBIV, la présente évaluation expose les informations spécifiques à chacun de ces trois génogroupes. Toutefois, il est proposé de lister les trois génogroupes comme étant l'espèce ISKNV.

Évaluation au regard des critères d'inclusion dans la Liste

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

Évaluation

L'espèce ISKNV peut être transmise horizontalement par l'eau et demeure viable dans les tissus congelés de l'hôte. Il est attendu que la probabilité de transmission soit plus grande dans la filière de commercialisation des poissons vivants mais elle est également possible dans les produits issus d'animaux aquatiques, en particulier si ces derniers ne sont pas éviscérés.

De nombreux poissons marins et dulçaquicoles sont sensibles à l'espèce ISKNV. Ils font l'objet d'échanges commerciaux au niveau international, que ce soit sous forme de poissons vivants (destinés à la consommation humaine, à l'aquaculture ou un usage ornemental) ou de produits issus d'animaux aquatiques.

Le RSIV a été détecté dans plusieurs pays d'Asie où il a été associé à des foyers de maladies chez des espèces de poissons d'élevage marins (Kurita & Nakajima, 2012). Certaines espèces, destinées à la consommation humaine, sont commercialisées vivantes (par exemple la dorade rose, les mérours), alors que d'autres sont commercialisées sous forme de produits issus d'animaux aquatiques.

Le génogroupe ISKNV a été détecté chez de nombreuses espèces commercialisées dans la filière des poissons d'ornement. Cette filière a été mise en cause dans l'apparition et la propagation de la maladie (par exemple, Jeong *et al.*, 2008 ; Johan & Zainathan, 2020). Les poissons d'ornement infectés peuvent ne pas présenter de signes cliniques (par exemple, Subramaniam *et al.*, 2014 ; Rimmer *et al.*, 2015) et, à ce titre, peuvent avoir un rôle de porteurs du virus. Le génogroupe ISKNV a également été détecté chez des espèces d'élevage d'importance pour la consommation humaine, et qui font l'objet d'échanges commerciaux au niveau international, telles que le tilapia (Ramirez-Paredes *et al.*, 2020). Le génogroupe ISKNV a également été détecté chez des poissons non transformés utilisés comme aliment pour les animaux d'aquaculture (Lajimin *et al.*, 2015), ce qui suggère que les poissons commercialisés comme aliment pour animaux en aquaculture ou comme appâts pourraient constituer une voie d'introduction. La transmission de l'agent pathogène aux espèces de poissons marins par des espèces de poissons dulçaquicoles a été démontrée par inoculation directe et cohabitation (Jeong *et al.*, 2008b ; Go & Whittington, 2019).

Le TRBIV a été observé chez plusieurs espèces d'importance pour les échanges internationaux (par exemple, le turbot, le cardeau hirme, la perche barramundi), qu'elles soient commercialisées vivantes ou sous forme de produits issus

d'animaux aquatiques. Les résultats de l'analyse phylogénétique indiquent une récente propagation internationale du TRBIV (Tsai *et al.*, 2020).

Les variants de l'espèce ISKNV ont été détectés chez de nombreuses espèces d'espèces de poissons marins et dulçaquicoles qui font l'objet d'échanges internationaux. Chacun des trois génogroupes a été détecté dans des marchandises commercialisées et il y a des preuves établissant un lien de causalité entre la propagation internationale et les échanges commerciaux.

Conclusion

Le critère est satisfait.

Critère n°2. Au moins un pays peut démontrer l'absence de la maladie sur son territoire ou dans une zone chez les animaux aquatiques sensibles conformément aux dispositions prévues au chapitre 1.4.

Évaluation

L'infection par le RSIV est notifiable à l'OMSA depuis 2003. Plusieurs pays continuent de rapporter qu'ils n'ont jamais détecté le virus sur leur territoire (se référer au Système Mondial d'information Zoosanitaire de l'OMSA) ; il est probable que certains de ces pays puissent démontrer leur statut indemne de la maladie.

La présence du génogroupe ISKNV a été rapportée chez un grand nombre de poissons commercialisés dans la filière des poissons d'ornement et il est fortement probable que ce génogroupe soit largement répandu le long des chaînes d'approvisionnement. Toutefois, certains pays réunissent de façon continue des conditions élémentaires de sécurité biologique³ pour le génogroupe ISKNV et sont en capacité de démontrer leur statut indemne. En outre, les tests PCR utilisés aux fins de la surveillance du RSIV détecteraient également le génogroupe ISKNV, ce qui constituerait la preuve de l'absence du génogroupe ISKNV.

Le TRBIV a été détecté pour la première fois dans des élevages de poissons plats en Chine et en Corée. Il a également été détecté chez des poissons d'ornement et dans les élevages de perches barramundi. Les tests PCR recommandés dans le chapitre du *Manuel aquatique* de l'OMSA dédié à l'infection par le RSIV pourraient ne pas détecter le TRBIV, avec comme conséquence une moins grande confiance concernant la distribution de ce génogroupe. Toutefois, le TRBIV ayant été démontré comme étant pathogène pour les populations de certaines espèces d'élevage, il est probable qu'il soit détecté en cas d'apparition de la maladie chez ces espèces. Bien qu'il y ait moins de certitude concernant la distribution du TRBIV, il semble probable qu'au moins un pays pourrait déposer une auto-déclaration d'absence pour l'intégralité du pays ou une zone.

Conclusion

Le critère est satisfait.

Critère n°3. Une définition de cas précise est disponible et il existe une méthode fiable de détection et de diagnostic.

Évaluation

Les définitions de cas pour la suspicion et la confirmation de l'infection par le RSIV sont disponibles dans le *Manuel aquatique* de l'OMSA. Étant donné que la plupart des tests PCR pour le RSIV (et d'autres méthodes comme, par exemple, l'histologie) détectent le génogroupe ISKNV, les définitions de cas pourraient être aisément adaptées afin d'inclure le génogroupe ISKNV. Kawato *et al.* (2021) ont comparé les performances analytiques de quatre méthodes de PCR en temps réel pour la détection des mégalocytivirus (à l'exclusion du SDDV). Ils ont démontré que trois des quatre tests détectaient les virus ciblés, à savoir les génogroupes ISKNV, RSIV, et TRBIV. Le nombre d'outils de diagnostic disponibles pour détecter l'espèce ISKNV et élaborer les définitions de cas incluant les trois génogroupes est suffisant.

Conclusion

³Les conditions élémentaires de sécurité biologique sont définies dans l'article 1.4.6. du *Code aquatique* et comprennent, comme exigences, un système de détection précoce (tel que décrit à l'article 1.4.7.) ainsi que des mesures de prévention de l'introduction de l'agent pathogène.

Le critère est satisfait.

Critère n°4.a. La transmission naturelle à l'homme a été prouvée, et la présence de l'infection chez l'homme est associée à des conséquences graves.

Évaluation

Il n'y a aucune preuve de transmission à l'homme.

Conclusion

Le critère n'est pas applicable.

Critère n°4b. Lorsqu'elle apparaît, il est prouvé que la maladie affecte la santé des animaux aquatiques d'élevage à l'échelle d'un pays ou d'une zone, avec de lourdes conséquences telles que, par exemple, des pertes de production, une morbidité ou une mortalité constatée au niveau du pays ou de la zone.

Évaluation

Le RSIV a causé des mortalités massives dans les populations de poissons d'élevage. La maladie a été détectée pour la première fois chez la dorade rose au Japon et se caractérisait par une léthargie, une anémie sévère, des pétéchies au niveau des branchies et une splénomégalie (Inouye *et al.*, 1992 ; Jung *et al.*, 1997 ; Nakajima & Maeno, 1998). Il a été rapporté que le RSIV était responsable de pertes de production, de morbidités et de mortalités chez de nombreuses autres espèces (par exemple Chao *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2003 ; Girisha *et al.*, 2020 ; Ni *et al.*, 2021 ; Sumithra *et al.*, 2022).

La présence du génogroupe ISKNV a été associée à de nombreux cas de maladies observées chez des poissons d'ornement (voir la revue de Johan & Zainathan, 2020 ; Becker *et al.*, 2022). Le génogroupe ISKNV a également été associé à des mortalités massives chez des espèces de poissons d'importance élevées pour la consommation humaine ; par exemple, la perche barramundi (Dong *et al.*, 2017 ; Kerdee *et al.*, 2021), le tilapia (par exemple, Figueiredo *et al.*, 2021 ; Ramírez-Paredes *et al.*, 2021) et les mérous (par exemple, Chao *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2020 ; Fusianto *et al.*, 2021).

Le TRBIV est responsable de maladies et de mortalités massives chez le turbot d'aquaculture en Chine (par exemple, Shi *et al.*, 2010). Des mortalités pouvant atteindre 90 % ont été observées chez la perche barramundi à Taiwan (Tsai *et al.*, 2020).

Conclusion

Le critère est satisfait.

Critère n°4c. On a montré la présence de la maladie ou on dispose d'éléments de preuve scientifiques indiquant que la maladie affecterait la santé des animaux aquatiques sauvages avec de lourdes conséquences telles que, par exemple, une morbidité ou une mortalité à l'échelle de la population, une baisse de productivité ou des répercussions sur l'écologie.

Évaluation

Il y a un nombre limité d'informations sur la présence des génogroupes RSIV, ISKNV ou TRBIV dans les populations de poissons sauvages et sur les conséquences en termes de morbidité, mortalité ou d'impact écologique. Il a été rapporté que le génogroupe ISKNV était à l'origine d'un épisode de mortalités massives chez des populations de cichlidés sauvages en Inde (Swaminathan *et al.*, 2022) et qu'il a été également détecté chez diverses espèces de poissons sauvages apparemment en bonne santé (Wang *et al.*, 2007).

Conclusion

Le critère n'est pas satisfait.

Références

-
- ARMSTRONG, R. & FERGUSON, H. (1989). Systemic viral disease of the chromide cichlid *Etilopius maculatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **7**, 155-157.
- ANDERSON, I.G., PRIOR, H.C., RODWELL, B.J. & HARRIS, G.O. (1993). Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with systemic amoebiasis. *Australian Veterinary Journal*, **70**(2), 66-67.
- BECKER, J.A., FUSIANTO, C., HICK, P.M. (2022). Infection with Megalocytivirus in Ornamental Fish. In: *Aquaculture Pathophysiology, Pharmacology and Toxicology* (F. Kibenge, R.S. Chong, B. Baldisserotto, eds), Elsevier. (Currently IN REVIEW).
- CHAO, C.B., CHEN, C.Y., LAI, Y.Y., LIN, C.S. & HUANG, H.T. (2004). Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in the grouper *Epinephelus* hybrids infected with grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **58**, 127–142.
- 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. *Journal of Fish Diseases*, **26**, 615-619.
- CHINCHAR, V.R., HICK, P., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q. (2017). ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, **98**, 890–891.
- CHINCHAR, V.G., HICK, P.H., HUANG, J., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q. (2020) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*, *Journal of General Virology*, **98**, 890-891.
- DO, J.W., CHA, S.J., KIM, J.S., AN, E.J., LEE, N.S., CHOI, H.J., LEE, C.H., PARK, M.S., KIM, J.W., KIM, Y.C. & PARK, J.W. (2005). Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**, 193–200.
- DONG, H.T., JITRAKORN, S., KAYANSAMRUJ, P., PIRARATE, N., RODKHUM, C., RATTANAROJPONG, T., SENAPIN, S., SAKSMERPROME, V. (2017). Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish & Shellfish Immunology*, **68**, 65-73.
- FIGUEIREDO, H.C.P., TAVARES, G.C., DORELLA, F.A., ROSA, J.C.C., MARCELINO, S.A.C., PIEREZAN, F. & PEREIRA, F.L. (2022). First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile tilapia in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, **69**(5), 3008-3015.
- FUSIANTO, C., HICK, P.M., HERLAMBANG, A., WHITTINGTON, R.J. & BECKER, J.A. (2021). Outbreak investigation attributes Infectious spleen and kidney necrosis virus as a necessary cause of a mortality epidemic in farmed grouper (*Epinephelus* spp.) in Bali, Indonesia. *Aquaculture Reports* **20**, 100723.
- GIRISHA, S.K., PUNEETH, T.G., NITHIN, M.S., NAVEEN KUMAR, B.T., AJAY, S.K., VINAY, T.N. & RAMESH, K.S. (2020). Red sea bream iridovirus disease (RSIVD) outbreak in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in open estuarine cages along the west coast of India: first report. *Aquaculture*, **520**, 734712.
- 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., TWEEDIE, A. & WHITTINGTON, R.J. (2016). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139.
- GO, J. & WHITTINGTON, R. (2006). Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family Iridoviridae) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, **258**, 140-149.
- GO, J. & WHITTINGTON, R.J. (2019). Experimental transmission of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) from freshwater ornamental fish to silver sweep *Scorpius lineolata*, an Australian marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, **137**(1), 1-21.
- HE, J.G., DENG, M., WENG, S.P., LI, Z., ZHOU, S.Y., LONG, Q.X., WANG, X.Z. & CHAN, S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139, doi: 10.1006/viro.2001.1208.
-

-
- HE, J.G., ZENG, K., WENG, S.P. & CHAN, S.M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basillewsky), in China, *Journal of Fish Diseases*, **23**, 219–222.
- HE, J.G., ZENG, K., WENG, S.P. & CHAN, S.M. (2002). Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), *Aquaculture*, **204**, 11–24. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00639-1.
- HICK, P.M., BECKER, J.A. & WHITTINGTON, R.J. (2016). Iridoviruses of fish In: *Aquaculture Virology* (F. Kibenge and M. Godoy, eds), Elsevier, London, UK, 127-152.
- HUANG, S.M., TU, C., TSENG, C.H., HUANG, C.C., CHOU, C.C., KUO, H.C. & CHANG, S.K. (2011). Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009. *Archives of Virology*, **156**, 1505-1515.
- HUANG, Y., CAI, S., JIAN, J., LUI, G., & XU, L. (2020). Co-infection of infectious spleen and kidney necrosis virus and *Francisella* sp. in farmed pearl gentian grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus*) in China — A case report. *Aquaculture*, **526**, 735409.
- 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 Pathology*, **27**, 19–27.
- JEONG, J.B., KIM, H.Y., JUN, L.J., LYU, J.H., PARK, N.G., KIM, J.K. & JEONG, H.D. (2008a). Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus diseases in freshwater ornamental fishes, *Diseases of Aquatic Organisms*, **78**, 209–215. doi: 10.3354/dao01879.
- JEONG, J., CHO, H., JUN, L., HONG, S., CHUNG, J. & JEONG, H. (2008b). Transmission of Iridovirus from freshwater ornamental fish (pearl gourami) to marine (rock bream). *Diseases of Aquatic Organisms*, **82(1)**, 27-36.
- JOHAN, C.A.C. & ZAINATHAN, S.C. (2020). Megalocytiviruses in ornamental fish: A review. *Veterinary 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, *Journal of Fish Diseases*, **23**, 223–226. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x.
- KERDDEE, P., DINH-HUNG, N., THANH DONG, H., HIRONO, I., SOONTARA, C., AREECHON, N., SRISAPOOME, P. & KAYANSAMRUJ, P. (2021). Molecular evidence for homologous strains of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) genotype I infecting inland freshwater cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) in Thailand. *Archives of Virology*, **166**, 3061–3074.
- KIM, K.H., CHOI, K.M., KANG, G., WOO, W.S., SOHN, M.Y., SON, H.J., YUN, D., KIM, D.H. & PARK, C.I. (2022). Development and Validation of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Red Sea Bream Iridovirus. *Fishes*, **7**, 236. <https://doi.org/10.3390/fishes7050236>
- KODA, S.A., SUBRAMANIAM, K., HICK, P.M., HALL, E., WALTZEK, T.B. & BECKER, J.A. (2023). Partial validation of a TaqMan quantitative polymerase chain reaction for the detection of the three genotypes of *Infectious spleen and kidney necrosis virus*. *PLoS ONE*, **18(2)**:e0281292.
- KODA, S.A., SUBRAMANIAM, K., FLOYD-FRANCIS, R., YANONG, R.P., FRASCA, S., 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, **130(1)**, 11-24.
- KURITA, J., NAKAJIMA, K., (2012), Megalocytiviruses, *Viruses*, **4(4)**, 521-538.
- KAWATO, Y., CUMMINS, D.M., VALDETER, S., MOHR, P., ITO, T., MIZUNO, K., KAWAKAMI, H., WILLIAMS, L.M., CRANE, M.ST.J. & MOODY, N.J.G. (2021). Development of New Real-time PCR Assays for Detecting *Megalocytivirus* Across Multiple Genotypes. *Fish Pathology*, **56 (4)**, 177-186. doi.org/10.3147/jfsfp.56.177
- LAJIMIN, S., RAZAK, A.A., DENIL, D. J., RANSANGAN, J., ABDUL WAHID, M.E. & SADE, A. (2015). First detection of Megalocytivirus (*Iridoviridae*) in trash fish used for aquaculture feed in Sabah, Malaysia. *Int. J. of Aquatic Science*, **6(1)**: 54-66.
-

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, *Diseases of Aquatic Organisms*, **36**(1), 73-5.

NI, S.Z., WANG, Y.J., HU, J. B., SHI, J., XU, Y., ZHOU, S.M., LI, J.J., HONG, B.H. & QIAN, D. (2021). Identification, histopathology, and phylogenetic analysis of an iridovirus from cultivated silver pomfret in Zhejiang Province, East China. *Aquaculture*, **530**, 735619.

RAMÍREZ-PAREDES, J.G., PALEY, R.K., HUNT, W., FEIST, S.W., STONE, D.M., FIELD, T.R., HAYDON, D.J., ZIDDAH, P.A., NKANSA, M., GUILDER, J., GRAY, J., DUODU, S., PECKU, E.K., AWUNI, J.A., WALLIS, T.S. & VERNER-JEFFREYS, D.W. (2021). First detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *Transboundary Emerging Diseases*, **68**, 1550–1563. <https://doi.org/10.1111/tbed.13825>

RIMMER A.E., BECKER J.A., TWEEDIE A., LINTERMANS M., LANDOS M. & WHITTINGTON R.J. (2015). Detection of dwarf gourami iridovirus (Infectious spleen and kidney necrosis virus) in populations of ornamental fish prior to and after importation into Australia, with the first evidence of infection in domestically farmed Platy (*Xiphophorus maculatus*). *Preventive Veterinary Medicine*, **122**, 181-194.

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**, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.007>

SONG, J-Y., KITAMURA, S-I., JUNG, S-J., MIYADAI, T., TANAKA, S., FUKUDA, Y., KIM, S-R. & OH, M-J. (2008). Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. *Journal of Microbiology*, **46**, 29-33.

SUBRAMANIAM, K., SHARIFF, M., OMAR, A.R., HAIR-BEJO, M. & ONG, B.L. (2014). Detection and molecular characterisation of infectious spleen and kidney necrosis virus from major ornamental fish breeding states in peninsular Malaysia, *Journal of Fish Diseases*, **37**, 609–618, <https://doi.org/10.1111/jfd.12152>

SUBRAMANIAM, K., GOTESMAN, M., SMITH, C.E., STECKLER, N.K., KELLEY, K.L., GROFF, J.M. & WALTZEK, T.B. (2016). *Megalocytivirus* infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **119**, 253-258. <https://doi.org/10.3354/dao02985>

SUMITHRA, T.G., KRUPESHA SHARMA, S.R., NEELIMA, L., DHANUTHA, N.R., JOSHY, A., ANUSREE, V.N., GAYATHRI, S., RAGHU, R.K., PRAVEEN, N.D., THOMAS, S. & RAJESH, K.M. (2022). Red sea bream iridovirus infection in cage farmed Asian sea bass (*Lates calcarifer*): Insights into the pathology, epizootiology, and genetic diversity. *Aquaculture*, **548**, 737571. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737571>

SWAMINATHAN, T.R., JOHNY, T.K., NITHIANANTHAM, S.R., SUDHAGAR, A., PRADHAN, P.K., SULUMANE RAMACHANDRA, K.S., NAIR, R.R., & SOOD, N. (2022). A natural outbreak of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) threatens wild pearlspot, *Eetroplus suratensis* in Peechi Dam in the Western Ghats biodiversity hotspot, India. *Transboundary and Emerging Diseases*, **69**(5), 1595-1605. <https://doi.org/10.1111/tbed.14494>

TSAI, J.M., HUANG, S.L. & YANG, C.D. (2020). PCR Detection and Phylogenetic Analysis of *Megalocytivirus* Isolates in Farmed Giant Sea Perch *Lates calcarifer* in Southern Taiwan. *Viruses*, **12**(6), 681. <https://doi.org/10.3390/v12060681>

WANG, Y.Q., LÜ, L., WENG, S.P., HUANG, J.N., CHAN, S.M. & HE, J.G. (2007). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis viruslike (ISKNV-like) virus. *Archives of Virology*, **152**, 763–773.

Annexe 17. Point 8.4.1. – Articles 8.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens

(VERSION AVEC 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 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*);~~
 - d) 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*);
 - e) 3) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.
- 2) ~~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 visés au point 1 de l'article 8.1.3., les Autorités compétentes doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.1.9. à 8.1.14. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. dendrobatidis*.~~
- 3) ~~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 doit procéder à une analyse des risques conformément aux~~

~~recommandations contenues dans le chapitre 2.1. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.~~

[...]

(VERSIONS 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*

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. 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* ;
- 2) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.

[...]

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*

~~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'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*) :
 - d) 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 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*) :
 - e) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.
- 2) 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 visés au point 1 de l'article 8.2.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.2.9. à 8.2.14. en fonction du statut sanitaire du pays exportateur ou de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans*.
- 3) 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. L'Autorité compétente doit procéder à une *analyse des risques* conformément aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1.

[...]

(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. dendrobatidis*

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. 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'au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. salamandrivorans* ;
- 2) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.

[...]

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*

~~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 65-60°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*);
 - ~~d) 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) 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 visés au point 1 de l'article 8.3.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.3.9. à 8.3.14. en fonction du statut sanitaire du pays exportateur ou de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus*.
- 2) 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* doit procéder à une analyse des risques conformément

aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1. 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*.

[...]

CHAPITRE 9.3.

INFECTION À *HEPATOBACTER PENAEI*
(HEPATOPANCREATITE NECROSANTE)

[...]

Article 9.3.3.

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 *H. penaei*

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 *H. penaei*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *H. penaei* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~63~~95°C pendant au moins ~~30~~cing minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *H. penaei* ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~63~~95°C pendant au moins ~~30~~cing minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *H. penaei* ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.5.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA MYONÉCROSE INFECTIEUSE

[...]

Article 9.5.3.

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 par le virus de la myonécrose infectieuse

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 au virus de la myonécrose infectieuse, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~75°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la myonécrose infectieuse ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~75°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la myonécrose infectieuse ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.6.

INFECTION PAR LE NODAVIRUS DE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (MALADIE DES QUEUES BLANCHES)

[...]

Article 9.6.3.

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 par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*

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 au nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~50°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~50°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.7.

INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME DE TAURA

[...]

Article 9.7.3.

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 par le virus du syndrome de Taura

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 au virus du syndrome de Taura, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 70°C pendant au moins ~~30~~108 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du syndrome de Taura ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 70°C pendant au moins ~~30~~108 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du syndrome de Taura ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.10.

INFECTION PAR LE VIRUS 1 IRIDESCENT DES DÉCAPODES

[...]

Article 9.10.3.

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 le virus 1 iridescent des décapodes

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 au virus 1 iridescent des décapodes, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus 1 iridescent des décapodes :

- 1) [*produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~56~~80°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus 1 iridescent des décapodes ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~56~~80°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus 1 iridescent des décapodes ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.] (à l'étude)

[...]

CHAPITRE 10.1.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE
HÉMATOPOÏÉTIQUE ÉPIZOOTIQUE

[...]

Article 10.1.3.

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 le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique

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 au virus de la nécrose hématopoïétique épizootique, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique :

- 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 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique ;
- ~~2) poissons éviscérés et 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 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique ;~~
- ~~3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique ;~~
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.2.

INFECTION À *APHANOMYCES INVADANS* (SYNDROME ULCÉRATIF ÉPIZOOTIQUE)

[...]

Article 10.2.3.

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 *A. invadans*

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 *A. invadans*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *A. invadans* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~100°C pendant au moins ~~cinque~~ minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *A. invadans* ;
- ~~2) poissons éviscérés et 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 *A. invadans* ;~~
- 32) *farine* de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~100°C pendant au moins ~~cinque~~ minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *A. invadans* ;
- 43) huile de poisson ;
- 54) poissons éviscérés congelés ;
- 65) filets ou darnes / pavés de poisson congelés.

[...]

CHAPITRE 10.3.

INFECTION À *GYRODACTYLUS SALARIS*

[...]

Article 10.3.3.

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 *G. salaris*

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 *G. salaris*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *G. salaris* :

- 1) ~~*produits issus d'animaux aquatiques ayant subi un traitement thermique et qui sont présentés en conditionnement hermétique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 40°C pendant au moins une minute, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *G. salaris* ;*~~
- ~~2) *poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ;*~~
- 32) poissons éviscérés et séchés dans des conditions naturelles (c'est-à-dire à l'air ou au soleil) ;
- 43) poissons éviscérés et congelés ayant été soumis à des températures inférieures ou égales à moins 18 °C ;
- 54) filets ou darnes / pavés de poisson congelés ayant été soumis à des températures inférieures ou égales à moins 18 °C ;
- 65) poissons éviscérés réfrigérés ayant été pêchés dans une eau de mer de salinité supérieure ou égale à 25 ppt ;
- 76) filets ou darnes / pavés réfrigérés de poissons ayant été pêchés dans une eau de mer de salinité supérieure ou égale à 25 ppt ;
- 87) produits réfrigérés à base de poisson dont la peau, les arêtes et les nageoires ont été retirés ;
- 98) œufs de poisson non viables ;
- 109) huile de poisson ;
- 140) farine de poisson ;
- 121) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.4.

INFECTION PAR LE VIRUS DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DU SAUMON

[...]

Article 10.4.3.

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 par le virus de l'anémie infectieuse du saumon

Les dispositions figurant au présent article s'appliquent à l'ensemble des formes du virus de l'anémie infectieuse du saumon, y compris les variants RHPO.

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 au virus de l'anémie infectieuse du saumon, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de l'anémie infectieuse du saumon ;
- ~~2) poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de l'anémie infectieuse du saumon ;~~
- ~~3) farine~~ de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de l'anémie infectieuse du saumon ;
- 43) huile de poisson ;
- 54) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.5.

INFECTION PAR L'ALPHAVIRUS DES SALMONIDÉS

[...]

Article 10.5.3.

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 par l'alphavirus des salmonidés

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'alphavirus des salmonidés, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par l'alphavirus des salmonidés :

- 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 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'alphavirus des salmonidés ;
- ~~2) poissons éviscérés et 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 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'alphavirus des salmonidés ;~~
- 3) *farine* de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'alphavirus des salmonidés ;
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.6.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HÉMATOPOÏÉTIQUE INFECTIEUSE

[...]

Article 10.6.3.

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 par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse

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 au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 30 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse ;
- ~~2) poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 30 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse ;~~
- ~~3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 30 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse ;~~
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.7.

INFECTION PAR L'HERPESVIRUS DE LA CARPE KOÏ

[...]

Article 10.7.3.

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 par l'herpèsvirus de la carpe koï

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 la carpe koï, 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 la carpe koï :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 50°C pendant au moins ~~trois~~une minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de la carpe koï ;
- ~~2) poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 50°C pendant au moins trois minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de la carpe koï ;~~
- ~~3) farine de poisson~~ ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 50°C pendant au moins ~~trois~~une minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de la carpe koï ;
- 4) huile de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.8.

INFECTION PAR L'IRIDOVIRUS DE LA DAURADE JAPONAISE

[...]

Article 10.8.3.

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'iridovirus de la daurade japonaise

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'iridovirus de la daurade japonaise, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'iridovirus de la daurade japonaise ;
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'iridovirus de la daurade japonaise ;~~
- 3) *farine* de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'iridovirus de la daurade japonaise ;
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.9.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA VIRÉMIE PRINTANIÈRE DE LA CARPE

[...]

Article 10.9.3.

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 le virus de la virémie printanière de la carpe

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 au virus de la virémie printanière de la carpe, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~90~~60°C pendant au moins ~~60 secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la virémie printanière de la carpe ;
- ~~2) poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 60 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la virémie printanière de la carpe ;~~
- ~~3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90~~60°C pendant au moins ~~60 secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la virémie printanière de la carpe ;
- 4) huile de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.10.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE VIRALE

[...]

Article 10.10.3.

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 le virus de la septicémie hémorragique virale

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 au virus de la septicémie hémorragique virale, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la septicémie hémorragique virale :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~90~~60°C pendant au moins ~~60 secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la septicémie hémorragique virale ;
- ~~2) poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 60 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la septicémie hémorragique virale ;~~
- ~~3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90~~60°C pendant au moins ~~60 secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la septicémie hémorragique virale ;
- ~~4) poissons éviscérés et séchés dans des conditions naturelles (c'est-à-dire à l'air ou au soleil) ;~~
- ~~5) huile de poisson ;~~
- ~~6) cuir élaboré à partir de peau de poisson.~~

[...]

Annexe 20. Point 8.4.4. – Articles 11.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

(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

~~1- 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 121,50°C pendant au moins 3,6 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'au moins 50°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de l'ormeau.

[...]

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*

~~1. 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* :~~

1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. exitiosa* ;

a) 2) chair d'huître à l'état congelé ; ~~et~~

b) 3) 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) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. exitiosa* ;
- 2) chair d'huître à l'état congelé ;
- 3) huîtres congelées en demi-coquille.

[...]

CHAPITRE 11.3.

INFECTION À *BONAMIA OSTREAE*

[...]

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*

~~1. 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* :~~

1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. ostreae* ;

a) ~~1~~2) chair d'huître à l'état congelé ; ~~et~~

b) ~~2~~3) 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 OSTREAE*

[...]

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) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. ostreae* ;
- 2) chair d'huître à l'état congelé ;
- 3) huîtres congelées en demi-coquille.

[...]

CHAPITRE 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*

~~1. 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 trois 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 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*

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 trois minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *M. refringens*.

[...]

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*

~~1. 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 12160°C pendant au moins 360 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 60°C pendant au moins 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. marinus*.

[...]

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. olsenii*

~~1. 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 11.6.2. 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. olsenii*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *P. olsenii* :~~

- ~~1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 12160°C pendant au moins 360 minutes et 36 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. olsenii*.~~
- ~~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. olsenii*.~~
- ~~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. olsenii*. 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. olsenii*

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. olsenii*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *P. olsenii* :

- 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 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. olsenii*.

[...]

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*

~~1. 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 42195°C pendant au moins 3cinq 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)

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 95°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *X. californiensis*.

[...]

CHAPITRE 11.5.
INFECTION À *PERKINSUS MARINUS*

Article 11.5.1.

Aux fins du Code aquatique, l'expression « infection à *Perkinsus marinus* » désigne une infection causée exclusivement par l'agent pathogène *P. marinus* appartenant à la famille Perkinsidae.

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

Article 11.5.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent à l'huître creuse américaine (*Crassostrea virginica*), à l'huître du Pacifique (~~*Crassostrea gigas*~~), à l'huître de Suminoe (~~*Crassostrea ariakensis*~~), à ~~*Mya arenaria*~~, à ~~*Macoma balthica*~~ *Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis*, l'huître creuse de Cortez (*Crassostrea corteziensis*) et l'huître palmée (*Saccostrea palmula*) ~~la praire (*Mercenaria mercenaria*)~~. Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le Manuel aquatique lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

[...]

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 *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only 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 *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within 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 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ (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: fleshy 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 including 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). None known.~~

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 of disease and mortality can start as early as 10 days post-stocking. Clinical Signs include: of disease in moribund prawns sink to bottom, may include pale to white hepatopancreas (HP) due to pigment loss in the connective tissue capsule (NACA, 2014). 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 haemocytetes) (NACA, 2014). Behavioural changes such as frequent sinking to the bottom of tanks may also be noted.

2.3.3 Gross pathology

Gross pathological observations include pale-to-white 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 haemocytetes) (NACA, 2014). 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

*Vp*_{AHPND} 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 WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 a DNA preservative DNAzol for PCR testing. If material cannot be fixed it may be frozen, but repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans).

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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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 - Isolation					±	±	±	NA				
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1	+++	+++	+++	1
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	2
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	±2
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP		+++	+++	1								
Ab-ELISA												
Ag-ELISA		±	+++	1		±	+++	1		±	+++	1
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP 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

Histological examination of AHPND infected shrimp reveals that pathological changes are limited to the hepatopancreas. 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. No B-, F- and R-cells are seen in the hepatopancreatic tubule and some nuclei of tubule epithelial cells are enlarged (karyomegaly). No significant bacterial involvement appears during this phase 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, 2012-2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- iii) In *Penaeus vannamei* AHPND tolerant lines, a chronic phase can be observed. 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 isolation

*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 assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

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 Vp_{AHPND}-PCR assays: a) negative extraction control i.e. DNA template extracted at the same time from a known negative sample; b) DNA template from a known positive sample, such as Vp_{AHPND}-affected shrimp tissue or DNA from an Vp_{AHPND}-positive bacterial culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a non-template control. In addition, a further control is required to demonstrate that extracted nucleic acid is free from PCR inhibitors, for example, for shrimp tissues use of the decapod 18S rRNA PCR (Lo *et al.*, 1996) or use the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

4.4.1. Real-time PCR

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Han <i>et al.</i> , 2015b; GenBank Accession No.: KM067908			
pirA	Fwd VpPirA-F: TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG Rev VpPirA-R: GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG VpPirA Probe: FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-GGA-TAMRA	Fwd: 0.3 µM Rev: 0.3 µM probe: 0.1 µM	95°C/20 sec; 45 cycles 95°C/3 sec and 60°C/30 sec

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 Vp_{AHPND}-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

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (AP1): Flegel & Lo, 2014; GenBank: KP324995; 700 bp			
<u>pVA1</u>	Fwd AP1F: SCCT TCG GTG TGC TTA GAG GAT CA Rev AP1R: SCA AAC TAT CGC GCA GAA CAC C	0.2 µM each	94°C/5 min; 25–30 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/60 sec; final extension step at 72°C/30 min. Reaction mixture can be held at 4°C
Method 2 (AP2): Flegel & Lo, 2014; GenBank: KP324995; 700 bp			
<u>pVA1</u>	Fwd AP2F: TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG CT Rev AP2R: CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA CT	0.2 µM each	94°C/5 min; 25–30 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/60 sec; final extension step at 72°C/30 min. Reaction mixture can be held at 4°C
Method 13 (AP3): Sirikharin <i>et al.</i> , 2015; GenBank Accession No.: JAL101000066.1; amplicon size: 333 bp			
<u>pirA^{vp}</u>	Fwd AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC Rev AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA	0.2 µM each	94°C/5 min; 30 cycles of 94°C/30 sec, 53°C/30 sec, 72°C/40 sec; final elongation step at 72°C/7 min; Reaction mixture can be held at 4°C
Method 24 (TUMSAT-Vp3): Tinwongger <i>et al.</i> , 2014; GenBank Accession No.: AB972427; amplicon size: 360 bp			
<u>pVA1</u>	Fwd TUMSAT-Vp3 F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA Rev TUMSAT-Vp3 R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA	0.6 µM each	95°C/2 min; 30 cycles of 95°C/30 sec, 56°C/30 sec, 72°C/30 sec
Method 35 (VpPirA-284): Han <i>et al.</i> , 2015a; GenBank Accession No.: KM067908; amplicon size: 284 bp			
<u>pirA^{vp}</u>	Fwd VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG Rev VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA	0.2 µM each	94°C/3 min; 35 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec; final extension 72°C/7 min
Method 46 (VpPirB-392): Han <i>et al.</i> , 2015a; GenBank Accession No.: KM067908; amplicon size: 392 bp			
<u>pirB^{vp}</u>	Fwd VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC Rev VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA	0.2 µM each	94°C/3 min; 35 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec; final extension 72°C/7 min
Method 52 (AP4): Dangtip <i>et al.</i> , 2015; GenBank Accession No.: JPKS01000000; amplicon size: 1269 bp			
<u>PirA and PirB toxin genes</u>	Primary Fwd AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC Rev AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA Nested Fwd AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG Rev AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	0.2 µM each	Primary 94°C/2 min; 30 cycles of 94°C/30 sec, 55°C/30 sec, 72°C/90 sec; final extension step at 72°C/2 min; hold at 4°C Nested 94°C/2 min; 25 cycles of 94°C/20 sec, 55°C/20 sec, 72°C/20 sec; hold at 4°C
Method 8 (AP4): Dangtip <i>et al.</i> , 2015; GenBank: JPKS01000000; amplicon size: 230 bp			

<i>PirA</i> and <i>D18B</i> toxin genes	Forw AP1-F1: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG Rev AP1-R1: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	0.2 µM each	94°C/2 min; 25 cycles of 94°C/30 sec, 55°C/30 sec, 72°C/30 sec; hold at 4°C
--	--	-------------	---

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	<i>pVA1</i>	700bp	Flegel & Lo (2014)
AP2	AP2F: TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G AP2R: CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G	<i>pVA1</i>	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 4.4.2.2.

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

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.4.2.73. 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. Isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP)

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method: Kolwai <i>et al.</i> , 2017. GenBank Accession No.: AB972422.1			
Toxin PirAB-like	F3: TGA-TAA-TGC-ATT-CTA-TCA-TCA-GC B3: ATT-TGA-AAG-ACC-AAA-TGA-AAC-C FIP-F1c: GTG-AGC-ACC-TTC-TTA-GTG-GTA-ATA PIR-F2: GTT-GTA-ATT-AAC-AAT-GGC-GCT-AG	F3: 5.0 pmol B3: 5.0 pmol	65°C/60 min and 80°C/5 min

	<p>Pir-B1c: TGA-CGG-AAT-TTA-ACC-CTA-ACA-ATG-C Pir-B2: GCT-TTG-AAA-GCA-TAC-TTA-GGA-TC</p>	<p>Pir: 30 pmol PirB: 40 pmol</p>	
--	---	--	--

4.4.34. 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 size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

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) and conventional PCR (Dangtip *et al.*, 2015) are 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical-Hydrographical 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 PCR
- ii) A positive result by ~~or conventional PCR methods recommended in Table 4.1~~
- iii) A positive result by LAMP
- iv) Histopathology ~~or cytopathological changes~~ consistent with the ~~presence of the pathogen or the disease~~
- v) A positive result by Ag-ELISA

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 at least one of the following ~~criterion-criteria~~ is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- iii) Positive results by Ag-ELISA 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~~
- ii) A positive result by agent isolation

¹ For example transboundary commodities.

- iii) A positive result by real-time PCR
- iv) A positive result by conventional PCR
- v) **A positive result by bioassay**
- vi) A positive result by LAMP
- vii) A positive result by Ag-ELISA

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 at least one of the following criterion-criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- iii) Positive results by Ag-ELISA 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 **(no data are currently available)**. 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 pose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe	DSp	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.

Aranguren Caro L.F., Mai H.N., Noble B. & Dhar A.K. (2020b). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP_{AHPND}), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. *J. Invertebr. Pathol.*, **174**, 107424. doi: 10.1016/j.jip.2020.107424. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32535000

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., PROESPRAWONG P. & FLEGEL T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Rep.*, **2**, 158–162.

DE LA 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. <https://enaca.org/enclosure/?id=88>

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

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (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 WOAHP Reference Laboratories for acute hepatopancreatic necrosis disease
(please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact the WOAHP Reference Laboratory for any further information on
acute hepatopancreatic necrosis disease

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

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH HEPATOBACTER PENA EI (NECROTISING
HEPATOPANCREATITIS)

1. Scope

Infection with infectious salmon anaemia virus (ISAV) means infection with the pathogenic agent highly polymorphic region (HPR)-deleted ISAV, or the non-pathogenic HPRO (non-deleted HPR) ISAV of the Genus *Isavirus* and Family *Orthomyxoviridae*.

Infection with ~~*Candidatus*~~ *Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent *Candidatus* *H. penaei*, an obligate intracellular bacterium of the Family Holosporaceae, Order Rickettsiales ~~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 Family Holosporaceae family within the Order Rickettsiales (Leyva *et al.*, 2018). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 × 0.9 μm), whereas the helical form (0.25 × 2–3.5 μm) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of *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 confirms 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 are: 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 are: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*) (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 (PL), 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* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adults and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent, with juveniles always being the most severely affected. 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 epicomensal organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic. (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 atrophied hepatopancreas, empty guts, soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; 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) ~~a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance including pale discoloration 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; Frelief *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 PL that were also *H. penaei*-positive, which suggests that a transmission from broodstock to progeny can occur (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; Frelief *et al.*, 1992; Ibarra-Gamez *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 following (Lightner *et al.*, 2012).

See WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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* 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 (Ca(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: 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 and this organ should be selected preferentially (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

Hepatobacter penaei can be detected in faeces samples collected from clinically affected populations of *Penaeus vannamei* may be collected and used for testing (usually by PCR), when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Brinez *et al.*, 2003; Frellet *et al.*, 1993; Lightner, 1996). However, the use of faeces samples to detect *H. penaei* NHP in apparently healthy shrimp has not been evaluated. Faeces samples have not been validated to the same level as hepatopancreas samples.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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, but repeated freezing and thawing should be avoided.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. 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 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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	++	+++	+++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> 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 WOAHP 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.

³~~Specify 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 screening populations for infection with 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* in cell culture. No crustacean cell lines exist (Vincent & Lotz, 2007).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

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

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

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).

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
<u>Method 1: Aranguren <i>et al.</i>, 2010; GenBank U65509</u>			
<u><i>H. penaei</i> 16S rRNA-gene</u>	<u>Fwd NHP1300F: CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TAC-AC</u> <u>Rev NHP1366R: GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A</u> <u>Probe: CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA</u>	<u>300 nM</u> <u>100 nM</u>	<u>40 cycles:</u> <u>95°C/15 sec and 60°C/1</u> <u>min</u>
<u>Method 2: Aranguren & Dhar 2018; GenBank JQAJ01000001.1</u>			
<u><i>H. penaei</i>/ Flagella hook gene/protein</u>	<u>Fwd NHP FlgE3qF: AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC</u> <u>Rev FlgE3qR: CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT</u> <u>Probe: CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC</u>	<u>500 nM</u> <u>100 nM</u>	<u>40 cycles:</u> <u>95°C/1 sec and 60°C/20</u> <u>sec</u>

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 & Frellet, 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 TAC AC 3' and 5' GCT CAT CGC CTT AAA GAA AAG ATA A 3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5' CCG CCC GTC AAG CCA TGG AA 3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) 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,N-tetramethyl-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 flagella hook** gene separately.

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Aranguren <i>et al.</i> , 2010; GenBank Accession No. MH230908.1; amplicon size 379 bp			
<i>H. penaei</i> /16S rRNA gene	Fwd NHPF2: CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T Rev NHPR2: GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C	200 nM	35 cycles: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/30 sec
Method 2: Aranguren & Dhar, 2018; GenBank Accession No. JQAJ01000001.1; amplicon size 333 bp			
<i>H. penaei</i> / Flagella hook gene protein	Fwd FlgE 1143F: AGG-CAA-ACA-AAC-CCT-TG Rev FlgE 1475R: GCG-TTG-GGA-AAG-TT	0.2 µM-200 nM	35 cycles,; 95°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec

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- μ l total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 μ M each), dNTPs (200 μ M each), Taq polymerase (0.1 U μ l⁻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

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

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 exist 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~~ is 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical ~~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) A positive result by real-time PCR
- ii) A 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:

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

¹ For example transboundary commodities.

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) A positive result by real-time PCR
- iv) A positive result by conventional PCR
- v) A positive result by *in-situ* hybridisation
- vi) A positive result by bioassay

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 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 followed by amplicon sequencing
- iii) ~~Histopathology consistent with *H. penaei* and positive *in-situ* hybridisation test~~ A positive result by *in-situ* hybridisation and real-time PCR
- iv) A positive result by *in-situ* hybridisation and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- v) ~~A positive result by bioassay followed by real-time PCR~~
- vi) ~~A positive result by bioassay followed by conventional PCR followed by 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

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 (no data are currently available for either). 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, DSp = 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, DSp = 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., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.
- ARANGUREN L.F. & 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.
- BRINEZ 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 YEPÍZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at -20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-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: 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 a WOA Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis)
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis).

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

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 *Decapod penstylhamaparvovirus 1*, of the Genus *Penstylhamaparvovirus* and Family *Parvoviridae* ~~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 (GenBank NC_002190), 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 South-East Asia (principally the Philippines) and Type 2 is from South-East Asia. These genotypes were shown to be are infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon* (Tang *et al.*, 2003). IHHNV genotypes in Ecuador and Peru were found to be within a separate lineage of IHHNV type 2 genotypes circulating within these countries (Aranguen Caro *et al.*, 2022). 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 IHNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: yellowleg shrimp (*Penaeus californiensis*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), and white leg 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 infection with IHNV 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 IHNV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.~~

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: ~~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*).~~

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Achiridae</u>	<u><i>Achirus mazatlanus</i></u>	<u>Mazatlan sole</u>
<u>Centropomidae</u>	<u><i>Centropomus medius</i></u>	<u>blackfin snook</u>
<u>Cichlidae</u>	<u><i>Oreochromis</i> sp.</u>	<u>tilapias</u>
<u>Clupeidae</u>	<u><i>Lile stolifera</i></u>	<u>Pacific piquitinga</u>
<u>Gerreidae</u>	<u><i>Gerres cinereus</i></u>	<u>yellowfin mojarra</u>
<u>Palaemonidae</u>	<u><i>Macrobrachium rosenbergii</i></u>	<u>giant river prawn</u>
<u>Penaeidae</u>	<u><i>Penaeus duorarum</i></u>	<u>northern pink shrimp</u>
	<u><i>Penaeus occidentalis</i></u>	<u>western white shrimp</u>
	<u><i>Penaeus japonicus</i></u>	<u>kuruma prawn</u>
	<u><i>Penaeus semisulcatus</i></u>	<u>green tiger prawn</u>
	<u><i>Artemesia longinaris</i></u>	<u>Argentine stiletto shrimp</u>
<u>Portunoidea-Portunidae</u>	<u><i>Callinectes arcuatus</i></u>	<u>Cuata swimcrab</u>
<u>Varunidae</u>	<u><i>Hemigrapsus penicillatus</i></u>	

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

IHNV 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 IHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

IHNV 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 IHNV 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

~~IHNV was found in wild crabs~~ has been detected in many crustacean and non-crustacean species however their (*Hemigrapsus penicillatus*, *Neohelice granulata*), but there were no clinical signs. Adults of *Macrobrachium rosenbergii* are carriers of IHNV without apparent signs. Although the mussel *Mytilus edulis* is an important reservoir of IHNV (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 IHNV varies among shrimp species and populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with IHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. 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).

In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon*, infection with IHNV 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). 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.

~~Infection with IHNV 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).~~

There was no mortality or clinical signs of disease in *P. vannamei*, *P. monodon* or *P. stylirostris* when experimentally challenged with IHNV genotypes from Ecuador and Peru (Aranguen Caro *et al.*, 2022). The IHNV genotypes were found to be within a separate lineage of IHNV type 2 genotypes circulating within these countries (Aranguen Caro *et al.*, 2022).

~~In the past, stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults showed persistently high mortality rates due to infection with IHNV. 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 IHNV 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 IHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); 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 IHNV 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

Animals with this disease may show one or more of these signs, but the pathogen may still be present in the absence of any signs. Clinical signs are non-specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV 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.

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

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

Infection with IHNV 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).

2.3.3. Gross pathology

Infection with IHNV in Penaeus stylirostris

Infection with IHNV 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 IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV 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 IHNV, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Lightner *et al.*, 1983).

Infection with IHNV in Penaeus vannamei

RDS, a chronic form of infection with IHNV, 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 IHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Lightner, 1996; Primavera & Quintio, 2000).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission of IHNV 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 IHNV 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 IHNV 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.

IHNV 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 WOA/WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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 IHNV 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 IHNV (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 IHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

2.4.5. Inactivation methods

IHNV 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

IHNV 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 IHNV contamination of spawned eggs and larvae but is not effective for preventing transovarian transmission of IHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.7. General husbandry

Some husbandry practices have been successful in preventing the spread of IHNV. 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 IHNV (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

Specimens suitable for testing for infection with IHNV include postlarvae (PL), juveniles and adults. While IHNV may infect all life stages, virus load in spawned eggs and larval stages may be below detection limits, so these life stages are not suitable for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHNV.

3.2. Selection of organs or tissues

IHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHNV 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 IHNV (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).

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 bioassay

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-molecular techniques can be found in Section B. 2-5-5.5. 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. 2-2-5.3 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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	++	++	++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						+	+	1		++	++	1
Bioassay					±	±	±	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 WOAH 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-marginated, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by infection with IHHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.6 *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

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can should be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances optical density or running a gel.

There are multiple geographical variants of IHHNV, some of which are not detected by all of the ~~some~~ 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; [Taengchaiyaphum *et al.*, 2022](#); 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 IHNV sequence but do not amplify IHNV-related EVEs present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprom *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHNV), 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 IHNV 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 IHNV (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). A highly sensitive SYBR Green real-time PCR targeting a segment of the IHNV genome that is considered less susceptible to endogenisation was developed (Encinas-Garcia *et al.*, 2015). More recently, a TaqMan real-time assay capable of differentiating endogenous virus element-EVEs from infectious form of IHNV in *P. monodon* has been reported (Cowley *et al.*, 2018); however, analysis of a *P. monodon* whole genome sequence has identified 100% primer and probe sequence matches to EVEs (Taengchaiyaphum *et al.*, 2022). The real-time PCR method using TaqMan chemistry described in Table 4.4.1 below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

Table 4.4.1. Primers and probes for real-time PCR detection of IHNV

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1* Tang & Lightner, 2001; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266			
<u>IHNV and IHNV-related EVEs</u>	Fwd IHNV1608F: TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A Rev IHNV1688R: GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA	<u>300 nM primers</u> <u>150 nM probe</u>	<u>40 cycles of:</u> <u>95°C/1 sec and</u> <u>60°C/20 sec</u>
<u>non-structural protein</u>	Probe: FAM-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-TAMRA		

***NOTE – this method will amplify EVEs within the genome of *P. monodon*. Positive results in this species must be confirmed by a method that does not react with IHNV EVEs.**

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5' TAC TCC GGA CAC CCA ACC A 3' and 5' GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA 3', respectively. The TaqMan probe (5' ACC AGA CAT AGA GCT ACA ATC CTC GCC TAT TTG 3'), 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 (Krabsetsve *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 IHNV detection. Nested methods are also available. In addition to IHNV, some of these methods will amplify EVEs in *Penaeus monodon*. Positive results in *P. monodon* should be followed up with other methods that will not react with EVEs. 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.

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

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
<u>Method 1* Tang <i>et al.</i>, 2007; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 389 bp-product</u>			
IHNV and IHNV-related EVEs Non-structural protein	Fwd 389F: CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA Rev 389R: GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	200 nM	35 cycles of: 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, and 72°C/30 sec
<u>Method 2* Nunan <i>et al.</i>, 2000; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 356 bp-product</u>			
IHNV and IHNV-related EVEs Between the non-structural and capsid protein-coding regions	Fwd 77012F: TAC TCC GGA CAC CCA ACC A ATC GGT GCA CTA CTC GGA Rev 77353R: GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA TCG TAC TGG CTG TTC ATC	1000 nM	35 cycles of: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec, and 72°C/30 sec
<u>Method 3* Tang <i>et al.</i>, 2000; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 392 bp-product</u>			
IHNV and IHNV-related EVEs Non-structural protein	Fwd 392F: GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA Rev 392R: ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG	300 nM	35 cycles of: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec, and 72°C/30 sec
<u>Method 4 Tang <i>et al.</i>, 2007; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 309 bp-product</u>			
IHNV ORF1	Fwd 309F: TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A Rev 309R: TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A	200 nM	35 cycles of: 94°C/30 sec, 55°C/30 sec, and 72°C/30 sec

***NOTE – these methods will amplify EVEs within the genome of *P. monodon*. Positive results in this species must be confirmed by a method that does not react with IHNV EVEs.**

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 IHNV
389R		GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	and IHNV-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 IHNV and IHNV-related EVEs

Primer	Product	Sequence (5'-3')	G+C%/Temp.	GenBank & References	Specificity
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 a real-time isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) assay are available to detect and confirm IHHNV infection have been published (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

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands must be sequenced and analysed and compared with published in comparison with reference sequences.

PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified products from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the non-infectious IHNV-related EVEs in the host genome (Tang & Lightner, 2006).

4.6. *In-situ* hybridisation

Direct detection methods using DNA probes specific for IHNV are available in dot-blot and ISH formats. The ISH method uses a DIG-labelled DNA probe for IHNV 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 IHNV diagnosis.

- i) For bioassay, feed the minced shrimp tissue suspected of being infected with IHNV 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 **molecular** test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

Known IHNV 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 IHNV 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status.¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical-Hydrographical 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 IHNV 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 IHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criterion criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and a positive result by conventional PCR ~~targeting non-overlapping regions of the viral genome and followed by~~ 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 IHNV 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) Histopathology consistent with IHNV infection
- iii) Positive result by conventional PCR
- iii iv) Positive result by real-time PCR
- iv) ~~Histopathology consistent with IHNV infection~~
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation
- vi) Positive result by bioassay

¹ For example transboundary commodities.

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) Positive result by real-time PCR and a positive result by conventional PCR targeting non-overlapping regions of the viral genome and followed by amplicon sequencing
- ii) ~~Histopathology consistent with IHNV infection coupled with A positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHNV~~ a positive result by real-time PCR
- iii) ~~Histopathology consistent with IHNV infection coupled with A positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHNV~~ by a positive result by conventional PCR and followed by 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 IHNV is provided in Table 6.3.1 (none no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with IHNV, 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, DSp = 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, DSp = 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 (IHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Dis. Aquat. Org.*, **143**, 57–67.

ARANGUREN CARO L.F., GOMEZ-SANCHEZ M.M., PIEDRAHITA Y., MAI H.N., CRUZ-FLORES R., ALENTON R.R.R. & DHAR A.K. (2022). Current status of infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the Peruvian and Ecuadorian shrimp industry. *PLoS One*, **17**(8):e0272456. doi: 10.1371/journal.pone.0272456.

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). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.
- 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., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- COWLEY J.A., RAO M., COMAN G.J. & COWLEY J. (2018). Real-time PCR tests to specifically detect Infectious hypodermal and haematopoietic 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 stylirostris* densovirus in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **212**, 53–58.
- FERNANDO M.C., ENRIQUEZ-ESPINOZA T., VALENZUELA-CASTILLO A., ENCINAS-GARCIA T. & SANCHEZ-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: BRAQQCON 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). IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.*, **22**, 235–243.
- KRABETSVE 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 IHNV 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 stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.

MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.

NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.

NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World 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. & QUINITIO 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 stylirostris* 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.

TAENGCHAIYAPHUM S., WONGKHALUANG P., SITTIKANKAEW K., KAROONUTHAISIRI N., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2022). Shrimp genome sequence contains independent clusters of ancient and current Endogenous Viral Elements (EVE) of the parvovirus IHNV. *BMC Genomics*, **23**, 565. doi: 10.1186/s12864-022-08802-3.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) 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 (IHNV) 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 (IHNV) 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 (IHNV). *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 (IHNV) by real-time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Arch. Virol.*, **160**, 987–994.

*
* *

NB: There are WOAHP Reference Laboratories for infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:

<http://www.woah.org/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

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

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

CHAPTER 2.2.5.

INFECTION WITH
INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious myonecrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious myonecrosis virus (IMNV) that is tentatively assigned to the Family *Totiviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

~~Phylogenetic analysis of its RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene coding sequence indicates that IMNV is most closely related to *Giardia lamblia virus*, tentatively assigned to the family *Totiviridae* a member of the family *Totiviridae* (Fauquet *et al.*, 2005; Lightner, 2011; Nibert, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Wickner *et al.*, 2011).~~

IMNV particles are icosahedral in shape and 40 nm in diameter, with a buoyant density of 1.366 g ml⁻¹ in caesium chloride. The genome consists of a single, double-stranded (ds) RNA molecule of 8226–8230 bp (Loy *et al.*, 2015; Naim *et al.*, 2015). Sequencing of the viral genome reveals two non-overlapping open reading frames (ORFs). The first ORF (ORF1, 470–5596 nt) encodes a putative RNA-binding protein and a capsid protein. The coding region of the RNA-binding protein is located in the first half of ORF1 and contains a dsRNA-binding motif in the first 60 amino acids. The second half of ORF1 encodes a capsid protein, as determined by amino acid sequencing, with a molecular mass of 106 kDa. The second ORF (ORF2, 5884–8133 nt) encodes a putative RdRp (Poulos *et al.*, 2006). The most variable region of IMNV genome is located in the first half of ORF1, coinciding with a region which probably encodes the capsid protrusions (Dantas *et al.*, 2015).

The complete genomes of IMNV types originating from Brazil and Indonesia have been sequenced and found to be 99.6% identical at the nucleotide level (Poulos *et al.*, 2006; Senapin *et al.*, 2007). The 99.6% full genome sequence identity (and anecdotal information on the introduction of *Penaeus vannamei* stocks from Brazil) indicate that the disease was introduced from Brazil to Indonesia in 2006. A new genotype was analysed in infected samples in 2018 in Indonesia, including an isolate that contains a deletion of 622 amino acids (Mai *et al.*, 2019).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

No data.

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

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 IMNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: brown tiger prawn (*Penaeus esculentus*), banana prawn (*P. merguensis*), and 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 IMNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and blue shrimp (*P. stylirostris*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: southern brown shrimp (*P. subtilis*).

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

Juveniles and subadults of *P. vannamei*, farmed in marine, brackish, and low salinity brackish water, appear to be most severely affected by infection with IMNV (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The principal target tissues for IMNV include the striated muscles (skeletal and less often cardiac), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of populations of *P. vannamei* that survive IMNV infections or epizootics may carry the virus.

2.2.6. Vectors

Experimental studies have demonstrated that brine shrimp *Artemia franciscana* can act as a vector for IMNV (da Silva *et al.*, 2015).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where infection with IMNV is enzootic, outbreaks of IMNV infections associated with sudden high morbidity and mortality may follow 'stress' events such as capture by cast-netting, feeding and sudden changes in water salinity or temperature (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). Feed conversion ratios of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007). Mortalities from infection with IMNV can range from 40% to 70% in cultivated *P. vannamei*.

In regions where infection with IMNV is enzootic in farmed stocks of *P. vannamei*, its prevalence may reach 100% (Andrade *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2004).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Affected shrimp present with visibly white tails. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. High mortality can occur suddenly and continue for several days. A sudden onset of clinical signs may have a sudden onset occur following stress events (e.g. capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity).

Only shrimp in the acute phase of disease present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp become lethargic during or soon after stress events such as capture by cast-netting, feeding, sudden changes in water temperature, sudden reductions in water salinity, etc.

2.3.3 Gross pathology

Shrimp in the acute phase of disease present focal-to-extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp.

Exposing the paired lymphoid organs (LO) by simple dissection will show that they are hypertrophied (3–4 times their normal size) (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

IMNV has been demonstrated to be transmitted horizontally by cannibalism (Lightner, 2011; Poulos *et al.*, 2006). Transmission via water probably occurs. Although vertical transmission is suspected from anecdotal evidence, it is not known whether this occurs via transovarial mechanism or by surface contamination of newly spawned eggs.

2.3.5. Environmental factors

Temperature and salinity effects are likely predisposing factors to disease outbreaks, but no experimental data are available (Nunes *et al.*, 2004).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with IMNV has been reported to occur in some countries in the Americas, Asia and Africa (Aly *et al.*, 2021; Andrade *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2004; Naim *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Sahul *et al.*, 2017).

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

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for infection with IMNV are available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Ctn[15-34], a cathelicidin-derived eicosapeptide was found to demonstrate antiviral activity against IMNV in primary haemocyte cultures (Vieira-Girao *et al.*, 2017).

2.4.3. Immunostimulation

No data.

2.4.4. Breeding resistant strains

There are anecdotal reports of some selected lines of *P. vannamei* having better survival and culture performance in farms where infection with IMNV is enzootic. During a 20-day controlled laboratory study in which the shrimp were challenged with IMNV, some domesticated lines of *P. vannamei* were found to survive better than other lines (White-Noble *et al.*, 2010).

Penaeus monodon and *P. stylirostris*, for which there is incomplete evidence of susceptibility (see section 2.2.2), are considered to be more resistant to infection with IMNV than *P. vannamei* (Tang *et al.*, 2005).

2.4.5. Inactivation methods

No data.

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

While IMNV is believed to be transmitted vertically, there are no scientific data confirming this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is a good management practice recommended to reduce the potential for transmission of a number of penaeid shrimp diseases from female spawners to their eggs or larvae, and the practice may reduce IMNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.7. General husbandry

Management practices in endemic areas principally involves exclusion of IMNV from shrimp farms. Broodstock or their spawned eggs or nauplii are PCR-tested and those that test positive are discarded (Andrade *et al.*, 2007). Following and restocking of affected farms or entire culture regions with IMNV-free stocks of *P. vannamei* most suited to local culture conditions has proven to be the most successful for preventing and controlling other virus diseases of shrimp, and should be applicable to control and prevent infection with IMNV (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

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

Specimens suitable for testing for infection with IMNV using molecular methods (e.g. RT-PCR, nested RT-PCR, real-time RT-PCR, etc.) include postlarvae (PL), juveniles, subadults and adults. While IMNV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in larval stages, so these life stages may not be suitable for demonstrating freedom from infection with IMNV unless validated for those life stages.

3.2. Selection of organs or tissues

IMNV infects tissues of mesodermal origin. The principal target tissues in the acute phase of infection with IMNV are the striated muscles (skeletal and less commonly cardiac muscle), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ tubule parenchymal cells. In chronic infections, the lymphoid organ may be the principal target tissue.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

IMNV replicates systemically but does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of IMNV infection.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

3.5. Preservation of samples for submission

Several factors can affect specimen quality during collection, handling and storage, such as exposure to light, heat, desiccation, and incomplete preservation. Hence, standard operating protocols or recommended practices should be followed at all steps of the diagnostic process.

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

3.5.1. Samples for pathogen isolation

Not applicable.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples (pleopods, cephalothorax, muscle, haemolymph) 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.

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 2.3.0 *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. 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 fry can be pooled to obtain the minimum amount of material for 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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					+	+	+	1				
Histopathology					++	++	++	2				
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+	++	++	1	++	++	++	2	++	++	++	2
Conventional RT-PCR	+	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods												
Other methods												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

4.1. Wet mounts

Stained or unstained tissue squashes of affected skeletal muscle or of the LO may show abnormalities. Tissue squashes of skeletal muscle when examined with phase or reduced light microscopy may show loss of the normal striations. Fragmentation of muscle fibres may also be apparent. Squashes of the LO may show the presence of significant accumulations of spherical masses of cells called lymphoid organ spheroids (LOS) amongst normal LO tubules.

4.2. Histopathology and cytopathology

Infection with IMNV in the acute and chronic phases can be presumptively diagnosed using histology (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). However, the lesions in striated muscles and LO are not pathognomonic for infection with IMNV. White tail disease of penaeid shrimp caused by the *P. vannamei* nodavirus (PvNV) can mimic infection with IMNV (Tang *et al.*, 2007).

Haematoxylin and eosin stained tissue sections from shrimp with acute-phase infection with IMNV present myonecrosis with characteristic coagulative necrosis of striated (skeletal) muscle fibres, often with marked oedema among affected muscle fibres. Some shrimp may present a mix of acute and older lesions. The affected muscle fibres appear to progress from presenting coagulative necrosis to liquefactive necrosis, which is accompanied by moderate infiltration and accumulation of haemocytes. In the most advanced lesions, haemocytes and inflamed muscle fibres are replaced by a loose matrix of fibrocytes and connective tissue fibres that are interspersed with haemocytes and foci of (presumed) regenerating muscle fibres (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

Significant hypertrophy of the LO caused by accumulations of LOS is a highly consistent lesion in shrimp with acute or chronic-phase infection with IMNV lesions. Often, many ectopic LOS are found in other tissues not near the main body of the LO. Common locations for ectopic LOS include the haemocoelom in the gills, heart, near the antennal gland tubules, and ventral nerve cord (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.3. Cell culture for isolation

No crustacean cell lines exist, but IMNV was observed to propagate in C6/36 subclone of *Aedes albopictus* cell line (Kumar *et al.*, 2020). Performance of the test should be confirmed before being recommended.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

Published methods are available for the molecular detection of IMNV by *in-situ* hybridisation (ISH), nested RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005). A nested RT-PCR kit for detection of the virus is available commercially.

4.4.1. Real-time RT-PCR

A real-time RT-PCR method was developed to detect and quantify IMNV in shrimp tissue. The method which can detect as few as 10 IMNV RNA copies μl^{-1} total RNA (Andrade *et al.*, 2007) is summarised below.

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'-3')	Concentration	Cycling parameters
------------------------	----------------------	---------------	--------------------

Method 1: Andrade <i>et al.</i> , 2007; GenBank Accession No.: AY570982			
IMNV Capsid protein gene	Fwd IMNV412F: GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA Rev IMNV545R: AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT Probe: CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG	300 Nm 200 nM	40 cycles of: 95°C/3 sec and 60°C/30 sec

4.4.2. Conventional PCR

The nested RT-PCR method to detect IMNV uses two PCR primer sets that produce a 328 bp one-step amplicon and 139 bp two-step amplicon. The 1-step PCR can detect as little as 100 IMNV RNA copies and the 2-step PCR can detect in the order of 10 IMNV RNA copies (Poulos & Lightner, 2006).

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Poulos & Lightner, 2006; GenBank Accession No.: KJ636783.2; amplicon size: 328/139 bp			
IMNV Capsid protein gene (nested-PCR)	<u>Outer-Primary</u> Fwd 4587F: CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA Rev 4914R: ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT	200 nM	45 cycles of: 95°C/45 sec; 60°C/45 sec; 60°C/7 min
	<u>Inner-Nested</u> Fwd 4725 NF: GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA Rev 4863 NR: AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G	620 nM	39 cycles of: 95°C/30 sec, 65°C/30 sec, 72°C/30 sec; 72°C/2 min

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

DNA probe for ISH detection of IMNV

A cDNA library was generated from RNA extracted from purified IMNV. A IMNV-specific ISH DNA probe is prepared from clone IMNV-317 by PCR labelling with digoxigenin-11-dUTP (DIG). The PCR primers used for amplification of the 993 bp probe are IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') and IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3'). Following PCR, the DIG-labelled DNA probe is precipitated with ethanol, re-suspended in water and stored at -20°C until used. The ISH procedure for detecting IMNV follows that outlined by Tang *et al.* (2005). Negative and positive controls should be sourced from PCR-confirmed uninfected and infected shrimp, respectively.

4.7. Immunohistochemistry

Monoclonal antibodies have been generated using recombinant IMNV capsid protein fragments to immunise mice (Kunanopparat *et al.*, 2011). Immunohistochemical analysis demonstrated strong reactivity in muscle, gill, heart, LO and connective tissue derived from IMNV-infected *P. vannamei* similar to that demonstrated by *in-situ* hybridisation (Tang *et al.*, 2005). There was no cross-reactivity to tissues derived from uninfected shrimp or shrimp infected with other viral pathogens such as WSSV, YHV, TSV among others.

4.8. Bioassay

Not applicable.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

None are recommended, however an immunochromatographic strip test has been developed (Chaivisuthangkura *et al.*, 2013) using the monoclonal antibodies developed by Kunanopparat *et al.* (2011). While the test is simple, fast and low-cost it is approximately 300-fold less sensitive than one-step RT-PCR (Chaivisuthangkura *et al.*, 2013).

4.10. Other methods

A chromatographic method for detection of PCR amplicons has been developed (Koiwai *et al.*, 2018).

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

Real-time RT-PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with IMNV in apparently healthy populations as described in Section 4.1.1.

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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case.~~ If a laboratory-Competent Authority does not have the capacity-capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free. There are currently no WOA Reference Laboratories designated for IMN.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status.¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 IMNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- ~~i) Histopathology consistent with the presence of the pathogen or the disease~~
- i) Positive result by real-time RT-PCR
- ii) Positive result by conventional RT-PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

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

- i) Positive result by real-time RT-PCR and positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

¹ For example transboundary commodities.

- ~~ii) Histopathology consistent with IMNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IMNV in a tissue sample by real-time RT-PCR~~
- ~~ii) Histopathology consistent with IMNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IMNV in a tissue sample by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing~~

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 IMNV 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 RT-PCR
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Histopathology consistent with the presence of the pathogen or the disease

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) Positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR
- iii) Positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IMNV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with IMNV, 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	Experimentally infected SPF <i>P. vannamei</i>	abdominal muscle	<i>P. vannamei</i>	100 (<u>n=30</u>)	100 (<u>n=30</u>)	Histopathology	Andrade <i>et al.</i> (2007)

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = 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
-----------	--------------	--------------------	------------------------	---------	---------	---------	----------------	----------

Real-time PCR								
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = 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. doi: 10.3354/dao03556. PMID: 33570040.
- ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**, 9–15.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.
- CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., WANGMAN P., LONGYANT S. & SITHIGORNUL P. (2013). Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using an immunochromatographic strip test. *Arch Virol.*, **158**, 1925–1930.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- DANTAS M.D., CHAVANTE S.F., TEIXEIRA D.I., LIMA J.P. & LANZA D.C. (2015). Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). *Virus Res.*, **20**, 66–71. doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.015. Epub 2015 Apr 4. PMID: 25849112.
- DA SILVA S.M.B.C., LAVANDER H.D., DE SANATANA LUNA M.M., DA SILVA A.O.M.E., GALVEZ A.O. & COIMBRA M.R.M. (2015). *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. *J. Invertebr. Pathol.*, **126**, 1–5.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A., EDITORS (2005). *Totiviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Francisco, USA, pp. 571–580.
- KOIWAI K., KODERA T., THAWONSUWAN J., RIANI S., KAWASE M., KONDO H. & HIRONO I. (2018). Rapid diagnosis of three shrimp RNA viruses using RT-PCR-DNA chromatography. *J. Fish Dis.*, 2018 May 28. doi: 10.1111/jfd.12821. Epub ahead of print. PMID: 29806113.
- KUNANOPPARAT A., CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANY S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, **171**, 141–148.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J., EDITORS (2003). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, **106**, 110–130.

-
- LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.F.J., REDMAN R.M., PASOS DE ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 85.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.
- LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, **96** (Pt 7), 1821–1819.
- MAI H.N., HANGGONO B., CARO L.F.A., KOMARUDDIN U., NUR'AINI Y.L. & DHAR A.K. (2019). Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) genotypes associated with disease outbreaks on *Penaeus vannamei* shrimp farms in Indonesia. *Arch. Virol.*, **164**, 3051–3057. doi: 10.1007/s00705-019-04408-5. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31531743.
- MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17: Selective breeding of penaeid shrimp. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 425–452.
- NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, **189**, 99–105.
- NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, **160**, 1579–1583.
- NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1315–1318.
- NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, **83**, 37–51 (in Portuguese).
- POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 69–72.
- POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **87**, 987–996.
- SAHUL HAMEED A.S., ABDUL MAJEED S., VIMAL S., MADAN N., RAJKUMAR T., SANTHOSHKUMAR S. & SIVAKUMAR S. (2017). Studies on the occurrence of infectious myonecrosis virus in pond-reared *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. *J. Fish Dis.*, **40**, 1823–1830. doi: 10.1111/jfd.12655. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28631825
- SANTHOSH KUMAR S., SIVAKUMAR S., ABDUL MAJEED S., VIMAL S., TAJU G. & SAHUL HAMEED A.S. (2021). *In vitro* propagation of infectious myonecrosis virus in C6/36 mosquito cell line. *J. Fish Dis.*, **44**, 987–992. doi: 10.1111/jfd.13359. Epub 2021 Feb 25. PMID: 33631045.
- SENA PIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, **266**, 32–38.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 261–265.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 183–190.
-

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.

VIEIRA-GIRÃO P.R.N., FALCÃO C.B., ROCHA I.R.C.B., LUCENA H.M.R., COSTA F.H.F. & RÁDIS-BAPTISTA G. (2017). Antiviral Activity of Ctn[15–34], A Cathelicidin-Derived Eicosapeptide, Against Infectious Myonecrosis Virus in *Litopenaeus vannamei* Primary Hemocyte Cultures. *Food Environ. Virol.*, **9**, 277–286. doi: 10.1007/s12560-017-9285-5. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28210987.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

Wickner R.B., Ghabrial S.A., Nibert M.L., Patterson J.L. & Wang C.C. (2011). Totiviridae. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Elsevier, San Diego, USA.

*
* *

NB: At the time of publication (2022) there was no WOA Reference Laboratory for infection with infectious myonecrosis virus (please consult the WOA web site: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

NB: FIRST ADOPTED IN 2009. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.7.

INFECTION WITH TAURA SYNDROME VIRUS

1. Scope

Infection with Taura syndrome virus means infection with the pathogenic agent Taura syndrome virus (TSV), Genus Aparavirus, Family *Dicistroviridae*, Order *Picornavirales*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

TSV was described as the cause of the disease commonly known as Taura syndrome by Hasson *et al.* (1995), Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) of TSV have been documented based on the gene sequence encoding VP1 the largest and presumably dominant of the three major structural proteins of the virus. Based on VP1 sequence variations, these genotypic groups are: 1) the Americas group; 2) the South-East Asian group; 3) the Belize group; and 4) the Venezuelan group (Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

At least two distinct antigenic variants of TSV have been identified by their differential reactivity to monoclonal antibody MAb 1A1, produced using a reference isolate from the Americas (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Poulos *et al.*, 1999) as the immunogen: Type A represents those that react with MAb 1A1 (in the enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], Western blots and immunohistochemistry (IHC) with infected tissues) and those that do not were subdivided into Type B (TSV 98 Sinaloa, Mexico) and Type C (TSV 02 Belize), based on host species and virulence. All TSV isolates of the Americas and most, if not all, South-East Asian genotypes react with MAb 1A1. In marked contrast, none of the Belize genotype group reacts with MAb 1A1 (Robles-Sikisaka *et al.*, 2002), nor does a TSV isolate from the 2005 epizootic in Venezuelan shrimp farms.

TSV particles are 32 nm in diameter, non-enveloped icosahedrons and have a buoyant density of 1.338 g ml⁻¹ in CsCl. The genome of TSV consists of a linear, positive-sense single-stranded RNA 10,205 nucleotides in length, excluding the 3' poly-A tail, and it contains two large open reading frames (ORFs). ORF 1 contains the sequence motifs for non-structural proteins, such as helicase, protease and RNA-dependent RNA polymerase. ORF 2 contains the sequences for TSV structural proteins, including the three major capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (55, 40, and 24 kDa, respectively). The virus replicates in the cytoplasm of host cells (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

Other reported causes of Taura syndrome: TS in Ecuador was initially linked to fungicide contamination of shrimp farms, a contention that was supported by litigation for ~16 years after the disease was scientifically shown to have a viral aetiology (Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995). Hence, several papers in the literature propose a toxic aetiology for TS (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

No information available.

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 TSV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), 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 infection with TSV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*), giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), the copepod *Ergasilus manicatus*, and the barnacles *Chelonibia patula* and *Octolasmis muelleri*. Evidence is lacking for these species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is TSV, 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 species, but no active infection has been demonstrated: blue crab (*Callinectes sapidus*), the crabs *Uca vocans* and *Sesarma mederi*, gulf killifish (*Fundulus grandis*), Indo-Pacific swamp crab (*Scylla serrata*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*) and southern white shrimp (*P. schmitti*).

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

Infection with TSV has been documented in all life stages (i.e. post-larvae [PL], juveniles and adults) of *P. vannamei* except eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Using injection and *per os* challenge experiments, Nunan *et al.* (2004) demonstrated TSV could be detected in different body parts including gills, head, whole tail, tail muscle, pleopod and tail fan (Nunan *et al.*, 2004). While there was no significant difference in the viral copy number contained in different body parts when TSV was administered via injection, there was a statistically significant difference between tail/gills, tail/head, tail/tail fan, whole tail/tail fan and pleopods/tail fan when the viral inoculum was administered *per os*. The tail samples had the lower viral copy numbers, as did the whole tail and pleopods when compared to the tail fan (Nunan *et al.*, 2004).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Not demonstrated unequivocally

2.2.6. Vectors

Sea birds: TSV has been demonstrated to remain infectious for up to 48 hours (after ingestion of TSV-infected shrimp carcasses) in the faeces passed by wild or captive sea gulls (*Larus atricilla*) and chickens (*Gallus gallus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastrointestinal system of any bird species. These findings implicate birds as being an important mechanical vector for the transmission of the virus within affected farms or farming regions (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Aquatic insects: the water boatman (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], an aquatic insect that feeds on shrimp carcasses in shrimp farm ponds) have been demonstrated to transport TSV within their intestinal contents, but are not directly infected by the virus (Brock, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; reviewed in Dhar *et al.*, 2004).

2.3. Disease pattern

Infection with TSV is best known as a disease of nursery- or grow-out-phase *P. vannamei* that occurs within ~14–40 days of stocking PLs into grow-out ponds or tanks, hence, shrimp with TSV infection are typically small (~0.05 g to <5 g) juveniles. Larger shrimp may also be affected, especially if they are not exposed to the virus until they are larger juveniles or adults (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz, 1997).

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

At the farm level, outbreaks of infection with TSV involving stocks of *P. vannamei* (the principal host species for infection with TSV) not selected for resistance, typical cumulative mortalities range from 40 to >90% in cultured populations of PL, juvenile, and subadult life stages. TSV-resistant lines of *P. vannamei* are available which show survival rates of up to 100% in laboratory challenge with all four TSV genotypes (Lightner *et al.*, 2009).

In regions where the virus is enzootic in farmed stocks, the prevalence of infection with TSV has been found in various surveys to range from 0 to 100% (Brock, 1997; Jimenez *et al.*, 2000).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Only acute-phase clinical infection with TSV can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute-phase clinical infection with TSV.

Only shrimp with acute-phase clinical infection with TSV present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp apparently become hypoxic and move to the pond edges or pond surface where dissolved oxygen levels are higher. Such shrimp may attract seabirds in large numbers. In many disease outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicates the presence of a serious disease outbreak (which is often either infection with TSV or white spot syndrome virus) to the farm manager.

2.3.3. Gross pathology

Infection with TSV has three distinct phases, acute, transition, and chronic, which are grossly distinguishable (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1995). Gross signs presented by juvenile, subadult and adult shrimp in the transition phase of infection with TSV are unique and provide a suspicion of infection.

Acute phase: gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase infection with TSV include expansion of the red chromatophores giving the affected shrimp a general, overall pale reddish colouration and making the tail fan and pleopods distinctly red; hence 'red tail' disease was one of the names given by farmers when the disease first appeared in Ecuador (Lightner *et al.*, 1995). In such shrimp, close inspection of the cuticular epithelium in thin appendages (such as the edges of the uropods or pleopods) with a ×10 hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute infection with TSV typically have soft shells, an empty gut and are often in the late D stages of the moult cycle. Acutely affected shrimp usually die during ecdysis.

Transition (recovery) phase: although only present for a few days during outbreaks of infection with TSV, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a suspicion of infection with TSV. During the transition phase (which may be occurring while many shrimp in the affected populations are still in the acute phase and daily mortalities are high), fair to moderate numbers of shrimp in affected ponds show random, multifocal, irregularly shaped melanised cuticular lesions. These melanised spots are haemocyte accumulations indicating the sites of resolving TSV lesions in the cuticular epithelium. Such shrimp may or may not have soft cuticles and red-chromatophore expansion, and may be behaving and feeding normally (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a).

Chronic phase: after successfully moulting, shrimp in the transition phase move into the chronic phase of infection with TSV in which persistently infected shrimp show no obvious signs of disease (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1995). However, *P. vannamei* that are chronically infected with TSV may be less resistant to normal environmental stressors (i.e. sudden salinity reductions) than uninfected shrimp.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Not applicable.

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks of infection with TSV are more frequent when salinities are below 30 ppt (Jimenez *et al.*, 2000).

2.3.6. Geographical distribution

TSV is now widely distributed in the shrimp-farming regions of the Americas, South-East Asia and the Middle East (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2009; Vergel *et al.*, 2019; Yu & Song, 2000).

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

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for TSV are available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Breeding resistant strains

After TSV emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to infection with TSV (genotype 1, MAb 1A1 Type A). Following on from this discovery and due to the disease occurrence in Mexico in 1994 where it caused crop failures of *P. vannamei*, selected lines of TSV-resistant *P. stylirostris* became the dominant shrimp farmed in western Mexico from 1995. However, in 1998–1999, a new 'strain' of TSV (Type B; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarain-Herzberg & Ascencio, 2001) emerged and caused massive epizootics in *P. stylirostris*. The emergence of this new 'strain' of TSV was soon followed in late 1999 by the introduction of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp farms in western Mexico, to which *P. stylirostris* had no resistance, effectively ending any interest in the culture of *P. stylirostris* in Mexico.

TSV-resistant domesticated stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have been developed. Some domesticated lines of TSV-resistant *P. vannamei* (that are also TSV-free) are in widespread use by the shrimp-farming industries of the Americas and South-East Asia (Clifford, 1998; White *et al.*, 2002). After the appearance of infection with TSV in Central America, improved TSV resistance was reported in wild caught *P. vannamei* PLs used to stock shrimp farms in the region. Currently all genetic lines of *P. vannamei* shrimp that are being cultured in Asia and the Americas contain varying levels of tolerance/resistance to TSV.

2.4.5. Inactivation methods

No information available.

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

It is possible that TSV might be transmitted vertically (transovarian transmission), despite the lack of published reports documenting this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is good management practice and it is recommended for its potential to reduce TSV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.7. General husbandry

Some husbandry and disease control and management practices have been used successfully to reduce the risks of infection with TSV occurring during farm grow-out. These include the application of PCR assays for pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), fallowing and restocking of entire culture regions with TSV-free stocks (Dixon & Dorado, 1997), and the development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Wyban 1992). The adoption of the latter technology (SPF stocks) has proven to be among the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with TSV.

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

Suitable specimens for testing for infection with TSV include PL, juveniles and adults. While TSV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for TSV detection ~~or certification of freedom from infection with TSV.~~

3.2. Selection of organs or tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of infection with TSV is the cuticular epithelium. In chronic infections the lymphoid organ (LO) is the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

TSV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection with TSV.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or pleopods can be collected without killing the animals and used as non-lethal sampling of genetically valuable broodstock.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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~~ bioassay

The success of ~~pathogen isolation~~ bioassay depends strongly on the quality of samples (which is influenced 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 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 animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be preserved in ethanol it may be frozen.~~

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. 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 Chapter 2.2.0. *General information (diseases of crustaceans)*.

3.5.4. Samples for other tests

Haemolymph could be used for PCR-based detection of TSV.

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 animals should be processed and tested individually.

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, 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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	+	+	+	NA				
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP												
IFAT												
ELISA												
Other antigen detection methods												
Other method												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; IFAT = indirect fluorescent antibody test; ELISA = 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.

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

4.1. Wet mounts

Direct microscopy of simple unstained wet mounts from excised pieces of the gills, appendage tips, etc., examined by phase- or reduced-light microscopy may be used to demonstrate (and make a tentative diagnosis of acute-phase infection with TSV) focal lesions of acute-phase infection with TSV in cuticular epithelial cells. Preparations presenting acute-phase infection with TSV will contain numerous spherical structures (see the histopathological methods in Section 4.2.3 above), which are pyknotic and karyorrhectic nuclei and cytoplasmic remnants of necrotic cells.

4.2. Histopathology and cytopathology

Histopathology is a useful method to detect infection with TSV in the acute and chronic phases of infection (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). In chronic infections with TSV, the only lesion typically presented by infected shrimp is the presence of an enlarged LO with multiple LO spheroids (LOS) (Hasson *et al.*, 1999b), which cannot be distinguished from LOS induced by chronic infections of other RNA viruses (Lightner, 1996a). When histological lesions are observed and infection with TSV is suspected, a molecular test (ISH with TSV-specific probes, or reverse-transcription [RT] PCR) must be used for confirmation of infection with TSV (see Section 6).

4.2.1. Acute phase of Taura syndrome

The acute phase of the disease is characterised by multifocal areas of necrosis in the cuticular epithelium of the general body surface, appendages, gills, hindgut, and foregut (the oesophagus, anterior and posterior chambers of the stomach). Cells of the subcuticular connective tissues and adjacent striated muscle fibres basal to affected cuticular epithelium are occasionally affected. In some severe cases of acute-phase infection with TSV, the antennal gland tubule epithelium is also destroyed. Prominent in the multifocal cuticular lesions are conspicuous foci of affected cells that display an increased eosinophilia of the cytoplasm and pyknotic or karyorrhectic nuclei. Cytoplasmic remnants of necrotic cells are often extremely abundant in these infections with TSV acute-phase lesions and these are generally presented as spherical bodies (1–20 µm in diameter) that range in staining from eosinophilic to pale basophilic. These structures, along with pyknotic and karyorrhectic nuclei, give acute-phase TS lesions a characteristic ‘peppered’ or ‘buckshot-riddled’ appearance, which is considered to be pathognomonic for the infection when there is no concurrent necrosis of the parenchymal cells of the LO tubules. The absence of necrosis of the LO in acute-phase infection with TSV distinguishes it from acute-phase infection with yellowhead virus genotype 1 in which similar patterns of necrosis to those induced by infection with TSV may occur in the cuticular epithelium and gills (Lightner, 1996a).

In TSV-infected tissues, pyknotic or karyorrhectic nuclei give a positive (for DNA) Feulgen reaction, which distinguishes them from the less basophilic to eosinophilic cytoplasmic inclusions that do not contain DNA. The absence of haemocytic infiltration or other signs of a significant host-inflammatory response distinguishes the acute phase of infection with TSV from the transitional phase of the disease (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

4.2.2. Transition (recovery) phase of infection with Taura syndrome virus

In the transitional phase of infection with TSV, typical acute-phase cuticular lesions decline in abundance and severity and are replaced by conspicuous infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. The masses of haemocytes may become melanised giving rise to the irregular black spots that characterise the transition phase of the disease. In H&E sections, such lesions may show erosion of the cuticle, surface colonisation and invasion of the affected cuticle and exposed surface haemocytes by *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Sections of the LO during the transition phase of infection with TSV may appear normal with H&E staining. However, when sections of the LO are assayed for TSV by ISH with a specific cDNA probe (or by ISH with MAb 1A1 for TSV type A, genotype 1), large quantities of TSV are shown accumulating in the more peripheral parenchymal cells of the LO tubules (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3. Chronic phase of infection with Taura syndrome virus

Shrimp in the chronic phase of infection with TSV display no gross signs of infection, and histologically the only sign of infection is the presence of numerous prominent LOS, which may remain associated with the main body of the paired LO, or which may detach and become ectopic LOS bodies that lodge in constricted areas of the haemocoel (i.e. the heart, gills, in the subcuticular connective tissues, etc.). Such LOS are spherical accumulations of LO cells and haemocytes and may be distinguished from normal LO tissues by their spherical nature and the lack of the central vessel that is typical of

normal LO tubules. When assayed by ISH with a cDNA probe for TSV (or with MAb 1A1 using ISH) some cells in the LOS give positive reactions to the virus, while no other target tissues react (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b).

4.3. Cell culture for virus isolation

TSV has not been grown *in vitro*, as no crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Pantoja *et al.*, 2004). Although one publication incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle *et al.*, 2003), two other laboratories that repeated the study both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines that are known to have susceptibility to human picornaviruses (Luo *et al.*, 2004; Pantoja *et al.*, 2004).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

4.4.1. Real-time reverse-transcription (RT)-PCR

Real-time RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantage of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real time RT-PCR is approximately equal to 100 copies of the target sequence from the TSV genome (Dhar *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

The real-time RT-PCR method described below for TSV follows the method used in Tang *et al.*, 2004.

Primer and probe sequences, real time RT-PCR

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Tang <i>et al.</i> , 2004); GenBank Accession No.: AF4277675			
TSV/ORF-1 Nt 1024 to 1051	Fwd: TSV1004: TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T- Rev: TSV1075 GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT	300 nM of each primer	Reverse transcription at 50°C/30 min 40 cycles of 95°C/3 sec and 60°C/30 sec
	Probe: TSV-P1 FAM-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-TAMRA,	100 nM of probe	

4.4.2. Conventional RT-PCR

Tissue samples (haemolymph, pleopods, whole small shrimp etc) may be assayed for TSV using RT-PCR. The RT-PCR method outlined below for TSV follows the method used in Nunan *et al.* (1998).

Primer and probe sequences, conventional RT-PCR

Pathogen / target gene	Primer /probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Nunan <i>et al.</i> , 1998); product-amplicon size: 231 bp			
TSV/ORF 2	Fwd: 9992: AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT	Primers/620 nM each	Reverse transcription 60°C/30 min

	Rev:9195R: TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC		40 cycles: 94°C/45 sec, 60°C/45 sec
--	---------------------------------------	--	--

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None currently available.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation (ISH)

4.6.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for detection of TSV may be produced in the laboratory. The ISH method provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for TSV detection and diagnosis that employ classic histological methods (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner & Redman 1998; Mari *et al.*, 1998). The ISH assay of routine histological sections of acute- and transition-phase lesions in the cuticular epithelium, other tissues, and of LOS in transition and chronic phase with a specific DIG-labelled cDNA probe to TSV, provides a definitive diagnosis of infection with TSV (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Pathognomonic TSV-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. Not reacting to the probe are the prominent karyorrhectic nuclear fragments and pyknotic nuclei that contribute to the pathognomonic 'buckshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (See Chapter 2.2.4 *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.)

False-negative ISH results may occur with Davidson's fixed tissues if tissues are left in fixative for more than 24–48 hours. The low pH of Davidson's fixative causes acid hydrolysis of the TSV single-stranded RNA genome, resulting in false-negative probe results. This hydrolysis can be prevented by avoiding fixation times over 24 hours (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998).

4.7. Immunohistochemistry

Not suitable.

4.8. Bioassay

Confirmation of infection with TSV may be accomplished by bioassay of TSV-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the virus (Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Oral or injection protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped carcasses of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks (White *et al.*, 2002). The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only SPF (TSV-free) tissue and normal shrimp feed is required. When the carcass feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for TSV, TSV-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of disease and unusual mortalities (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

With the injection bioassay protocol, a variety of sample types may be tested for TSV. Whole shrimp are used if they were collected during an outbreak of infection with TSV. Heads only should be used if shrimp display gross transition-phase lesions (multifocal melanised spots on the cuticle) or no clinical signs of infection (chronic phase) as the virus, if present, will be concentrated in the LO (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). For non-lethal testing of broodstock, haemolymph samples may be taken and used to expose the indicator shrimp by IM injection (Lightner, 1996a).

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Not recommended.

4.10. Other methods

4.10.1. Dot-blot immunoassay method

- i) For the dot-blot immunoassay method, 1 µl of test antigen (purified virus, infected shrimp haemolymph or SPF shrimp haemolymph) is dotted on to the surface of MA-HA-N45 assay plates (Millipore).¹
- ii) After air drying, the wells are blocked for 1 hour at room temperature with 200 µl of a buffer containing phosphate-buffered saline and 0.05% Tween 20 (PBST) mixed with 10% normal goat serum (Life Technologies) and 2% Hammersten casein (Amersham Life Sciences).
- iii) The wells are washed three times with PBST and then reacted with 100 µl primary antibody (MAb or mouse polyclonal antibodies) for 30 minutes at room temperature.
- iv) Alkaline-phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG, γ chain specific, secondary antibody (Zymed) diluted 1/1000 in PBST plus 10% normal goat serum is used for detection (30 minutes at room temperature).
- v) After washing three times with PBST, once with PBS and once with distilled water, the reactions are visualised by development for 15 minutes at room temperature with nitroblue tetrazolium and bromo-chloro-indoyl phosphate (Roche Diagnostics in 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl buffer containing 50 mM MgCl₂, pH 9.5).
- vi) Reactions are stopped with distilled water.
- vii) The reactions are graded using a scale from 0 to +4, with the highest intensity reaction being equivalent to the reaction generated using the MAb against the reference control consisting of semi-purified TSV. A negative reaction is one in which no coloured spot is visible in the well.

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

Real-time RT-PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with TSV in apparently healthy populations as described in Section 4.1.1.

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. ~~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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.~~

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status...²

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

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

¹ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by WOA. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

² For example transboundary commodities.

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

- ~~i) Histopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease~~
- i) A positive result by real-time RT-PCR
- ii) A positive result by conventional RT-PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

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

- i) A positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by sequencing of the amplicon
- ~~ii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR~~
- ~~iii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing~~

6.2. Clinically affected animals

No clinical signs are 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 TSV 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) Histopathological changes consistent with TSV infection
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Positive result by conventional RT-PCR
- v) Positive result of a bioassay

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) A positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by sequencing of the amplicon
- ii) A positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR
- iii) A positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with TSV are provided in Tables 6.3.1 and 6.3.2. ~~(none-no data are currently available for either)~~. This information can be used for the design of surveys for infection with TSV, 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 surveillance 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, DSp = 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, DSp = diagnostic specificity.

7. References

- AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISENO-GARCIA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.
- BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.
- BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: *Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: *Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress*, D.E. Jory, ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., COWLEY J.A., HASSON K.W. & WALKER P.J. (2004). Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp. *Adv. Virus Res.*, **64**, 353–421.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, May/June, 30–42.
- FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.
- GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

-
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MARI J. & BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 365–379.
- JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.
- JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996b). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.
- LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquac.*, **9**, 27–52.
- 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. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 384–424.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.
- LOTZ J.M. (1997). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.
- LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.
- LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.
- NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.
-

-
- NIELSEN L., SANG-OU M., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- NUNAN L.M., TANG-NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture*, **229**, 1–10.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCLWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.
- POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.
- ROBLES-SIKISAKA R., HASSON K.W., GARCIA D.K., BROVONT K., CLEVELAND K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2002). Genetic variation and immunohistochemical differences among geographical isolates of Taura syndrome virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **83**, 3123–3130.
- ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.
- SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Res.*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- VERGEL J.C.V., CABAWATAN L.D.P., MADRONA V.A.C., ROSARIO A.F.T., STA. ANA J.B.M., TARE M.V.R. & MANINGAS M.B.B. (2019). Detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Philippines. *Philipp. J. Fish.*, **26**, 8–14.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.
- WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, **33**, 341–348.
- WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.
- YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **5**, 21–24.
-

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

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with Taura syndrome virus
(please consult the WOA Web site for the most up-to-date list:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with Taura syndrome virus

NB: FIRST ADOPTED IN 2006. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.8.

INFECTION WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

1. Scope

Infection with white spot syndrome virus means infection with the pathogenic agent white spot syndrome virus (WSSV), Genus *Whispovirus*, Family *Nimaviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

WSSV was assigned by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) as the only member of the genus *Whispovirus* within the *Nimaviridae* family. Virions of WSSV are ovoid or ellipsoid to bacilliform in shape, have a regular symmetry, and measure 80–120 nm in diameter and 250–380 nm in length. A flagella-like extension (appendage) may be observed at one end of the virion. WSSV has been divided into three groups: isolates originating from Thailand (WSSV-TH-96-II), isolates originating from India (WSSV-IN-07-I), and another Indian isolate (WSSV-IN-06-I). Most strains of WSSV were speculated to have originated from the Indian Ocean and then spread across the world (Zeng, 2021). Today, although various geographical isolates with genotypic variability have been identified, they are all classified as a single species (WSSV) within the genus *Whispovirus* (Lo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Viable WSSV was found in frozen commodity shrimp imported to Australia from Southeast Asia (McColl *et al.*, 2004). The virulence of WSSV was retained for 14 months at –80°C in a filtered tissue homogenate prepared from moribund shrimp with hepatopancreas and abdomen removed (Momoyama *et al.*, 1998). The virus originally collected from the haemolymph of moribund shrimp could maintain its virulence for at least 16 months at –80°C (Wu *et al.*, 2002). However, WSSV might be inactivated by multiple freeze-thaw cycles due to damage the viral envelopes or nucleocapsids (Durand *et al.*, 2000; Hasson *et al.*, 2006).

2.1.3. Survival and stability outside the host

The agent is viable for at least 30 days at 30°C in seawater under laboratory conditions (Momoyama *et al.*, 1998); and is viable in ponds for at least 3–4 days (Nakano *et al.*, 1998). Laboratory emulations of drainable and non-drainable ponds suggest that the virus is no longer infective after 21 days of sun-drying or after 40 days in waterlogged pond sediment (Satheesh Kumar *et al.*, 2013).

WSSV with an initial viral load of 1000 virions ml⁻¹ was found to be viable for a period of 12 days in seawater of 27 ppt salinity, pH of 7.5 at 29–33°C. In shrimp pond sediment (with initial viral load of 211,500 copies g⁻¹), the virus was viable and infective up to 19 days despite sun-drying. In the case of non-drainable conditions, WSSV (753,600 copies g⁻¹) remained infective for a period of 35 days (Satheesh Kumar *et al.*, 2013).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Of all the species that have been tested to date, no decapod (order Decapoda) crustacean from marine, brackish or freshwater sources has been reported to be refractory to infection with WSSV (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2009).

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with WSSV in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

All life stages are potentially susceptible, from eggs to broodstock (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999). WSSV genetic material has been detected in reproductive organs (Lo *et al.*, 1997), but susceptibility of the gametes to WSSV infection has not been determined definitively.

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

The best life stages of crustaceans for detection of WSSV are late postlarvae (PL) stages, juveniles and adults. Probability of detection can be increased by exposure to stressful conditions (e.g. eye-stalk ablation, spawning, moulting, changes in salinity, temperature or pH, and during plankton blooms).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The major target tissues of WSSV are of ectodermal and mesodermal embryonic origin, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Although WSSV infects the underlying connective tissue in the crustacean hepatopancreas and midgut, the tubular epithelial cells of these two organs are of endodermal origin, and they do not become infected.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Wild decapods known to be reservoirs of infection with WSSV include *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995), *Acetes* sp., *Alpheus* sp., *Callinassa* sp., *Exopalaemon* sp., *Helice* sp., *Hemigrapsus* sp., *Macrophthalmus* sp., *Macrophthel* sp., *Metaplex* sp., *Orithyia* sp., *Palaemonoidea* sp., *Scylla* sp., *Sesarma* sp., and *Stomatopoda* sp. (Desrina *et al.*, 2022; He & Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002). These species can express the disease under suitable environmental conditions. However, non-decapodal crustaceans, such as copepods (Huang *et al.*, 1995), rotifers (Yan *et al.*, 2004), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), *Artemia* (Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010) and *Tachypleidue* sp. (He & Zhou, 1996) may be apparently healthy carrier animals. Other marine molluscs, polychaete worms (Vijayan *et al.*, 2005), as well as non-crustacean aquatic arthropods such as sea slaters (*Isopoda*), and Euphydradae insect larvae can mechanically carry the virus without evidence of infection (Lo & Kou, 1998).

2.2.6. Vectors

The harpacticoid copepod *Nitocra* sp. (Zhang *et al.*, 2008), microalgae (Liu *et al.*, 2007), and the polychaete, *Dendronereis* spp. (Peters) (Desrina *et al.*, 2013; Haryadi *et al.*, 2015) are vectors for WSSV.

2.3. Disease pattern

Infection with WSSV sometimes causes clinical disease (Tsai *et al.*, 1999), depending on factors that are poorly understood but related to species tolerance and environmental triggers. With an appropriate infection dose to allow sufficient time before mortality, animals susceptible to disease show large numbers of virions circulating in the haemolymph (Lo *et al.*, 1997), but this may also occur for tolerant species that show no mortality. Thus, high viral loads *per se* do not cause disease or mortality for all susceptible species.

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

All penaeid shrimp species are highly susceptible to infection with WSSV, often resulting in high mortality. Crabs, crayfish, freshwater prawns, spiny lobsters and clawed lobsters are susceptible to infection with WSSV, but morbidity and mortality as a consequence of infection are highly variable (Lo & Kou, 1998). High level infections with WSSV are known in some decapods in the absence of clinical disease.

Prevalence of infection with WSSV is highly variable, from <1% in infected wild populations to up to 100% in captive populations (Lo & Kou, 1998).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

White spots embedded within the exoskeleton are the most commonly observed clinical sign. In most shrimp, these spots range from barely visible to 3 mm in diameter, and they sometimes coalesce into larger plates. However, it should be noted that environmental stress factors, such as high alkalinity, or bacterial disease can also cause white spots on the carapace of shrimp, and that moribund shrimp with infection with WSSV may have few, if any, white spots. Therefore, the appearance of white spots is not a reliable diagnostic sign of infection with WSSV infection. High degrees of colour variation with a predominance of reddish or pinkish discoloured shrimp are seen in diseased populations.

WSSV infections can be subclinical or manifest as clinical disease. The penaeid shrimp in aquaculture will generally show clinical signs associated with high morbidity and mortality. Some animals may die without showing any clinical signs. Non-penaeid species (e.g. crab, lobster) generally have subclinical infections under natural conditions.

The affected animals can show lethargy, decreased or absent feed consumption and abnormal swimming behaviour – slow swimming, swimming on side, swimming near water surface and gathering around edges of rearing units (Corbel *et al.*, 2001; Sahul Hameed *et al.*, 1998; 2001). A very high mortality rate in the shrimp population can be expected within a few days of the onset of behavioural signs.

2.3.3 Gross pathology

In addition to the clinical and behavioural signs in Section 2.3.2. above, the following gross pathology has been reported in clinically affected penaeid shrimp: loosened attachment of the carapace with underlying cuticular epithelium (Sanchez-Paz, 2010), so that the carapace can be easily removed (Zhan *et al.*, 1998); empty gastro-intestinal tract due to anorexia (Escobedo-Bonilla, 2008); delayed clotting of haemolymph (Heidarieh *et al.*, 2013); excessive fouling of gills (Wu *et al.*, 2013) and exoskeleton.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Infection with WSSV can be transmitted horizontally by consumption of infected tissue (e.g. cannibalism, predation, fomites, etc.), by water-borne routes, and by other routes of transmission (e.g. via sea birds, anthropogenic movements, feeding, rotifer, copepods, etc) (Haryadi *et al.*, 2015; Vanpatten *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; 2008). Transmission of WSSV can occur from apparently healthy animals in the absence of disease. Dead and moribund animals can be a source of disease transmission (Lo & Kou, 1998). Microalgae could serve as a potential horizontal transmission pathway for WSSV (Liu *et al.*, 2007).

True vertical transmission (intra-ovum) of WSSV to the progeny has not been demonstrated.

In-vitro studies with primary cell cultures and *in-vivo* studies with postlarvae show that the replication cycle is approximately 20 hours at 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

2.3.5. Environmental factors

Disease outbreaks may be induced by stressors, such as rapid changes in salinity. Water temperature has a profound effect on disease expression, with average water temperatures of between 18 and 30°C being conducive to WSSV outbreaks (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001). Under experimental challenge condition, WSSV-induced mortality in shrimp is reduced when the temperature increases above 32°C (Vidal *et al.*, 2001).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with WSSV has been identified from crustaceans in Asia, the Mediterranean (Stentiford & Lightner, 2011), the Middle East, Oceania (Moody *et al.*, 2022) and the Americas. Zones and compartments free from infection with WSSV are known within these regions (Lo *et al.*, 2012).

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

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No consistently effective vaccination methods have been developed for infection with WSSV.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No published or validated methods.

2.4.3. Immunostimulation

Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (fucoidan) and other immunostimulants may improve resistance to infection with WSSV (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

2.4.4. Breeding resistant strains

Progress in breeding *P. vannamei* for resistance to infections with WSSV has been reported (Cuellar-Anjel *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

2.4.5. Inactivation methods

Method	Treatment	Reference
Heat	55°C/90 min 70°C/5 min	Chang <i>et al.</i> , 1998
	50°C/60 min 60°C/1 min 70°C/0.2 min	Nakano <i>et al.</i> , 1998
pH	pH 3/60 min pH 12/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
UV	$9.30 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Ozone	$0.5 \mu\text{g ml}^{-1}/10 \text{ min}$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Chlorine	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
Iodophore	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

For transovum transmission, disinfection of egg is likely to be effective (Lo & Kou, 1998), but this has not yet been confirmed in formal scientific trials.

2.4.7. General husbandry

Management practices in endemic areas principally involve the exclusion of WSSV from production populations or avoiding risk factors for development of clinical disease. Examples include avoiding stocking in the cold season, use of specific pathogen-free (SPF) or polymerase chain reaction (PCR)-negative seed stocks, use of biosecure water and culture systems (Withyachumnarnkul, 1999). Polyculture of shrimp and fish has been proposed to reduce WSSV transmission in infected populations (Wang *et al.*, 2021).

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 or exhibit behavioural changes (Sections 2.3) should be selected for detection of WSSV.

3.2. Selection of organs or tissues

Tissue tropism analysis from both experimentally infected shrimp and wild-captured brooders shows that tissues originating from the ectoderm and mesoderm, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues, as well as other target tissues (e.g. antennal gland, haematopoietic organ, etc.), are the main target tissues for infection with WSSV. Samples from the pleopods, gills, haemolymph, stomach or abdominal muscle are recommended for submission (Lo *et al.*, 1997).

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the columnar epithelial cells of these two organs are of endodermal embryonic origin (Lo *et al.*, 1997) and are not appropriate tissues for detection. The compound eye may contain a PCR inhibitor (Lo *et al.*, 1997) and is therefore not suitable for PCR-based diagnosis.

3.4. Non-lethal sampling

Gill, haemolymph or pleopod are suitable tissues for non-lethal sampling and screening by PCR.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 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 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 histological techniques can be found in Section B.5.5. 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 Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

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 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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				
Cell culture												
Real-time PCR	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	2
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1	+	+	+	1
Ab-ELISA					+	+	+	1				
Ag-ELISA					+	+	+	1				
Other antigen detection methods					+	+	+	1				
Other methods												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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.

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

4.1. Wet mounts

Demonstration of hypertrophied nuclei in squash preparations of the gills and/or cuticular epithelium, which may be stained or unstained.

T-E staining

A T-E staining solution may be prepared from Trypan blue 0.6%, Eosin Y 0.2%, NaCl 0.5%, phenol 0.5%, and glycerol 20% (Huang & Yu, 1995) and used as follows:

- i) Place a piece of diseased tissue (e.g. a piece of gill or stomach epithelium without the cuticle) on a slide and mince with a scalpel.
- ii) Add 1–2 drops of the T-E staining solution to the minced tissue, mix and allow to stain for 3–5 minutes.
- iii) Lay a cover glass over the stained tissue and cover with several pieces of absorbent paper. Use a thumb to squash the mince into a single layer of cells.

If the sample was taken from a heavily infected shrimp, hypertrophied nuclei and intranuclear eosinophilic or vacuolation-like inclusion bodies can be observed using light microscopy (400–1000× magnification).

4.2. Histopathology and cytopathology

Smears

Demonstration of aggregates of WSSV virions in unstained smear preparations of haemolymph by dark-field microscopy.

NOTE: This is the simplest of the microscopic techniques and is recommended for people with limited expertise in diagnosing infection with WSSV. The aggregates appear as small reflective spots of 0.5 µm in diameter (Momoyama *et al.*, 1995).

Fixed sections

Histological changes commonly reported in susceptible species include: Hypertrophied nuclei with marginated chromatin material in virus-infected cells; eosinophilic to pale basophilic (with haematoxylin & eosin stain) stained intranuclear viral inclusions within hypertrophied nuclei and multifocal necrosis associated with pyknotic and karyorrhectic nuclei in affected tissues of ectodermal and mesodermal origin. The infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, another DNA virus, produces similar inclusions that need to be differentiated from those of WSSV.

4.3. Cell culture for isolation

WSSV can be isolated from primary cultures of lymphoid or ovary cells. However, it is NOT recommended to use cell culture as a routine isolation method because of: 1) the high risk of contamination, and, 2) the composition of the medium varies depending on the tissue type, host species and experimental purpose; that is, to date there is no standard or recognised medium that can be recommended. As primary cell culture is so difficult to initiate and maintain for virus isolation purposes, bioassay should be the primary means for virus propagation.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

~~Numerous~~ Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and ~~should~~ can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

4.4.1. Real-time PCR

The real-time PCR methods described by Durand & Lightner (2002) and Sritunyalucksana *et al.* (2006) are described here as modified and validated by Moody *et al.*, (2022).

Pathogen/Target	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Durand & Lightner, 2002 ¹ ; GenBank Accession No.: NC_003225			
WSSV/ ORF-X Capsid protein	Fwd WSS1011F: TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG Rev WSS1079R: GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A Probe: <u>6FAM-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-TAMRA</u>	900 nM 900 nM 250 nM	45 cycles of: <u>95°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u> <u>50°C/2 min.</u> <u>95°C/10 min.</u> <u>then 45 cycles of:</u> <u>94°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u>
Method 2: Sritunyalucksana, 2006 ¹ ; GenBank Accession No.: AF440570			
WSSV/ ORF-X Capsid protein	Fwd CSIRO WSSV-F: CCG ₂ ACG ₂ CCA ₂ AGG ₂ GAA ₂ CT Rev CSIRO WSSV-R: TTC ₂ AGA ₂ TTC ₂ GTT ₂ ACC ₂ GTT ₂ TCC ₂ A Probe: 6FAM-CGC ₂ TTC ₂ AGC ₂ CAT ₂ GCC ₂ AGC ₂ CG-TAMRA	900 nM 900 nM 250 nM	45 cycles of: <u>95°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u> <u>50°C/2 min.</u> <u>95°C/10 min.</u> <u>then 45 cycles of:</u> <u>94°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u>

¹Method described here as modified and validated by Moody *et al.*, 2022

4.4.2. Conventional PCR

Pathogen/Target	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Lo <i>et al.</i> , 1996a; GenBank Accession No.: AF440570 ; amplicon size: 1447/941 bp			
WSSV (nested PCR)	<u>Outer-Primary</u> Fwd <u>146F1</u> : ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG Rev 146R1: TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A <u>Inner-Nested</u> Fwd 146F2: GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A Rev 146R2: TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG	100 pmol 100 pmol 100 pmol 100 pmol	39 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min 39 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min

Commercial PCR kits are available. Please consult the WOAHP Register for kits that have been certified by WOAHP (<https://www.woah.org/en/what-we-offer/veterinary-products/#ui-id-5>).

4.4.3. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

The protocol described here is from Kono *et al.* (2004). The LAMP method is sensitive and rapid, and it amplifies the target nucleic acids under isothermal conditions, therefore needing no sophisticated machine for thermal cycling.

DNA extraction

DNA extraction could be performed according to the protocol described in Section 4.4.2 *Conventional PCR* or by other suitable methods or by commercial kits.

LAMP reaction

-
- i) Add DNA to a tube to set up a 25 µl reaction mixture (20 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8M Betaine, 1.4 mM of each dNTP, 40 pmol of WSSV-FIP and -BIP primers, 5 pmol of WSSV-F3 and -B3 primers).
 - ii) The primer sequences are WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
 - iii) Heat the mixture at 50°C for 5 minutes and at 95°C for 5 minutes, then chill on ice, and add 1 µl (8 U) of *Bst* DNA polymerase.
 - iv) Incubate the mixture at 65°C for 60 minutes, and then terminate the reaction at 80°C for 10 minutes.
 - v) To visualise, electrophorese 2 µl LAMP reaction products on 2% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 µg ml⁻¹. This reaction produces WSSV-specific LAMP products with multiple bands of various sizes from approximately 200 bp to the loading well.

Reliable LAMP commercial kits may be an alternative for WSSV diagnosis.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

Use of WSSV-specific DNA probes with histological sections is useful to demonstrate the presence of WSSV nucleic acid in infected cells (Nunan & Lightner, 1997). See Chapter 2.2.0 Section 5.5.4 for general comments on *in-situ* hybridisation.

4.7. Immunohistochemistry

See Section 4.9.

4.8. Bioassay

If SPF shrimp are available, the bioassay method based on Nunan *et al.* (1998) and Durand *et al.* (2000), is suitable for WSSV diagnosis.

4.9. Antigen detection methods

Both polyclonal and monoclonal antibodies raised against either the virus or a recombinant viral structural protein have been used in various immunological assays including western blot analysis, immunodot assay, indirect fluorescent antibody test (IFAT), immunohistochemistry (IHC) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect WSSV (Huang *et al.*, 1995; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004).

4.10. Other methods

Lateral flow tests are commercially available but their performance needs to be evaluated before they can be recommended.

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

Real-time PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with WSSV in apparently healthy populations as described in Section 4.4.1.

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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case.~~ If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status ¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 WSSV 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
- iii) Positive result by LAMP method

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

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

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR method followed by amplicon sequencing
- ~~iii) Positive results by *in situ* hybridisation and detection of WSSV by real time PCR~~
- ~~iv) Positive results by *in situ* hybridisation and detection of WSSV by conventional PCR followed by amplicon sequencing~~

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 WSSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

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

¹ For example transboundary commodities.

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR method followed by amplicon sequencing
- iii) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by real-time PCR
- iv) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by conventional PCR followed by amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with WSSV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with WSSV, 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 (Durand & Lightner, 2002)	Diagnosis	Clinically diseased shrimp from farms	Gill, pleopod	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	Real-time PCR	Moody <i>et al.</i> , 2022
Real-time PCR (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006)	Diagnosis	Clinically diseased shrimp from farms	Gill, pleopod	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	Real-time PCR	Moody <i>et al.</i> , 2022

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

*The nested PCR (Lo *et al.*, 1996a) is linked to false positives for WSSV when they are used to test species of *Cherax quadricarinatus* (Claydon *et al.*, 2004).

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
Real-time PCR (Durand & Lightner, 2002)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	76.8% (n=1591)	99.7% (n=1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022
Real-time PCR (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	82.9% (n=1591)	99.7% (n=1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022

Two real-time PCR methods in parallel (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006 and Durand & Lightner, 2002)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	98.3% (<i>n</i> =1591)	99.4% (<i>n</i> =1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022
---	--	---------------------------------	---------------	--	----------------------------	----------------------------	--------------------------------	----------------------------

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

7. References

- BALASUBRAMANIAN G., SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *J. Fish Dis.*, **29**, 569–572.
- CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.
- CHANG P.S., CHEN H.C. & WANG Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233–242.
- CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.
- CHANG Y., CHEN T., LIU W., HWANG J. & LO C. (2011). Assessment of the roles of copepod *Apocyclops royi* and bivalve mollusk *Meretrix lusoria* in white spot syndrome virus transmission. *Mar. Biotechnol.*, **13**, 909–917.
- CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F., WANG H.C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.
- CHEN W.Y., ZHANG H., GU L., LI F. & YANG F. (2012). Effects of high salinity, high temperature and pH on capsid structure of white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.*, **101**, 167–171.
- CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.
- CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.
- CORBEL V., ZUPRIZAL Z., SHI C., HUANG, SUMARTONO, ARCIER J.-M. & BONAMI J.-R. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377–382.
- CUELLAR-ANJEL J., WHITE-NOBLE B., SCHOFIELD P., CHAMORRO R. & LIGHTNER D.V. (2012). Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, **368–369**, 36–39.
- DESRINA, PRAYITNO S.B, VERDEGEM M.C.J, VERRETH J.A.J. & VLAK J.M. (2022). White spot syndrome virus host range and impact on transmission. *Rev. Aquacult.*, 1–18.
- DESRINA, VERRETH J.A.J., PRAYITNO S.B., ROMBOUT J.H.W.M., VLAK J.M. & VERDEGEM M.C.J. (2013). Replication of white spot syndrome virus (WSSV) in the polychaete *Dendronereis* spp. *J. Invertebr. Pathol.*, **114**, 7–10.
- DURAND S.V. & LIGHTNER D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.

-
- DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.
- EAST I.J. (2008). Addressing the problems of using the polymerase chain reaction technique as a stand-alone test for detecting pathogens in aquatic animals. *Sci. Tech. Rev.*, **27**, 829–837.
- ESCOBEDO-BONILLA C. M., ALDAY-SANZ V., WILLE M., SORGELOOS P., PENZAERT M.B. & NAUWYNCK H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.*, **31**, 1–18.
- FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.
- HASSON K.W., FAN Y., REISINGER T., VENUTI J. & VARNER P.W. (2006). White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas fresh water systems through imported, frozen bait-shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 91–100.
- HARYADI D., VERRETH J.A.J., VERDEGEM M.C.J. & VLAK J.M. (2015). Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from *Dendronereis* spp. (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. *J. Fish Dis.*, **38**, 419–428.
- HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.
- HEIDARIEH M., SOLTANI M., MOTAMEDI SEDEH F. & SHEIKHZADEH N. (2013). Low water temperature retards white spot syndrome virus replication in *Astacus leptodactylus* Crayfish. *Acta Sci. Vet.*, **41**, 1–6.
- HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 31–39.
- HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 40–50.
- HUANG Y., YIN Z., WENG S., HE J. & LI S. (2012). Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, **364–365**, 111–117.
- KONO T., SAVAN R., SAKAI M., & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.
- LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.
- LI Q., ZHANG J.H., CHEN Y.J. & YANG F. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 261–264.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- LIU B., YU Z.M., SONG X.X. & GUAN Y.Q. (2007). Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebr. Pathol.*, **95**, 87–92.
- LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W. WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. USA, pp 229–234.
- LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.
-

-
- LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.
- LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.
- LO C.F., LEU J.H., HO C.H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. & KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of White Spot Syndrome virus and Yellow head virus in prawns imported into Australia. *Australian Vet. J.*, **82**, 69–74.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.
- MOODY N.J.G., MOHR P.G., WILLIAMS L.M., CUMMINS D.M., HOAD J., SLATER J., VALDETER S.T., COLLING A., SINGANALLUR N.B., GARDNER I.A., GUDKOV N. & CRANE M.St.J. (2022). Performance characteristics of two real-time, TaqMan polymerase chain reaction assays for the detection of WSSV in clinically diseased and apparently health prawns. *Dis. Aquat. Org.*, <https://www.int-res.com/prepress/d03687.html>.
- NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.
- SAHUL HAMEED A.S., ANILKUMAR M., STEPHEN RAJ M.L. & JAYARAMAN K. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, **160**, 31–45.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SATHISH S., RASHEED M., MURUGAN V. & JAYARAMAN K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, **201**, 179–186.
- SANCHEZ-PAZ A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, **41**, 43.
- SATHEESH KUMAR S., ANANDA BHARATHI R., RAJAN J.J.S., ALAVANDI S.V., POORNIMA M., BALASUBRAMANIAN C.P. & PONNIAH A.G. (2013). Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture*, **402–403**, 119–126.
- SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA P. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.
-

-
- SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.
- SRITUNYALUCKSANA K., SRISALA J., MCCOLL K., NIELSEN L. & FLEGEL T.W. (2006). Comparison of PCR methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **255**, 95–104.
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellowhead disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.
- STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, **319**, 302–306.
- TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999). Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 107–114.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Sea birds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.
- VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 364–372.
- VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEK HAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.
- WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.
- WANG H.C., HIRONO I, MANINGAS M.B.B., SOMBOONWIWA K., STENTIFORD G. & ICTV REPORT CONSORTIUM. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: The ICTV 10th Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature*. The ICTV website (www.ictv.global/report/nimaviridae).
- WANG M., CHEN Y., ZHAO Z., WENG S., YANG J., LIU S., LIU C., YUAN F., AI B., ZHANG H., ZHANG M., LU L., YUAN K., YU Z., MO B., LIU X., GAI C., LI Y., LU R., ZHONG Z., ZHENG L., FENG G., LI S.C. & HE J. (2021). A convenient polyculture system that controls a shrimp viral disease with a high transmission rate. *Commun Biol.*, **4**, 1276.
- WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.
- WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRATANA S., NASH G.L., AKARAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69–77.
- WU J.L., SUZUKI K., ARIMOTO M., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (2002). Preparation of an Inoculum of White Spot Syndrome Virus for Challenge Tests in *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **37**, 65–69.
- WU W., WU B., YE T., HUANG H., DAI C., YUAN J. & WANG W. (2013). TCTP is a critical factor in shrimp immune response to virus infection. *PLoS One*, **8**, e74460.
- YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.
- YAN D.C., DONG S.L., HUANG J. & ZHANG J.S. (2007). White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J. Invertebr. Pathol.*, **94**, 144–148.
- YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.
-

ZENG Y. (2021). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus in the world. *Aquaculture*, **537**, 736509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736509>.

ZHAN W.B., WANG Y.H., FRYER J.L., YU K.K., FUKUDA H. & MENG Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 405–410.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L., CAO Y.C. & LI Z.J., YAN D.C. (2010). Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Vet. Res. Commun.*, **34**, 25–32.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L. & HOU C.Q. (2008). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *J. Invertebrate Pathol.*, **97**, 33–39.

ZHANG J.S., DONG S.L., TIAN X.L., DONG Y.W., LIU X.Y. & YAN D.C. (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, **261**, 1181–1185.

*
* *

NB: There are WOA Reference Laboratories for infection with white spot syndrome virus
(please consult the WOA web site:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with white spot syndrome virus

NB: FIRST ADOPTED IN 1997 AS WHITE SPOT DISEASE. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

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 *A. 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

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with *A. invadans* in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

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
Belontiidae	<i>Strongylura krefftii</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 machrochir</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 poechii</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

Family	Scientific name	Common name
	<i>Puntius sophore</i>	pool barb
	<i>Rohtee sp.</i>	keti-Bangladeshi
Eleotridae	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	sleepy cod
	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	marble goby
Gobiidae	<i>Glossogobius giuris</i>	bar-eyed goby
	<i>Glossogobius sp.</i>	goby
	<i>Tridentiger obscures obscures</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>	mullet
	<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
Sillaginae	<i>Sillago ciliata</i>	sand whiting
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	wels 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

Family	Scientific name	Common name
	<i>Leiopotherapon unicolor</i>	spangled perch
	<i>Scortum barcoo</i>	Barcoo Grunter
	<i>Therapon sp.</i>	therapon
Toxotidae	<i>Toxotes chatareus</i>	common archerfish
	<i>Toxotes lorentzi</i>	primitive acherfish

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 (*Catla catla*), rohu (*Labeo rohita*) and mrigal (*Cirrhinus mrigala*), revealed resistance to *A. invadans* (Pradhan et al., 2007), even though they are naturally susceptible species. Experimental infections demonstrated that goldfish (*Carassius auratus*) are susceptible (Hatai et al., 1977; 1994), but common carp (*Cyprinus carpio*) (Wada et al., 1996), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Khan et al., 1998) and European eel (*Anguilla anguilla*), (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 ~~*A. phanomyces*~~ *A. 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; Ibrahimi *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; Ibrahimi *et al.*, 2018). In advanced stages of the disease, the severity of the disease results in death of the fish (Hawke *et al.*, 2003; Ibrahimi *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 polyplanetism) (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; Ibrahimi *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.

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

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 (Iberahim *et al.*, 2018).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

~~Routine~~ There are no published protocols for *A. invadans* 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 (Iberahim *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.

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).

3.3. 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~~ *A. invadans* 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 have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger animals should be processed and tested individually 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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 <u>Clinical signs</u>	±	±	±	<u>NA</u>	+	+	+	<u>NA</u>				
<u>Squash mounts</u>					±	±	±	<u>1</u>	±	±	±	<u>1</u>
Histopathology					++	++	++	1	++	++	++	1
Cytopathology												
Cell or artificial media culture					++	++	++	1	+	+	+	1
Real-time PCR												
Conventional PCR					++	++	++	1				
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation									++	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Other antigen detection methods												
Other method												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH 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. 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 Observation for clinical signs

Using observational data of clinical signs (see Section 2.3.2 *Clinical signs, including behavioural changes*) for targeted surveillance, a 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*. 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.

4.2. 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).

4.23. 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.

4.23.1. 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.

4.23.2 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.

4.34. Cell culture for isolation

4.34.1. 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 glucose/yeast extract (GY) agar (see Table 4.1) and transferred to a fresh GY agar tube once every 1–2 weeks (Hatai & Egusa, 1979).

4.34.2. 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*.

4.34.3. 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 glucose/peptone/yeast (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 4.4.3.1), 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 4.4.3.1. Media for isolation, growth and sporulation of *Aphanomyces invadans* cultures

GP (glucose/peptone) medium	GPY (glucose/peptone/yeast) broth	GPY agar	GY agar (<u>glucose/ yeast</u>)	Autoclaved pond water
3 g litre ⁻¹ glucose 1 g litre ⁻¹ peptone 0.128 g litre ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O 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	GP broth + 0.5 g litre ⁻¹ yeast extract	GPY broth + 12 g litre ⁻¹ technical agar	1% glucose, 0.25% yeast extract, 1.5% agar	Sample pond/lake water known to support oomycete growth. Filter through Whatman 541 filter paper. Combine one part pond water with two parts distilled water and autoclave. pH to 6–7.

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

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 2.5 *Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*. Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

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*. Oidtmann *et al.* (2008) demonstrated cross reactivity of the Phadee *et al.* (2004b) assay with *A. frigidophilus* when more than 10 ng of template DNA of *A. frigidophilus* was used in the PCR.

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Vandersea <i>et al.</i>, 2006; GenBank Accession No.: AF396684; Product amplicon size: 234bp</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1)</u>	<u>Fwd Ainvad-2F: TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG</u> <u>Rev Ainvad-ITSR1: GCT-AAG-GTT-TCA-GTA-TGT-AG</u>	<u>0.025 nM</u> <u>0.025 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>95°C/30 sec, 56°C/45 sec, 95°C/30 sec,</u> <u>72°C/2.5 min, 95°C/30 sec</u>
<u>Method 2: Phadee <i>et al.</i>, 2004b; GenBank Accession No.: AF396683-AF396684; Product amplicon size: 550bp</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1- ITS2)</u>	<u>Fwd ITS11: GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC</u> <u>Rev ITS23: CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA</u>	<u>500 nM</u> <u>500 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>94°C/30 sec, 65°C/45 sec, 72°C/1 min</u>
<u>Method 3: Oidtmann <i>et al.</i>, 2008; GenBank Accession No.: EU422990; Product amplicon size: 564</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1- ITS2)</u>	<u>Fwd BO73: CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC</u> <u>Rev BO639: ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC</u>	<u>600 nM</u> <u>600 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>96°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min</u>

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 µM 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 µl. 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 µM 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 µl. 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'-AGA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). The PCR mixture contains 0.6 µM 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 µl of DNA template extracted from 25 mg of infected tissue and suspended in 100 µl buffer) in a 50 µl 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).

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

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] Igepal-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/were 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 (0.007mg 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* (as described in Section 4.1 Observation for clinical signs). 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/compartments/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. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free. There are currently no WOA Reference Laboratories designated for EUS.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status...¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. ~~Geographical~~Hydrographical 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*.²
- 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 of hyphae characteristic (direct or by microscopy) of *A. invadans*
- v) Culture and isolation of *A. invadans*-type colonies

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

¹ For example transboundary commodities.

² Note that surveillance of apparently healthy populations for EUS is based on examination of target populations for clinical signs of infection with *A. invadans* (see Section 5 Test[s] recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations).

- 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. and 6.3.2. (no data are currently available for either). 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 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, DSp = 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, DSp = diagnostic specificity.

7. References

- ADIL B., SHANKAR K.M., NAVEEN KUMAR B.T., PATIL R., BALLYAYA A., RAMESH K.S., POOJARY S.R., BYADGI O.V. & SIRIYAPPAGOUDER 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., SHARIFPOUR 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 Megasytematics 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.*, **11**, 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 species 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., PACLIBARE 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. Phylogenet. 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., KONDOH 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 WOA Reference Laboratories for infection with *Aphanomyces invadans*
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/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.

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 tandanus*), 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

None known

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

~~None demonstrated. 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). European perch from distinct geographical areas with and without a history of EHNV have been tested under experimental conditions and have demonstrated susceptibility to EHN (Becker *et al.*, 2016). 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 (Becker *et al.*, 2019; 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 and sporadic outbreaks involving small numbers of European perch (Becker *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2010).

See WOAHS WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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 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 peroxydisulphate 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 i.e. European perch where these are available, otherwise rainbow trout or the other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample epidemiological units 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 apparently healthy fish collected in such a way that all parts of the farm or affected waterbody 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

Non-lethal samples (blood, fin, gill, integument or mucous) are unsuitable for testing EHNV. Not applicable.

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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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	+ ⁺⁺⁺	+ ⁺⁺⁺	++ ⁺⁺	<u>2-1</u>	++ ⁺⁺	++ ⁺⁺	+++	<u>2-1</u>	<u>±</u> ⁺⁺	<u>±</u> ⁺⁺	<u>±±</u>	<u>2-1</u>
Immunohistochemistry					+	+	+	1				
Real-time PCR	+++	+++	+++	<u>2-1</u>	+++	+++	+++	2	<u>±±</u>	<u>±±</u>	<u>±±</u>	<u>2-1</u>
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	<u>3-1</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassy												
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 WOAHP 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.

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 EHN. Formalin-fixed paraffin-embedded sections can also be stained using an immunoperoxidase method (see below) to identify EHN 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 lines for virus isolation~~/artificial media

EHN ~~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; ~~and BF-2, EPC, or CHSE 214 incubated at 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 WOA 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 and amplicon sequencing.~~

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 day 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 EHN. 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 EHN 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.

The identity of viruses in cell culture is determined by PCR and amplicon sequencing.

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 for the detection of ranaviruses (Jaramillo *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2007; Stilwell *et al.*, 2018), EHN can only be detected when these methods are combined with methods that specifically detect EHN, none has been adequately validated according to OIE guidelines for primary detection of EHN. 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 EHN, identification of EHN 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 EHN 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.

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 2.5 Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish). Each diagnostic sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

4.4.1. Real-time PCR

The ranavirus real-time screening protocol in use at the WOA Reference Laboratory is based on Pallister *et al.*, 2007. Alternative real-time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV 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) detects multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

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 EHNV 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 RANA CON R Probe RANA CON Pr Primer	5' CTC ATC GTT CTG GCC ATC A 3' 5' TCC CAT CGA GCC GTT CA 3' 5' 6FAM CAC AAC ATT ATC CGC ATC MGB 3'	Pallister <i>et al.</i> , 2007
C1096 C1097 Primer	GAC TGA CCA ACG CCA GCC TTA ACG GCG GTG GTG TAC CCA GAG TTG TCG	Jaramillo <i>et al.</i> , 2012
RanaF1 RanaR1 Probe RanaP1	CCA GCC TGG TGT ACG AAA ACA ACT GGG ATG GAG GTG GCA TA 6FAM TGG GAG TCG AGT ACT AC MGB	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

Primer and probe sequences

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Pallister <i>et al.</i> , 2007); GenBank Accession No.: DQ457105			
Ranavirus/MCP	Fwd: RANA CON: CTC-ATC-GTT-CTG-GCC-ATC-A Rev: RANA CON: TCC-CAT-CGA-GCC-GTT-CA Probe: RANA CON Pr FAM-CAC-AAC-ATT-ATC-CGC-ATC-MGB	900 nM for each primer, 250 nM for probe	45 cycles of 95°C/15 sec; 60°C/60 sec

Method 2 (Jaramillo <i>et al.</i>, 2012); GenBank Accession No.:			
Ranavirus/MCP	C1096 GAC-TGA-CCA-ACG-CCA-GCC-TTA-ACG C1097 GCG-GTG-GTG-TAC-CCA-GAG-TTG-TCG	12.5 pM for each primer	40 cycles of 95°C/30 sec; 58°C/30 sec
Method 3 (Stilwell <i>et al.</i>, 2018); GenBank Accession No.:			
Ranavirus/MCP	Fwd: RanaF1: CCA-GCC-TGG-TGT-ACG-AAA-ACA Rev: RanaR1 ACT-GGG-ATG-GAG-GTG-GCA-TA Probe: RanaP1 FAM-TGG-GAG-TCG-AGT-ACT-AC-MGB	900 nM for each primer, 250 nM for probe	40 cycles of 95°C/30 sec; 60°C/45 sec

The ranavirus real time screening protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Pallister *et al.*, 2007. Alternative real time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV 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) detects multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

Details of the controls to be run with each assay are set out in Section 5.5. of Chapter 2.2.1. of Section 2.2.

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 EHNV 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 EHNV and BIV from each other and from FV3 and ECV. **Both MCP1 and MCP2 target a region within the capsid protein gene (Marsh *et al.*, 2002).**

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 25 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. 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.

Primer and probe sequences

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Marsh et al., 2002): Product amplicon size MCP-1 is 321 bp and product amplicon size MCP-2 is 625 bp			
MCP-1 Gene location: 266-586	M151: AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA M152: CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT	250 ng of each primer	35 cycles of 50°C for 30 sec NOTE: the annealing temperature may be increased to 60 or 62°C to reduce non-specific amplification when the assay is used to test fish tissues.
MCP-2 Gene location: 842-1466	M153: ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC M154: CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

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.

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

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 DAKO¹. The primary affinity purified rabbit-anti-EHNV antibody (Lot No. M708) is supplied freeze-dried by the WOA 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 antibody 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.

¹ 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 <http://www.dakosytomahon.com> for links to other countries.

-
- 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 WOA Reference Laboratory.

4.8. Bioassay

Not applicable.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

An antigen ELISA for detection of EHNV and an EHNV antibody detection ELISA have been described-reported (Whittington & Steiner, 1993). 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 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 EHNV from other 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 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status²

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link to an infected population. ~~Geographic-Hydrographical~~ 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) ~~EHNV-typical CPE in cell culture~~ ~~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 followed by 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.~~

6.2 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 followed by 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.~~

² For example transboundary commodities.

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. **(no data are currently available)**. 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 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>)	95%* (n = 106)	100% (n = 80)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = 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, DSp = 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 (*Gadua morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. *Archives of Virology* **155**, 1261-1271

ARIEL E., NICOLAISEN 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., GILLIGAN D., ASMUS M., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2019). Geographic distribution of Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in freshwater fish in south eastern Australia: lost opportunity for a notifiable pathogen to expand its geographic range. *Viruses*, **11, 315 doi:10.3390/v11040315**

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. Eight 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., TWEEDIE 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 haematopoeitic 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., TWEEDIE 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. & WALTZEK T.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 a WOA Reference Laboratory for infection with epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on infection with EHNV.

The WOA 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.

Annexe 30. Point 10.2.3. – Section 2.2.1. du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »

CHAPTER 2.3.9.

INFECTION WITH SPRING VIRAEMIA OF CARP VIRUS

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

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

Family	Scientific name	Common name
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Bream
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Bighead carp
	<i>Carassius auratus</i>	Goldfish
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Grass carp
	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp (all varieties and subspecies)
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Golden shiner
	<i>Pimephales promelas</i>	Flathead minnow
	<i>Percocypris pingi</i>	Jinsha bassbarbel carp
	<i>Rutilus kutum</i>	Caspian white fish
	<i>Rutilus rutilus</i>	Roach
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Wels catfish

[...]

CHAPTER 2.4.2.

INFECTION WITH *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Bonamia exitiosa* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: Argentinean flat oyster (*Ostrea puelchana*), Ariake cupped oyster (*Magallana (syn. Crassostrea) ariakensis*), Australian mud oyster (*Ostrea angasi*), Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), crested oyster (*Ostrea equestris*), eastern oyster (*Crassostrea virginica*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), and Olympia oyster (*Ostrea lurida*) and Suminoe oyster (*Magallana (syn. Crassostrea) ariakensis*).

2.2. 42. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *B. exitiosa* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: dwarf oyster (*Ostrea stentina*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Pacific cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] gigas*) and Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*).

[...]

CHAPTER 2.4.3.

INFECTION WITH *BONAMIA OSTREAE*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Bonamia ostreae* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: Ariake cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), and Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), and Suminoe oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*).

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 *B. ostreae* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: Argentinean flat oyster (*Ostrea puelchana*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: beadlet anemone (*Actina equina*), brittle star (*Ophiothrix fragilis*), European sea squirt (*Asciidiella aspersa*), grouped zooplankton and Pacific cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] gigas*).

[...]

CHAPTER 2.4.4.

INFECTION WITH *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Oyster species: *Ostrea edulis* (Grizel *et al.*, 1974); and mussel species: *Mytilus* species including *M. edulis* (Le Roux *et al.*, 2001) and *M. galloprovincialis* (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005; Robledo *et al.*, 1995a; Villalba *et al.*, 1993b).

Infection with *M. refringens* was demonstrated in the oyster *Ostrea stentina*, the clam species *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a) and *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b) and the mussel *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010).

Other *Ostrea* species including *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi*, and *O. denselamellosa* were found to be infected with *Marteilia* sp. when deployed in an infected area (Berthe *et al.*, 2004; Martin, 1993). However, in these cases, the parasite identification was not done at the molecular level.

In addition, different stages, including mature stages, of parasites looking like *M. refringens*, were observed by histology in cockles (*Cerastoderma edule*), clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*), and oysters (*Crassostrea virginica*) among other bivalve species (Berthe *et al.*, 2004; López-Flores *et al.*, 2008b). In all these cases, parasite identification is uncertain.

Lastly, the copepod *Paracartia grani* was shown to be susceptible to *M. refringens* and this species could participate in the transmission of the parasites between bivalves (see 2.3.1)

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Marteilia refringens* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) are: blue mussel (*Mytilus edulis*), dwarf oyster (*Ostrea stentina*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), European razor clam (*Solen marginatus*), golden mussel (*Xenostrobus securis*), Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and striped venus clam (*Chamelea gallina*).

Additionally, a copepod species (*Paracartia grani*) has been found to meet the criteria for listing as susceptible to infection with *Marteilia refringens* and is considered an intermediate host.

2.2.2. Susceptible stages of the host Species with incomplete evidence for susceptibility

Juveniles and older life stages are known to be susceptible (Grizel, 1985).

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *M. refringens* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), a copepod (*Paracartia latisetosa*) and Japanese flat oyster (*Ostrea denselamellosa*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*), grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*), Pacific cupped oyster (*Magallana* [syn. *Crassostrea*] *gigas*) and zooplankton (*Acartia discaudata*, *Centropages typicus*, *Euterpina acutifrons*, unidentified *Oithona* sp., *Penilia avirostris*).

[...]

SECTION 2.2.

DISEASES OF CRUSTACEANS

CHAPTER 2.2.0.

GENERAL INFORMATION

A. SAMPLING

1. Assessing the health status of the epidemiological unit

1.1. Sample material to be used for tests

Sample material and the number of samples to be collected depend on the specific disease or pathogen, the size of animals and the objective of testing (i.e. surveillance of apparently healthy animals, presumptive diagnosis of clinically affected animals or confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis of overt disease, detection of subclinical infection in apparently healthy animals or sampling for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection with a specified pathogen). See the individual disease chapters in this *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

1.2. Specifications according to crustacean populations

For details of animals to sample for a specific listed disease, see the relevant disease chapter in the *Aquatic Manual*. The design of a surveillance system for demonstrating disease-free status for a country, zone or compartment should be in accordance with the recommendations of the WOA *Aquatic Code* Chapter 1.4. *Aquatic animal disease surveillance*.

Animals to be sampled are selected as follows:

- i) Susceptible species should be sampled proportionately or following risk-based criteria for targeted selection of lots epidemiological units or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. replacement with stocks of unknown disease status).
- ii) If more than one water source is used for production, animals from all water sources should be included in the sample.
- iii) For the study of presumptively diseased crustaceans select those animals that are moribund, discoloured, displaying abnormal behaviour, or otherwise abnormal. If weak, abnormally behaving discoloured or freshly dead (not decomposed) animals are present, such animals should be selected. If such animals are not present, animals should be selected in such a way that all epidemiological units of the farm or waterbody are proportionately represented in the sample.
- iv) When sampling is aimed at assessing disease occurrence (e.g. estimation of disease prevalence), the preferred selection method is probability sampling.

1.3. Specifications according to clinical status

In clinical disease episodes, carefully selected quality specimens with representative lesions should be obtained from live or moribund crustaceans. Collection of dead specimens during disease outbreaks should be avoided when possible, but recently dead samples may be suitable for some diagnostic assays provided they are not decomposed. When cultured or wild

crustacean stocks are presenting clinical signs of an active disease that are consistent with, or suggestive of, any one of the WOA-listed crustacean diseases, care should be taken to ensure that the samples collected are preserved appropriately for the anticipated diagnostic tests (see sample preservation section for recommended methods). In situations other than when clinical disease episodes are investigated, for the WOA-listed diseases it is highly recommended that the scheduling of sampling be planned (i.e. by farm schedule, season, etc.) so that the particular life-stage(s) are sampled at a time when the pathogen of concern is most likely to be detected. Disease-specific recommendations are provided in Section 3 *Sample selection, sample collection, transportation and handling* of the individual chapters.

Recently dead crustaceans may be suitable (depending on their condition) for certain diagnostic assays such as nucleic acid detection techniques.

1.4. Specifications according to crustacean size

See the individual disease chapters in this *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

2. General processing of samples

2.1. Macroscopic examination

See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

2.2. Virological examination

Virological examination of crustaceans is not routinely used for listed diseases. *Macrobrachium rosenbergii* has been isolated in insect cell lines, but it is not a recommended method.

2.2.1. Transportation and antibiotic treatment of samples

Culture systems for crustacean viruses are not available; antibiotic treatment of samples is not required. For transportation of samples see Section 3 of disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. Not applicable.

2.2.2. Virus isolation

For processing of tissues see Section 3 of disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. Not applicable.

2.2.3. Treatment to neutralise enzootic viruses

Not applicable.

2.3. Bacteriological examination

Bacteriological examination of crustaceans is not routinely used for listed diseases, but it may be used for the strains of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and for *Hepatobacter penaei*, the causative agent of necrotising hepatopancreatitis (NHP) ~~and for can be isolated on standard bacteriological media. *Hepatobacter penaei*, the causative agent of necrotising hepatopancreatitis (NHP) has not been cultured and, because of its very small size, bacteriological examination may be limited to Gram staining.~~ See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual* for identification methods.

2.4. Parasitic examination

Not applicable for currently listed diseases.

2.5. Fungal and other protists examination

See Chapter 2.2.2 *Infection with *Aphanomyces astaci* (Crayfish plague)*.

B. MATERIALS AND BIOLOGICAL PRODUCTS REQUIRED FOR THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CRUSTACEAN PATHOGENS

1. Crustacean viruses

1.1. Crustacean cell lines

Not applicable. There are currently no confirmed or documented crustacean cell lines.

1.2. Culture media

Not applicable.

1.3. Virus positive controls and antigen preparation

1.3.1. Virus nomenclature

In general, the virus nomenclature used in the disease-specific chapters follows the most recent taxonomy for viruses as given in the Report of the Committee on Taxonomy of Viruses (see: [ICTV \[liftonline.org\]](http://ictv.liftonline.org) for latest information). Also provided in the disease-specific chapters are the disease and virus names that are in common use by the shrimp/prawn farming industries, as well as the more common synonyms that have been used or are in current use.

1.3.2. Virus production **for experimental purposes**

As no cell lines (crustacean, arthropod, or vertebrate) are known that can be used to produce crustacean viruses, infection of known susceptible host species (which are free of infection **by with** the **pathogenic** agent in question) is the preferred method for virus production for experimental purposes.

1.3.3. Virus preservation and storage

Infectivity of all of the WOAHL-listed crustacean viruses can be preserved by freezing infected whole crustaceans or infected target tissues at -20°C for short-term storage, or at -80°C or lower for long-term storage.

2. Crustacean bacteria

2.1. Culture media

See Chapter 2.2.1. *Acute hepatopancreatic necrosis disease* for details.

2.2. Storage of cultures

Lyophilisation or storage at -70°C is recommended for long-term storage of bacterial cultures.

3. Crustacean parasites

3.1. Culture media

Not applicable for currently listed diseases.

3.2. Storage of cultures

Not applicable for currently listed diseases.

4. Crustacean fungi and protists

4.1. Culture media

See chapter 2.2.2. [Infection with *Aphanomyces astaci* \(crayfish plague\)](#)

4.2. Storage of cultures

See Chapter 2.2.2.

5. Techniques

The available diagnostic methods that may be selected for diagnosis of the WOA-listed crustacean diseases or detection of their aetiological agents are based on:

- i) Gross and clinical signs.
- ii) Direct bright-field, phase-contrast or dark-field microscopy with whole stained or unstained tissue wet-mounts, tissue squashes, and impression smears; and wet-mounts of faecal strands.
- iii) Histology of fixed specimens.
- iv) Bioassays of suspect or subclinical carriers using a highly susceptible host (life stage or species) as the indicator for the presence of the pathogen.
- v) Antibody-based tests for pathogen detection using specific antisera, polyclonal antibodies (PABs) or monoclonal antibodies (MAbs).
- vi) Molecular methods (including sequencing):

DNA probes or RNA probes for *in-situ* hybridisation (ISH) assays with histological sections of fixed tissues;

Conventional and real-time PCR/RT-PCR and LAMP for direct assay with fresh tissue samples or with extracted DNA or RNA.

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 crustaceans should be processed and tested individually. However, for eggs, larvae and postlarvae pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50 to 150 postlarvae depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material to run a diagnostic assay.

5.1. Antibody-based tests

See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

5.2. Direct microscopy

Samples for direct microscopic examination should be examined as soon as possible after collection. Use live specimens whenever possible, or use fresh, chilled, or fixed specimens when live specimens are not practical. If an adequate field laboratory is available, it should be used to process and examine samples near the site of collection.

5.3. Histological techniques

Only live or moribund specimens with clinical signs should be sampled for histology. Collect crustaceans by whatever means are available with a minimum of handling stress. Hold animals in a container appropriate for maintaining suitable water quality and supply adequate aeration to the container if the crustaceans are to be held for a short period of time before actual fixation.

5.3.1. Fixation

A general rule is that a minimum of ten volumes of fixative should be used for one volume of tissue sample (i.e. a 10 g sample of crustacean would require 100 ml of fixative).

i) Davidson's AFA (alcohol, formalin, acetic acid) fixative

Davidson's AFA fixative is recommended for most histological applications. The fixative is rapid, reduces autolytic changes in decapod crustaceans (i.e. especially in crustaceans in tropical and subtropical regions), and its acidic content decalcifies the cuticle. The formulation for Davidson's AFA is (for 1 litre):

- 330 ml 95% ethyl alcohol
 - 220 ml 100% freshly made formalin (a saturated 37–39% aqueous solution of formaldehyde gas)
 - 115 ml glacial acetic acid
 - 335 ml tap water (for marine crustaceans, seawater may be substituted)
- Store the fixative in glass or plastic bottles with secure caps at room temperature.

ii) Fixation procedures with Davidson's AFA

For larvae and postlarvae that are too small to be easily injected with fixative using a tuberculin syringe: Using a fine mesh screen or a Pasteur pipette, select and collect specimens. Immerse crustaceans selected for sampling directly in the fixative. Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

For juveniles that are too small to be injected: Select and collect specimens. Use a needle or fine-pointed forceps to incise the cuticle and immediately immerse crustaceans selected for sampling directly into the fixative. Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

For large juveniles and adults: to ensure proper fixation, kill the crustacean using a humane method, then immediately inject fixative (use 5–10% volume:weight). Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

The hepatopancreas (HP) should be injected first and at two or more sites, with a volume of fixative sufficient to change the HP to a white-to-orange colour (when Davidson's AFA is used); then inject fixative into adjacent regions of the cephalothorax, into the anterior abdominal region, and into the posterior abdominal region.

The fixative should be divided between the different regions, with the cephalothoracic region, specifically the HP, receiving a larger share than the abdominal region.

Immediately following injection, slit the cuticle with dissecting scissors, from the sixth abdominal segment to the base of the rostrum, being particularly careful not to cut deeply into the underlying tissue. The incision in the cephalothoracic region should be just lateral to the dorsal midline, while that in the abdominal region should be approximately mid-lateral.

For crustaceans larger than ~12 g: After injection of fixative, the body should then be transversely bisected, at least once, just posterior to the abdomen/cephalothorax junction, and (optional) again mid-abdominally.

For very large crustaceans (e.g. lobsters, crabs, adult penaeids, adult Macrobrachium rosenbergii, some species and life stages of crabs, crayfish, etc.): The organs of interest may be excised after injection of fixative. Completion of fixation of these tissue samples is then handled as outlined previously.

Following injection, incisions and bisection/trisection, or excision of key organs, immerse the specimen in the fixative (use 10:1 fixative:tissue ratio).

Allow fixation to proceed at room temperature for 24–72 hours depending on the size of crustacean being preserved. Longer fixation times in Davidson's AFA may be used to thoroughly decalcify the shell of crabs, lobsters, crayfish, etc.

Following fixation, the specimens should be transferred to 70% ethyl alcohol, where they can be stored for an indefinite period.

iii) Transport and shipment of preserved samples

As large volumes of alcohol should not be mailed or shipped, the following methods are recommended: Remove the specimens from the 70% ethyl alcohol. For larvae, postlarvae, or small juveniles, use leak-proof, screw-cap plastic vials if available; if glass vials must be used, pack to prevent breakage. For larger specimens, wrap samples with white paper towels to completely cover (do not use raw or processed cotton). Place towel-wrapped specimens in a sealable plastic bag and saturate with 70% ethyl alcohol. Insert the label and seal the bag. Place the bag within a second sealable bag.

Multiple small sealable bags can again be placed within a sturdy, crush-proof appropriately labelled container for shipment (for details see *Aquatic Code* Chapter 5.10 *Measures concerning international transport of aquatic animal pathogens and pathological material*).

5.4. Transmission or scanning electron microscopy

Electron microscopy (EM – transmission or scanning) is a valuable research tool for the study of disease in crustaceans. However, EM methods are not routinely used for diagnosis of the diseases listed by WOA. H.

5.5. Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis

Molecular techniques, including the use of nucleic acid probes for *in-situ* hybridisation, conventional PCR and real-time PCR, have been developed for the identification of many pathogens of aquatic animals. Real-time PCR methods, in general, have high sensitivity and specificity and, following adequate validation, can be used for direct detection of viral nucleic acids in samples prepared-extracted from crustacean tissue. The Molecular techniques can be used in direct surveillance of apparently healthy populations, if they have a high level of diagnostic sensitivity, as well as in the diagnosis of clinically affected animals.

When using PCR as a diagnostic method, the design of primers and probe, the use of positive and negative controls, as well as validation of the PCR method chosen are important. Real-time PCR is a powerful technique particularly for analysing relatively high numbers of samples (e.g. for surveillance) via high-throughput testing. Several nucleic acid probe and PCR protocols are included in this version of the *Aquatic Manual* as screening, diagnostic or confirmatory methods for crustaceans and can be undertaken as the standard method. Following real-time PCR-positive results, where possible, conventional PCR with sequencing of PCR products should be used for confirmation of pathogen identity.

As with all PCR protocols, optimisation may be necessary depending on the reagents, equipment and the plasticware used. PCR is prone to false-positive and false-negative results. False-positive results (negative samples giving a positive reaction) may arise from either product carryover from positive samples or, more commonly, from cross-contamination by PCR products from previous tests. False-negative results (positive samples giving a negative result) may lead to unwanted transmission of pathogens and biosecurity failure.

Each diagnostic samples should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots, and Both aliquots must produce positive results for a sample to be deemed positive. In instances where a sample produces one positive and one negative result, these are deemed indeterminate and should be retested. In addition, the following controls should be run with each assay: negative extraction control (e.g. a tissue [or equivalent sample that is under test]) sample from a known uninfected animal; positive control (preferably, one that can be distinguished from the pathogen genomic sequence [e.g. an artificial plasmid], thus allowing detection of any cross-contamination leading to a false positive result); no template control (all reagents with water replacing the template); internal positive control (internal housekeeping gene). All controls should produce their expected results in order for the diagnostic test result to be valid.

To minimise the risk of contamination, aerosol-preventing barrier pipette tips should be used for all sample preparation and PCR preparation steps. Additionally, all PCRs should be prepared in a clean area that is separate from the area where the nucleic acid extraction, amplifications and gel electrophoresis are performed. Do not share equipment (e.g. laboratory coats and consumables) between areas and, where possible, restrict access between areas. Contaminating PCR products can be carried on equipment, clothes, shoes, pens/marker pens and paper (e.g. workbooks). Also, ensure all work-tops and air-flow cabinets/hoods used for the extractions and PCR set-up are regularly cleaned and decontaminated. To ensure sample integrity, always store the samples (e.g. in a freezer or refrigerator) in a location away-separate from the molecular biology laboratory and reagents

5.5.1. Sample preparation and types

Samples should be prepared to preserve the nucleic acid of the pathogen and should be handled and packaged with the greatest care to minimise the potential for cross-contamination among the samples or target degradation before the assay can be performed. Samples selected for nucleic acid-based or antibody-based diagnostic tests should be handled and packaged (in new plastic sample bags or bottles) with care to minimise the potential for cross-contamination among the sample set taken from different (wild or farmed) stocks, tanks, ponds, farms, etc. A water-resistant label, with the appropriate data filled out, should be placed within each package or container for each sample set.

Some suitable methods for preservation and transport of samples taken for molecular ~~or antibody-based~~ tests are:

- i) *Live specimens*: these may be processed in the field or shipped to the diagnostic laboratory for testing.
- ii) *Haemolymph*: this tissue is the preferred sample for certain molecular and antibody-based diagnostic tests (see disease-specific chapters). Samples may be collected by needle and syringe through cardiac puncture, from the haemocoel (i.e. the ventral sinus in penaeids), or from a severed appendage, and immediately transferred to a tube that is half full with ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol or suitable nucleic acid preservative.
- iii) *Iced or chilled specimens*: these are specimens that can be transported to the laboratory for testing within 24 hours. Pack samples in sample bags surrounded by an adequate quantity of wet ice ~~or freezer bricks~~ around the bagged samples in an insulated box and ship to the laboratory.
- iv) *Frozen ~~whole~~ specimens*: select live specimens according to the criteria listed in disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. ~~In situations where it is not possible to get the specimens to the laboratory alive, they may be~~ quick ~~freeze-frozen~~ in the field using crushed dry-ice or ~~freeze-frozen~~ in the field laboratories using a mechanical freezer at -20°C or lower temperature. Prepare and insert the label into the container with the samples, pack samples with an adequate quantity of dry-ice in an insulated box, and ship to the laboratory.
- v) *Alcohol-preserved samples*: in regions where the storage and shipment of frozen samples is problematic, ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol may be used to preserve, store, and transport certain types of samples for molecular tests. Alcohol-preserved samples are generally not suitable for antibody-based tests. Whole crustaceans (any life stage provided the specimen is no larger than 2–3 g), excised tissues (i.e. pleopods) from large crustaceans, or haemolymph may be preserved in ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol, and then packed for shipment according to the methods described in Section 5.3.1, paragraph iii (see chapter 5.10 of the *Aquatic Code* for additional details on the international transport of such samples).
- vi) *Fixed tissues for in-situ hybridisation*: For this purpose, classic methods for preservation of the tissues are adequate. ~~Neutral-buffered formalin is usually a good choice. Fixation for over 24–48 hours should be avoided; samples should be transferred to ethanol following formalin treatment.~~

5.5.2. Preservation of RNA and DNA in tissues

For routine diagnostic testing by PCR or RT-PCR, samples must be prepared to preserve the pathogen's nucleic acid. For most purposes, preservation of samples in ~~analytical grade ethanol alcohol~~ (80–90%) is the preferred method for subsequent molecular tests. Samples preserved in this way can be stored at 4°C for 1 month, at 25°C for 1 week or indefinitely at -20°C or below. In addition, other products (e.g. nucleic acid preservatives, various lysis buffers, etc.) are commercially available for the same purpose.

5.5.3. Nucleic acid extraction

To isolate nucleic acids from tissues preserved in ethanol or nucleic acid preservative, simply remove the tissue from the fixative or preservative and treat it as though it was just harvested. Most fresh and preserved or fixed tissues can be homogenised (e.g. with a mortar and pestle or in bead-beating tubes) directly in the lysis or extraction buffer provided with commercially available DNA and RNA extraction kits. Commercial kits should be validated or undergo equivalence testing with current validated extraction procedures prior to routine use.

5.5.4. Preparation of slides for *in-situ* hybridisation

For *in-situ* hybridisation, fixed tissues that have been transferred to ~~70%~~ **80% analytical grade** ethanol are embedded in paraffin according to standard histological methods. Sections are cut at a thickness of 5 μm and placed on aminoalkylsilane-coated slides, which are then baked overnight in an oven at 40°C . The sections are de-waxed by immersing in xylene for 10 minutes. This step is repeated once and then the solvent is eliminated by immersion in two successive absolute ethanol baths for 10 minutes each. The sections are then rehydrated by immersion in an ethanol series. The protocol may require a step of membrane permeabilisation enabling access to the target DNA. For this purpose, sections are treated with proteinase K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) in TE buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), at 37°C for 30 minutes. For *in-situ* hybridisation tests (see individual chapters for details), it is essential that both a known positive and a known negative slide be stained to eliminate false positive results due to non-specific staining/stain dropout, and false negative results due to errors in the staining protocol (Qadiri *et al.*, 2019; Valverde *et al.*, 2017). For further details see disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

6. Additional information to be collected

Sample information should include the collector's name, organisation, date, time, and description of the geographical location. The geographical origin of samples may be described as the name or location of the sampling site or its geographical co-ordinates. There should also be records that provide information to allow trace-backs on the sample movement from the sample site to the storage facility or laboratory and within those facilities.

A history of the specimens should also be collected and should include species, age, weight, details of clinical signs including behavioural changes, as well as observations concerning any gross pathology which has been observed.

Information on the preservation method, storage location, and date and time of storage at each storage locker or freezer along with information on the storage temperature (continuously monitored is preferable) should be collected. This information should be tracked with a unique sample code for all samples. For laboratories, the date of receipt, storage location information, date of analysis, analysis notes, and report date should be maintained for all uniquely coded samples. These data will greatly facilitate the tracking of sample problems and provide assurance that the samples were properly handled.

4. KEY REFERENCES FOR FURTHER READING

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

JOHNSON P.T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A Model for the Decapoda. Prager, New York, USA, 440 pp.

LIGHTNER D.V. (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., 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. Invert. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOTZ J.M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 405–413.

MOODY N.J.G. & CRANE M.St.J. (2016). Validation of diagnostic tests in the OIE manual for aquatic animals. In: Proc. 3rd OIE Global Conference on Aquatic Animal Health – “Riding the Wave of the Future”, Ho Chi Minh City, Vietnam, 20–22 January 2015, pp.119–126.

QADIRI S.S.N., SOO-JIN KIM S.-J., KRISHNAN R., KIM J.-O., KOLE S., KIM W.-S. & OH M.-J. (2019). Localization and tissue tropism of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in experimentally infected juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: An *in situ* hybridization and immunohistochemical study. *Aquaculture*, **505**, 242–252.

THITAMADEE S, PRACHUMWAT A., SRISALA J., JAROENLAK P., SALACHAN P.V., SRITUNYALUCKSANA K, FLEGEL T.W. & ITSATHITPHAISARN O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, **452**, 69–87.

VALVERDE E.J., BORREGO J.J., SARASQUETE M.C., ORTIZ-DELGADO J.B. & CASTRO D. (2017). Target organs for lymphocystis disease virus replication in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Vet. Res.*, **48**, 21. doi 10.1186/s13567-017-0428-3.

WALKER P.J. & MOHAN C.V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Rev. Aquaculture*, **1**, 125–154.

*
* *

NB: FIRST ADOPTED IN 2000; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012.

CHAPTER 2.2.2.

INFECTION WITH *APHANOMYCES ASTACI* (CRAYFISH PLAGUE)

1. Scope

Infection with *Aphanomyces astaci* means infection with the pathogenic agent *A. astaci*, Phylum Oomycota. The disease is commonly known as crayfish plague.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Aphanomyces astaci is a water mould. The Oomycetida or Oomycota, are considered protists and are classified with diatoms and brown algae in a group called the Stramenopiles or Chromista.

Five groups (A–E) of *A. astaci* have been described based on random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1994; Kozubikova *et al.*, 2011). Additional geno- or haplotypes are still being detected using molecular methods (Di Domenico *et al.*, 2021). Group A (the so called *Astacus* strains) comprises strains isolated from several European crayfish species. These strains are thought to have been in Europe for a long period of time. Group B (*Pacifastacus* strains I) includes isolates from several European crayfish species and from the invasive *Pacifastacus leniusculus* in Europe as well as Lake Tahoe, USA. Imported to Europe, *P. leniusculus* probably introduced this genotype of *A. astaci* and infected the native European crayfish. Group C (*Pacifastacus* strains II) consists of a strain isolated from *P. leniusculus* from Pitt Lake, Canada. Another strain (Pc), isolated from *Procambarus clarkii* in Spain, sits in group D (*Procambarus* strains). This strain shows temperature/growth curves with higher optimum temperatures compared with groups A and B (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995). *Aphanomyces astaci* strains that have been present in Europe for many years (group A strains) appear to be less pathogenic than strains introduced with crayfish imports from North America since the 1960s. North American host species spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) has been shown to be a carrier of Group E (Kozubiková *et al.*, 2011).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Aphanomyces astaci is poorly resistant against desiccation and does not survive long in decomposing hosts. Any treatment of the crayfish (freezing, cooking, drying) will affect the survival of the pathogen (Oidtman *et al.*, 2002). Isolation from processed samples is not possible, however they may be suitable for molecular methods used for pathogen detection.

2.1.3. Survival and stability outside the host

Outside the host *Aphanomyces astaci* is found as zoospores that remain motile for up to 3 days and form cysts that can survive for 2 weeks in distilled water. As *A. astaci* can go through three cycles of encystment and zoospore emergence, the maximum life span outside of a host could be several weeks. Spores remained viable in a spore suspension in clean water kept at 2°C for 2 months (Unestam, 1966). Survival time is probably shorter in natural waters.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

The recommendations in this chapter apply to all species of crayfish in all three crayfish families (Cambaridae, Astacidae and Parastacidae).

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with *A. astaci* in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

All stages of crayfish species native to Europe, including the noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender-clawed or Turkish crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor are highly susceptible (e.g. Holdich *et al.*, 2009). Australian species of crayfish are also highly susceptible. North American crayfish such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Faxonius* spp. are infected by *A. astaci*, but under normal conditions the infection does not cause clinical disease or death. All North American crayfish species investigated to date have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (reviewed by Svoboda *et al.* 2017) and it is therefore currently assumed that this is the case for any other North American species.

The only other crustacean known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

[Under study]

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

The host species susceptible to infection with *A. astaci* fall largely into two categories: those highly susceptible to infection with that development of clinical disease and mortalities, and those that are infected without associated but do not display any significant clinical disease or mortalities. All life stages are considered susceptible to infection with *A. astaci*.

Species that develop clinical disease and mortalities include the noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender-clawed or Turkish crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor (e.g. Holdich *et al.*, 2009). Australian species of freshwater crayfish are also considered vulnerable to clinical disease and mortalities.

Species that can be infected but do not normally develop clinical disease include North American crayfish species such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Faxonius* spp. All North American crayfish species that have been investigated have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (reviewed by Svoboda *et al.* 2017).

Highly susceptible species: Clinical disease outbreaks caused by infection with *A. astaci* are generally known as 'crayfish plague' outbreaks. In such outbreaks, moribund and dead crayfish of a range of sizes (and therefore ages) can be found.

The only non-crayfish crustacean species known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The tissue that becomes initially infected is the exoskeleton cuticle. Soft cuticle, as is found on the ventral abdomen and around joints, is preferentially affected. In the highly susceptible European crayfish species, which are prone to development of clinical disease, the pathogen often manages to penetrate the basal lamina located underneath the epidermis cell layer. From there, *A. astaci* spreads throughout the body primarily by invading connective tissue and haemal sinuses; however, all tissues may be affected.

In North American crayfish species, infection is usually restricted to the cuticle. Based on PCR results, the tailfan (consisting of uropods and telson) and soft abdominal cuticle appear to be frequently infected (Oidtmann *et al.*, 2006; Vralstad *et al.*, 2011).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

North American crayfish species act mostly as reservoirs carriers of the infection without showing clinical signs. However, some strains of *A. astaci*, especially from group A, show lowered virulence, thus enabling ~~normally highly susceptible~~ European crayfish to act as reservoirs carriers as well (see review by Svoboda *et al.*, 2017).

~~Colonisation of habitats, initially by North American crayfish species carrying *A. astaci* occupied by highly susceptible is likely to result in an epizootic if crayfish species that are prone to expression of clinical disease are present by North American crayfish species carrying *A. astaci* is likely to result in an epizootic among the highly susceptible animals.~~

2.2.6. Vectors

~~Transportation of finfish may facilitate the spread of *A. astaci* through the presence of spores in the transport water or co-transport of infected crayfish specimens (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (e.g. nets, boots, clothing, traps) (Alderman *et al.*, 1987). None known.~~

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity, and prevalence

When the infection first reaches a naïve population of highly susceptible crayfish species that are prone to clinical disease, high levels of mortality are usually observed within a short space of time, ~~so that in and in~~ areas with high crayfish densities the bottoms of lakes, rivers and streams are covered with dead and dying crayfish. A band of mortality will spread quickly from the initial outbreak site downstream, whereas upstream spread is slower. Lower water temperatures are associated with ~~slower a~~ lower rate of mortalities and a greater range of clinical signs in affected animals (Alderman *et al.*, 1987). Observations from Finland suggest that at low water temperatures, noble crayfish (*Astacus astacus*) can be infected for several months without ~~the development of any~~ noticeable mortalities (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2013).

On rare occasions, single specimens of ~~the highly susceptible~~ species that are prone to clinical disease have been found after a wave of infection with *A. astaci* has gone through a river or lake. This is most likely to be due to lack of exposure of these animals during an outbreak (animals may have been present in a tributary of a river or lake or in a part of the affected river/lake that was not reached by spores, or crayfish may have stayed in burrows during the epizootic). However, low virulent strains of *A. astaci* have been described to persist in a water way, kept alive by a weak infection in the remnant population (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Although remnant populations of susceptible crayfish species remain in many European watersheds, the dense populations that existed 150 years ago are now heavily diminished (Souty-Grosset *et al.*, 2006; Holdich *et al.*, 2009). Populations of susceptible crayfish may re-establish, but once population density and geographical distribution is sufficient for susceptible animals to come into contact with spores, new outbreaks of infection with *A. astaci* and large-scale mortalities will occur.

In ~~the highly susceptible~~ European crayfish species, exposure to *A. astaci* spores usually leads to infection and eventually to death. Prevalence of infection within a population in the early stage of an outbreak may be low (few animals in a river population may be affected). However, the pathogen ~~is~~ amplified in affected animals and subsequently released into the water; usually leading to 100% mortality in a contiguous population. The rate of spread from initially affected animals depends on several factors, one being water temperature. Therefore, the time from first introduction of the pathogen into a population to noticeable crayfish mortalities can vary greatly and may range from a few weeks to months. Prevalence of infection will gradually increase over this time and usually reach 100%. Data from a noble crayfish population in Finland that experienced an acute mortality event due to infection with *A. astaci* in 2001 suggest that in sparse noble crayfish populations, spread of disease throughout the host population may take several years (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Susceptible species

Gross clinical signs are variable and depend on challenge severity and water temperatures. The first sign of an epizootic may be the appearance of crayfish during daylight (crayfish are normally nocturnal), some of which may show loss of co-ordination, falling onto their backs and remaining unable to right themselves. Occasionally, the infected animals can be seen trying to scratch or pinch themselves.

Often, however, the first sign of an outbreak may be the presence of large numbers of dead crayfish in a river or lake (Alderman *et al.*, 1987).

Infection with *A. astaci* may cause mass mortality of crayfish. However, investigation of mortality event should consider other causes such as environmental pollution (e.g. insecticides such as cypermethrin have been associated with initial misdiagnoses).

North American crayfish species

Infected North American crayfish may be subclinical carriers. Controlled exposure to a highly virulent strain has resulted in mortality in juvenile stages of *Pacifastacus leniusculus* as well as behavioural alterations in adults (Thomas *et al.*, 2020).

2.3.3 Gross pathology

Susceptible Species prone to clinical disease

Depending on a range of factors, the foci of infection in crayfish may be seen by the naked eye or may not be discernible despite careful examination. Infection foci are best viewed under a low power stereo microscope and are recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases, a brown colouration of cuticle and muscle may occur, or hyphae may be visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle. Sites for examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and abdomen, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint, eyestalks and finally the gills.

North American crayfish species

Infected North American crayfish ~~do not usually show signs of disease~~ can sometimes show melanised spots in their soft cuticle, for example, the soft abdominal cuticle and joints. These melanisations can be caused by mechanical injuries or infections with other water moulds and are non-specific. However, populations with high levels of infection can show abnormally high levels of cuticular damage in individual animals, such as missing legs and claws due to deteriorated joints.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

~~The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, as may occur during movements of finfish, or 3) through colonisation of habitats by invasive North American crayfish species.~~

~~The main route of spread of *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms. Subsequent spread occurs through expanding populations of invasive North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Holdich *et al.*, 2009).~~

Transmission from crayfish to crayfish occurs through the release of zoospores from an infected animal and attachment of the zoospores to naïve crayfish. The life cycle of *A. astaci* is simple with vegetative hyphae invading and ramifying through host tissues, eventually producing extramatrical sporangia that release amoeboid primary spores. These initially encyst, but then release a biflagellate zoospore (secondary zoospore). Biflagellate zoospores swim in the water column and, on encountering a susceptible host, attach and germinate to produce invasive vegetative hyphae. The zoospores of *A. astaci* swim actively in the water column and have been demonstrated to show positive chemotaxis towards crayfish (Cerenius & Söderhäll, 1984). Zoospores are capable of repeated encystment and re-emergence, extending the period of their infectivity (Soderhall & Cerenius 1999). Growth and sporulation capacity is strain-and temperature-dependent (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, or 3) through colonisation of non-native habitats by invasive North American crayfish species.

The main route of spread of *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms. Subsequent spread occurred through expanding populations of invasive North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Holdich *et al.*, 2009).

Transportation of finfish may facilitate the spread of *A. astaci* through the presence of spores in the transport water or co-transport of infected crayfish specimens (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (e.g. nets, boots, clothing, traps) (Alderman *et al.*, 1987).

2.3.5. Environmental factors

Under laboratory conditions, the preferred temperature range at which the *A. astaci* mycelium grows varies slightly depending on the strain. In a study, which compared several *A. astaci* strains that had been isolated from a variety of crayfish species, mycelial growth was observed between 4 and 29.5°C, with the strain isolated from *Procambarus clarkii* growing better at higher temperatures compared to the other strains. Sporulation efficiency was similarly high for all strains tested between 4 and 20°C, but it was clearly reduced for the non-*P. clarkii* strains at 25°C and absent at 27°C. In contrast, sporulation still occurred in the *P. clarkii* strain at 27°C. The proportion of motile zoospores (out of all zoospores observed in a zoospore suspension) was almost 100% at temperatures ranging from 4–18°C, reduced to about 60% at 20°C and about 20% at 25°C in all but the *P. clarkii* strain. In the *P. clarkii* strain, 80% of the zoospores were still motile at 25°C, but no motile spores were found at 27°C (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

Field observations show that outbreaks of infection with *A. astaci* occur over a wide temperature range, and at least in the temperature range 4–20°C. The rate of spread within a population depends on several factors, including water temperature. In a temperature range between 4 and 16°C, the speed of an epizootic is enhanced by higher water temperatures.

In buffered, redistilled water, sporulation occurs between pH 5 and 8, with the optimal range being pH 5–7. The optimal pH range for swimming of zoospores appears to be pH 6.0–7.5, with a maximum range between pH 4.5 and 9.0 (Unestam, 1966).

Zoospore emergence is influenced by the presence of certain salts in the water. CaCl₂ stimulates zoospore emergence from primary cysts, whereas MgCl₂ has an inhibitory effect. In general, zoospore emergence is triggered by transferring the vegetative mycelium into a medium where nutrients are absent or low in concentration (Cerenius *et al.*, 1988).

2.3.6. Geographical distribution

In Europe the reports of large mortalities of crayfish go back to 1860. The reservoir of the original infections in the 19th century was never established. *Faxonius (Orconectes)* spp. were not known to have been introduced into Europe until the 1890s, but the post-1960s extensions are largely linked to more recent introductions of North American crayfish for farming (Alderman, 1996; Holdich *et al.* 2009). *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii* are now widely naturalised in many parts of Europe.

In recent years, crayfish plague has been reported in Asia and also in North- and South America (see e.g. references in Di Domenico *et al.* 2021). The distribution of *A. astaci* in North America is likely to be much wider than reported.

~~Any geographical area where North American crayfish species were introduced must be considered as potentially infected if not proven otherwise. Lack of clinical disease in these carrier species may hamper the reliability in reporting the infection. For the highly susceptible species, See WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level. However, even high mortalities can go unnoticed in wild populations.~~

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No vaccines are available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No treatments are currently known that can successfully treat the highly susceptible crayfish species, once infected.

2.4.3. Immunostimulation

No immunostimulants are currently known that can successfully protect the highly susceptible crayfish species against infection and consequent disease due to *A. astaci* infection.

2.4.4. Breeding resistant strains

A few studies suggest that there might be differences in resistance between populations of highly susceptible species crayfish species that are prone to clinical disease (reviewed by Martin-Torrijos *et al.*, 2017; Svoboda *et al.*, 2017). ~~The fact that North American crayfish generally do not develop clinical disease suggests that selection for resistance may be possible and laboratory studies using attenuated strains of *A. astaci* might be successful. However, there are currently no published data from such studies.~~

2.4.5. Inactivation methods

Aphanomyces astaci, both in culture and in infected crayfish, is inactivated by a short exposure to temperatures of 60°C or to temperatures of –20°C (or below) for 48 hours (or more) (Oidtmann *et al.*, 2002). Sodium hypochlorite at 100 ppm, free chlorine and iodophors at 100 ppm available iodine, are effective for disinfection of contaminated equipment. Equipment must be cleaned prior to disinfection since organic matter decreases the effectiveness of disinfectants (Alderman & Polglase, 1985). Thorough drying of equipment (>24 hours) is also effective as *A. astaci* is not resistant to desiccation (Rennerfelt, 1936).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

No information available.

2.4.7. General husbandry

If a ~~crayfish farm for highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease is being planned, it should be carefully investigated whether North American crayfish species are in the vicinity of the planned site or present upstream. If North American crayfish are present, there is a high likelihood that susceptible farmed crayfish will eventually become infected.

In an endemic area where ~~the highly susceptible species~~ prone to expression of clinical disease are being farmed, the following biosecurity recommendations should be followed to avoid an introduction of *A. astaci* onto the site:

1. General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when entering the site; investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, finfish) only from sources known to be free from infection with *A. astaci*).
2. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
3. If transfers of finfish or crayfish are being planned, these should not come from streams or other waters that harbour potentially infected crayfish (either susceptible crayfish populations that are going through a current outbreak of infection with *A. astaci* or North American ~~earlier~~ crayfish species).
4. North American crayfish should not be brought onto the site.
5. Finfish obtained from unknown freshwater sources or from sources, where North American crayfish may be present or a current outbreak of infection with *A. astaci* may be taking place, must not be used as bait or feed for crayfish, unless they have been subject to a temperature treatment to kill *A. astaci* (see Section 2.4.5. *Inactivation methods*).
6. Any equipment that is brought onto site should be disinfected.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

For a suspected outbreak of infection with *A. astaci* in a population of ~~highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease, sampled crayfish should ideally consist of: a) live crayfish showing signs of disease, and b) live, apparently healthy crayfish. Freshly dead crayfish may also be suitable, although this will depend on their condition.

Live crayfish should be transported using insulated containers equipped with small holes to allow aeration. The temperature in the container should not exceed 16°C.

Crayfish should be transported in a moist atmosphere, for example using moistened wood shavings/wood wool, newspaper, or grass/hay. Unless transport water is sufficiently oxygenated, live crayfish should not be transported in water, as they may suffocate.

The time between sampling of live animals and delivery to the investigating laboratory should not exceed 24 hours.

Should only dead animals be found at the site of a suspected outbreak, freshly dead animals should be selected for diagnosis. Dead animals can either be: a) transported chilled (if they appear to have died only very recently), or, b) placed in non-methylated ethanol (minimum concentration 70%; see 3.5. *Preservation of samples for submission*), or c) placed in freezer at –20°C to avoid further decay and transported frozen.

When testing any population outside an acute mortality event for the presence of crayfish plague, as many individuals as possible should be inspected visually for signs of cuticular damage. Crayfish that have melanized spots or missing limbs should be selected in the first place for further analysis.

3.2. Selection of organs or tissues

In highly susceptible species that are prone to clinical disease, the tissue recommended for sampling is the soft abdominal cuticle, which can be found on the ventral side of the abdomen. Any other soft part of the exoskeleton can be included as well. If any melanised spots or whitened areas are detected, these should be included in the sampling. From diseased animals, samples should be aseptically collected from the soft abdominal cuticle. For identification of carriers, samples should be aseptically collected from soft abdominal cuticle, and telson and uropods, separately.

In the North American crayfish species, sampling of soft abdominal cuticle, uropods and telson are recommended. Any other soft part of the exoskeleton can be included as well. If any melanized spots are detected, these should be included in the sampling.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Autolysed material is not suitable for analysis.

3.4. Non-lethal sampling

A non-destructive sampling method that detects *A. astaci* DNA in the microbial biofilm associated with the cuticle of individual crayfish through vigorous scrubbing has been described (Pavic *et al.*, 2020), and could be considered in case of testing vulnerable populations.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

3.5. Preservation of samples for submission

The use of non-preserved crayfish is preferred, as described above. If transport of recently dead or moribund crayfish cannot be arranged, crayfish may be frozen or fixed in ethanol (minimum 70%). However, fixation may reduce test sensitivity. The crayfish:ethanol ratio should ideally be 1:10 (1 part crayfish, 10 parts ethanol).

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

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). Isolation is best attempted from crayfish with clinical signs delivered alive (see Section 3.1.). Fresh specimens should be kept chilled and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection.

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.5.5. of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans).

3.5.3. Samples for histopathology

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

3.5.4. Samples for other tests

Sensitive molecular methods can be used to detect *A. astaci* DNA directly from water samples (Strand *et al.* 2011, 2012). These methods require validation for diagnostic use.

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 animals should be processed and tested individually. Small life stages such as PL, can be pooled to obtain the minimum amount of material for 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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						+	+	NA				
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation												
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 WOAHP 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

Small pieces of soft cuticle excised from the regions mentioned above (Section 2.3.3 *Gross pathology*) and examined under a compound microscope using low-to-medium power will confirm the presence of aseptate fungal-like hyphae 7–9 µm wide. The hyphae can usually be found pervading the whole thickness of the cuticle, forming a three-dimensional network of hyphae in heavily affected areas of the cuticle. The presence of host haemocytes and possibly some melanisation closely associated with and encapsulating the hyphae give good presumptive evidence that the hyphae represent a pathogen rather than a secondary opportunist invader. In some cases, examination of the surface of such mounted cuticles will demonstrate the presence of characteristic *A. astaci* sporangia with clusters of encysted primary spores (see Section 4.3 *Culture for isolation*).

4.2. Histopathology

Unless the selection of tissue for fixation has been well chosen, *A. astaci* hyphae can be difficult to find in stained preparations. A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used. However, such material does not prove that any hyphae observed are those of *A. astaci*, especially when the material comes from animals already dead by sampling.

See also Section 4.1 *Wet mounts*.

4.3. Culture for isolation

Isolation is not recommended as a routine diagnostic method (Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1987; Viljamaa-Dirks, 2006). Test sensitivity and specificity of the cultivation method can be very variable depending on the experience of the examiner, but in general will be lower than the PCR. Isolation of *A. astaci* by culture from apparently healthy crayfish is challenging and molecular methods are recommended. A detailed description of this test is available from the Reference Laboratory¹.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate. Shrimp tissues may be used as negative controls.

Live crayfish can be killed using chloroform, electric current or by mechanical destroying the nerve cords. If live or moribund animals are not available, only recently dead animals should be used for DNA extraction. The soft abdominal cuticle is the preferred sample tissue for DNA extraction. Any superficial contamination should first be removed by thoroughly wiping the soft abdominal cuticle with wet (using autoclaved H₂O) clean disposable swabs. The soft abdominal cuticle is then excised and 30–50 mg ground using a pestle and mortar.

Several PCR assays have been developed with varying levels of sensitivity and specificity. Two assays are described here. Both assays target the ITS (internal transcribed spacer) region of the nuclear ribosomal gene cluster within the *A. astaci* genome.

Extraction of nucleic acids

~~Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.~~

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.

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling conditions
--------------------------	----------------------	---------------	--------------------

¹ <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>

Method 1*: Vralstad <i>et al.</i> , 2009, Strand, 2013; GenBank Accession No.: AM947024			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> & <i>A. fennicus</i> /ITS	Fwd: AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT Rev: CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A Probe: 6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-C-MGBNFQ	500 nM <u>500 nM</u> 200 nM	50 cycles of: 95°C/15 sec and 60°C/30 sec
Alternative method 2: Strand <i>et al.</i> to be published; GenBank Accession No.: AM947024			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> /ITS	Fwd: TAT-CCA-CGT-GAA-TGT-ATT-CTT-TAT Rev: GCT-AAG-TTT-ATC-AGT-ATG-TTA-TTT-A Probe: FAM-AAG-AAC-ATC-CCA-GCA-C-MGBNFQ	500 nM <u>500 nM</u> 200 nM	50 cycles of: 95°C/15 sec and 60°C/30 sec

*These ITS-based methods have been found to give positive results for the species *Aphanomyces fennicus* (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2019).

The absolute limit of detection of method 1 was reported as approximately 5 PCR forming units (= target template copies), which is equivalent to less than one *A. astaci* genome (Vralstad *et al.*, 2009). Another study reported consistent detection down to 50 fg DNA using this assay (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Analytical test specificity has been investigated (Tuffs & Oidtmann, 2011; Vralstad *et al.*, 2009) and no cross-reaction was observed in these studies. However, a novel species, *Aphanomyces fennicus*, isolated from noble crayfish was reported in 2019 (Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019) that gave a positive reaction in this test at the same level as *A. astaci*. Due to this problem in specificity, the assay has been modified according to the alternative method 2 (Strand *et al.*, manuscript in preparation):

Owing to the repeated discovery of new *Aphanomyces* strains, sequencing is required to determine the species of *Aphanomyces*. In the case of the real-time PCR assay, this requires separate amplification of a PCR product using primers ITS-1 and ITS-4 (see Section 4.5 *Amplicon sequencing*).

4.4.2. Conventional PCR

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling conditions
Method 1*: Oidtmann <i>et al.</i> , 2006; GenBank Accession No.: AY310499; Product amplicon size: 569 bp			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> & <i>A. fennicus</i> /ITS	Fwd: GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT Rev: CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-	500 nM <u>500 n</u>	40 cycles of: 1 min/96°C, 1 min/59°C and 1 min/72°C

*This ITS-based method has been found to give positive results for the species *Aphanomyces fennicus* (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2019).

Confirmation of the identity of the PCR product by sequencing is required as a novel species, *A. fennicus*, isolated from noble crayfish was reported in 2019 (Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019) that gave a positive reaction in this assay.

The assay consistently detects down to 500 fg of genomic target DNA or the equivalent amount of ten zoospores submitted to the PCR reaction (Tuffs & Oidtmann, 2011).

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Several genotype-specific molecular methods have been developed that, instead of requiring a pure growth as sample material like the RAPD-PCR assay, can be used to analyse crayfish tissue directly (Di Domenico *et al.*, 2021; Grandjean *et al.*, 2014; Makkonen *et al.*, 2018; Minardi *et al.*, 2018; 2019). Detection of a known genotype group combined with a positive result by a recommended conventional or real-time PCR can be used as a confirmative test in geographical areas where crayfish plague is known to be present. However, the current knowledge of the genotype variation is mostly limited

to a few original host species and new genotypes or subtypes are expected to be found. Thus, the suitability of these methods is limited for initial excluding diagnosis or as confirmative tests in geographical areas not known to be infected.

PCR targeting mitochondrial DNA with *A. astaci* genotype specific primers have been shown to detect the known genotypes of *A. astaci*, but these assays may also provide positive results for some other oomycete genera (Casabella-Herrero *et al.*, 2021).

4.5. Amplicon sequencing

~~and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.~~

4.6. *In-situ* hybridisation

Not available.

4.7. Immunohistochemistry

Not available

4.8. Bioassay

No longer used for diagnostic purposes (see Cerenius *et al.*, 1988).

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Not available.

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

The recommended method for surveillance is real-time PCR, the modified assay by Strand *et al.* (manuscript in preparation).

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 WOAHP Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOAHP Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.~~

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status.²

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.

² For example transboundary commodities.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* shall be suspected if at least the following criterion 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 *Aphanomyces astaci* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR and positive result by conventional PCR followed by amplicon sequencing

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 *Aphanomyces astaci* 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) Visual observation of hyphae indicative of *A. astaci* in wet mounts
- iii) Observation of hyphae indicative of *A. astaci* in stained histological sections
- iv) Culture and isolation of the pathogen
- v) Positive result by real-time PCR
- vi) Positive result by conventional PCR

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* is confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR and positive result by conventional PCR and amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *Aphanomyces astaci* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (~~none~~ no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with *Aphanomyces astaci*, 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 (<i>n</i>)	DSp (<i>n</i>)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study.

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, n = number of samples used in the study.

7. References

- ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 603–632.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquacult. Fish. Manage.*, **16**, 203–205.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.
- CASABELLA-HERRERO G., MARTÍNEZ-RÍOS M., VILJAMAA-DIRKS S., MARTÍN-TORRIJOS L. & DIÉGUEZ-URIBEONDO J. (2021). *Aphanomyces astaci* mtDNA: insights into the pathogen's differentiation and its genetic diversity from other closely related oomycetes. *Fungal Biol.*, **125**, 316–325. doi: 10.1016/j.funbio.2020.11.010. Epub 2020 Dec 2.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropodparasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K. & FULLER M.S. (1987). *Aphanomyces astaci* and *Aphanomyces* spp. In: Zoosporic fungi in teaching and research, Fuller M.S. & Jaworski A., eds. South-Eastern Publishing Corp., Athens, Georgia, USA. pp 64–65.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshwater Crayfish*, **7**, 131–144.
- DI DOMENICO M., CURINI V., CAPRIOLI R., GIANANTE C., MRUGAŁA A., MOJŽIŠOVÁ M., CAMMA C. & PETRUSEK A. (2021). Real-Time PCR assays for rapid identification of common *Aphanomyces astaci* genotypes. *Front. Ecol. Evol.*, **9**, art 597585 doi:10.3389/fevo.2021.597585.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.
- GRANDJEAN F., VRÁLSTAD T., DIÉGUEZ-URIBEONDO J., JELIĆ M., MANGOMBI J., DELAUNAY C., FILIPOVÁ L., REZINCIUC S., KOZUBÍKOVÁ-BALCAROVA E., GYONNET D., VILJAMAA-DIRKS S. & PETRUSEK A. (2014). Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet. Microbiol.*, **170**, 317–324.
- HOLDICH D.M., REYNOLDS J.D., SOUTY-GROSSET C. & SIBLEY P.J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, **394–395**, 1–46.
- HUANG T.S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–10.
- KOZUBÍKOVÁ E., VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S. & PETRUSEK A. (2011). Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci*. *J. Invertebr. Pathol.*, **108**, 214–216.
- MAKKONEN J., JUSSILA J., PANTELEIT J., KELLER N.S., SCHRIMPF A., THEISSINGER K., KORTET R., MARTÍN-TORRIJOS L., SANDOVAL-SIERRA J.V., DIÉGUEZ-URIBEONDO J. & KOKKO H. (2018). MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. *Parasitology*, **145**, 1210–1218. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000227>.

-
- MARTIN-TORRIJOS L., CAMPOS LACH M., POU ROVIRA Q. & DIÉGUEZ-URIBEONDO J. (2017). Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the endangered freshwater crayfish species, *Austropotamobius pallipes*. *PLoS ONE*, **12** (7), e0181226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181226>
- MINARDI D., STUDHOLME D.J., OIDTMANN B., PRETTO T. & VAN DER GIEZEN M. (2019). Improved method for genotyping the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on mitochondrial DNA. *Parasitology*, **146**, 1022–1029, doi:[10.1017/S0031182019000283](https://doi.org/10.1017/S0031182019000283)
- MINARDI D., STUDHOLME D.J., VAN DER GIEZEN M., PRETTO T. & OIDTMANN B. (2018). New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. *J. Invertebr. Pathol.*, **156**, 6–13.
- OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 53–64.
- OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 159–167.
- PAVIC D., ČANKOVIĆ M., PETRIĆ I., MAKKONEN J., HUDINA S., MAGUIRE I., VLADUŠIĆA T., ŠVER L., HRAŠČANA R., ORLIĆ K., DRAGIČEVIĆ P. & BIELEN A. (2020) Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *J. Invertebr. Pathol.*, **169**, 107274. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107274>
- RENNERFELT E. (1936). Untersuchungen über die Entwicklung und Biologie des Krebspestpilzes *Aphanomyces astaci* Schikora. Report of the Institute of Freshwater Research (Drottningholm, Sweden), **10**, 1–21.
- SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFFNER P. (eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.
- STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 9–17.
- STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, **160**, 99–107.
- STRAND D.A. (2013) Environmental DNA monitoring of the alien crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater systems – Sporulation dynamics, alternative hosts and improved management tools. *Dissertation book, University of Oslo Faculty of Mathematics and Natural Sciences Department of Biosciences, Oslo*, ISSN 1501-7710, 73 p.
- SVOBODA J., MRUGAŁA A., KOZUBÍKOVÁ-BALCAROVÁ E. & PETRUSEK A. (2017). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *J. Fish Dis.*, **40**, 127–140. <https://doi.org/10.1111/jfd.12472>
- SODERHALL K. & CERENIUS L. (1999) The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshwater Crayfish*, **12**, 11–34.
- THOMAS J.R., ROBINSON C.V., MRUGAŁA A., ELLISON A.R., MATTHEWS E., GRIFFITHS S.W., CONSUEGRA S. & CABLE J. (2020). Crayfish plague affects juvenile survival and adult behaviour of invasive signal crayfish. *Parasitology*, **1–9**, <https://doi.org/10.1017/S0031182020000165>
- TUFFS S & OIDTMANN B (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **153**, 345–353.
- UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiol. Plant.*, **19**, 1110–1119.
- ~~UNESTAM T. & SODERHALL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshwater Crayfish*, **3**, 321–331.~~
- VILJAMAA-DIRKS S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshwater Crayfish*, **15**, 376–382.
- VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2019) A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *J. Fish Dis.*, **42**, 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>
-

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **31**, 182–188.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., TORSSONEN H., PURSIAINEN M., MATTILA J. & PELKONEN S. (2013). Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland. *Dis. Aquat. Org.*, **103**, 199–208.

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

VRALSTAD T., KNUITSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague)
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague)

NB: FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.6.

INFECTION WITH
MACROBRACHIUM ROSENBERGII NODAVIRUS (WHITE TAIL
DISEASE)

1. Scope

Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus means infection with the pathogenic agent *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) in the Family *Nodaviridae*. The disease is commonly known as white tail disease (WTD).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Two viruses are associated with WTD, namely *MrNV* (primary) and extra small virus (*XSV*) (associate) (Qian *et al.*, 2003; Romestand & Bonami, 2003). *MrNV* is a necessary cause of WTD in prawns, however, the role of *XSV* in pathogenicity remains unclear.

MrNV belongs in the family *Nodaviridae* (Bonami *et al.*, 2005). While the physico-chemical properties of *MrNV* are consistent with those of other members of the *Nodaviridae*, it differs structurally and genetically from other nodaviruses within the two recognised genera, *Alphanodavirus* and *Betanodavirus* (Ho *et al.*, 2017, 2018; Naveenkumar *et al.*, 2013). Consequently, a third genus, *Gammanodavirus*, has been proposed for nodaviruses that infect crustaceans, including *MrNV* and *Penaeus vannamei* nodavirus (*PvNV*) (Naveenkumar *et al.*, 2013).

XSV is the first sequenced satellite virus in aquatic animals and it is also the first record of a satellite-nodavirus association (Bonami *et al.*, 2005). *XSV* has been classified by the ICTV as *Macrobrachium* satellite virus 1 of the family *Sarothroviridae*.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Both viral pathogens (*MrNV* and *XSV*) are stable in processed or stored samples stored at –20 or –80°C. Storing the samples at –80°C is recommended for long-time storage and maintenance of pathogen virulence (Sahul Hameed & Bonami, 2012). The infected samples should be processed at low temperature to maintain the stability of the viruses. Viral inoculum prepared from infected prawn stored at –20°C caused 100% mortality in postlarvae (PL) of *M. rosenbergii* by immersion challenge (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a). Ravi & Sahul Hameed (2016) found that *MrNV* in tissue suspensions was inactivated after exposure to 50°C for at least 5 min.

2.1.3. Survival and stability outside the host

Survival outside the host is not known.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *MrNV* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).

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 MrNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results (but not active infection) have been reported in the following species:

Family	Scientific name	Common name
Aeshnidae	<i>Aeshna</i> sp.	dragonfly
Artemiidae	<i>Artemia</i> sp.	brine shrimps
Belostomatidae	<i>Belostoma</i> sp.	giant water bug
Dytiscidae	<i>Cybister</i> sp.	beetle
Notonectidae	<i>Notonecta</i> sp.	backswimmer
Palaemonidae	<i>Macrobrachium rude</i>	hairy river prawn
	<i>Macrobrachium malcolmsonii</i>	monsoon river prawn
Parastacidae	<i>Cherax quadricarinatus</i>	red claw crayfish
Penaeidae	<i>Penaeus japonicus</i>	kuruma prawn
	<i>Penaeus indicus</i>	Indian white prawn
	<i>Penaeus monodon</i>	giant tiger prawn

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

Experimental pathogenicity studies revealed that larvae, PL and early juveniles of *M. rosenbergii* are susceptible to MrNV/XSV, whereas adults are resistant (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

No mortality was observed either in naturally or experimentally (MrNV/XSV) infected subadult and adult prawns. Experimental studies confirmed vertical transmission from infected broodstock to PL (Sudhakaran *et al.*, 2007a).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

MrNV and XSV have been demonstrated in gill tissue, head muscle, heart, abdominal muscle, ovaries, pleopods and tail muscle, but not the hepatopancreas or eyestalk (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

One study has indicated the possibility that marine shrimp act as a reservoir for MrNV and XSV and that these viruses maintain virulence in the shrimp tissue system (Sudhakaran *et al.*, 2006).

2.2.6. Vectors

Aquatic insects such as giant water bug (*Belostoma* sp.), dragonfly (*Aeshna* sp.), beetle (*Cybister* sp.) and backswimmer (*Notonecta* sp.) may act as mechanical carriers for MrNV/XSV and are a potential transmission risk to cultivated *Macrobrachium rosenbergii* (Sudhakaran *et al.*, 2008). It is recommended to remove these insects from freshwater prawn culture systems, especially at larval-rearing centres. Sudhakaran *et al.* (2008) demonstrated RT-PCR positives from insects, and infected C6/36 insect cell line with tissue homogenates from the insects. Viral replication was confirmed through EM and RT-PCR, but transmission from insects to naïve shrimp was not demonstrated.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Larvae, PL and juveniles of *M. rosenbergii* are susceptible to infection with MrNV, which often causes high mortalities in these life stages. Mortality may reach a maximum in about 5 or 6 days after the appearance of the first clinical signs. Very few PL with infection with MrNV survive beyond 15 days in an outbreak, but PL that survive may grow to market size.

Adults are resistant to infection with *MrNV*, but act as carriers (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a). Prevalence is variable from 10% to 100% in hatchery, nursery and grow-out systems (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Infected PL become opaque and develop a whitish appearance, particularly in the abdominal region. The whitish discoloration appears first in the second or third abdominal segment and gradually diffuses both anteriorly and posteriorly. In severe cases, degeneration of telson and uropods may occur. Floating exuviae (moult) in the tanks appear abnormal and resemble 'mica flakes' (Arcier *et al.*, 1999). The infected PL show progressive weakening of their feeding and swimming ability (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.3.3. Gross pathology

Infection with *MrNV* is indicated by the whitish coloration of abdominal muscle.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission is vertical by trans-ovum and horizontal by the waterborne route (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2007a).

2.3.5. Environmental factors

Not available.

2.3.6. Geographical distribution

The disease was first reported in the French West Indies (Arcier *et al.*, 1999), later in Asia-Pacific (Murwantoko *et al.*, 2016; Owens *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2003; Saedi *et al.*, 2012; Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2008; Yoganandhan *et al.*, 2006).

See WOA-H-WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

Preventive measures, such as screening of broodstock and PL, and good management practices may help to prevent infection with *MrNV* in culture systems. As the life cycle of *M. rosenbergii* is completed under controlled conditions, specific pathogen-free (SPF) broodstock and PL can be produced (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

2.4.1. Vaccination

Not available

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No known chemotherapeutic agents reported to treat *MrNV*-infected prawn.

2.4.3. Immunostimulation

The immunomodulatory effect of recombinant capsid protein and recombinant RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) protein of *MrNV* has been studied and the protection of viral challenged post-larvae from *MrNV* infection has been demonstrated (Farook *et al.*, 2014; NaveenKumar *et al.*, 2021).

2.4.4. Breeding resistant strains

None reported

2.4.5. Inactivation methods

A viral suspension treated with heat at 65°C for 2 hours destroyed infectivity of *MrNV* and *XSV* in challenge experiments (Qian *et al.*, 2003). The viral inoculum exposed to UV irradiation for a period of 5 minutes and more was totally inactivated and failed to cause mortality in PL of prawn (Ravi & Sahul Hameed, 2016).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Routine disinfection procedures followed for crustacean viral disease control are suggested.

2.4.7. General husbandry

MrNV is transmitted both horizontally and vertically in culture systems (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2007a). Good husbandry practices, such as proper disinfection of tanks and water may help to prevent infection. It is recommended to remove insects from freshwater prawn culture systems, especially at larval-rearing centres. Specific pathogen-free (SPF) broodstock and PL can be obtained from disease free populations or by RT-PCR screening and selection of negative broodstock (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

PLs are most suitable for detection of *MrNV*. PL showing clinical signs of disease can be sampled preferentially. Adults and juveniles can be sampled for *MrNV* however prevalence in these lifestages may be lower (see Section 2.3.1).

3.2. Selection of organs or tissues

The tissues most affected in moribund PLs/early juveniles are striated muscles of the abdomen, cephalothorax and tail. The whole PL body is preferred for detection of *MrNV* (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). All organs of adult *M. rosenbergii* except eyestalks and the hepatopancreas, are best for screening the viruses by RT-PCR.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Eyestalks and the hepatopancreas of adult prawns are not suitable (Sri Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.4. Non-lethal sampling

Pleopods (swimming legs) are a convenient source of RNA for non-destructive screening of *MrNV* in adult prawn (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

3.5. Preservation of samples for submission

Infected larvae or PL with prominent signs of whitish muscle in the abdominal region are collected from disease outbreak areas. Samples are washed in sterile saline, transferred to sterile tubes, and transported to the laboratory. For general guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

Moribund or frozen PL samples can be used for isolation of viral pathogens using cell lines (C6/36 mosquito cell line (Sudhakaran *et al.*, 2007b)).

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Infected samples stored at -80°C or samples preserved in 80% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol should be used for RT-PCR for detection of MrNV (Sri Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Yoganandhan *et al.*, 2005).

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

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

Tissue samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation should be fixed immediately after collection in neutral-buffered formalin or modified Davidson's fixative (Sri Widada *et al.*, 2003). 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 5.3. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

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 animals 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 identifying infection 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 life stage.

Ratings against purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against 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, cost, timeliness, and sample throughput. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Most suitable methods – desirable performance and operational characteristics;
++ =	Suitable method(s) acceptable performance and operational characteristics under most circumstances;
+ =	Less suitable methods – performance or operational characteristics may significantly limit application;
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

Level of validation. 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.

WOAH 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). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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						++	++					
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	+++	+++	+++	2				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	2
<i>In-situ</i> hybridisation						++	++	1		++	++	1
Bioassay												
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1				
Ab-ELISA												
Ag-ELISA					++	++	++	1				
Lateral flow assay					++	++	++	2				
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

None to date

4.2. Histopathology and cytopathology

The most affected tissue in infected PL is striated muscle of the cephalothorax, abdomen and tail. Histological features include the presence of acute Zenker's necrosis of striated muscles, characterised by severe hyaline degeneration, necrosis and muscular lysis. Moderate oedema and abnormal open spaces among the affected muscle cells are also observed, as is the presence of large oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies in infected muscles (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

4.3. Cell culture for isolation

MrNV has been isolated in insect cell lines, but is not a recommended method (Sudhakaran *et al.*, 2007b) (Hernandez-Herrera *et al.*, 2007).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods for MrNV and XSV are included in this section for completeness. However, the case definitions in Section 6 are based on detection methods for MrNV only.

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5. *Use of molecular techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances.

4.4.1. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR assay can be performed using the SYBR Green dye based on the method described by Hernandez-Herrera *et al.* (2007) or the TaqMan assay described by Zhang *et al.* (2006).

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'-3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Hernandez-Herrera <i>et al.</i> (2007); GenBank Accession No.: AY222839			
MrNV/RNA1	Fwd: AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG Rev: CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G	500 nM 500 nM	40 cycles of: 95°C/15 sec, 60°C/5 sec and 72°C/10 sec
Method 2: Zhang <i>et al.</i> (2006); GenBank Accession No.: AY231436			
MrNV/RNA1	Fwd: CAA-CTC-GGT-ATG-GAA-CTC-AAG-GT Rev: AGG-AAA-TAC-ACG-AGC-AAG-AAA-AGT-C Probe: FAM-ACC-CTT-CGA-CCC-CAG-CAA-TGG-TG-TAMARA	1000 nM 1000 nM 400 nM	50 cycles of: 94°C/30 sec and 58°C/30 sec
Method 3: Zhang <i>et al.</i> (2006); GenBank Accession No.: DQ174318			
XSV	Fwd: AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA Rev: CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG Probe: FAM-CAT-GCC-CCA-TGA-TCC-TCG-CA-TAMARA	1000 nM 1000 nM 400 nM	50 cycles of: 94°C/30 sec and 58°C/30 sec

4.4.2. Conventional RT-PCR

The protocol for the conventional RT-PCR for detection of *MrNV*/*XSV* developed by Sri Widada *et al.* (2003), Sahul Hameed *et al.* (2004a; 2004b) and Sudhakaran *et al.* (2007a) is recommended. *MrNV* and *XSV* can be detected by conventional RT-PCR separately using a specific set of primers or these two viruses can be detected simultaneously using a single-tube one-step multiplex RT-PCR (Yoganandhan *et al.*, 2005). Conventional Real-time RT-PCR is recommended in situations where high sensitivity is required.

Pathogen / target gene	Primer (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: One step RT-PCR (Sri Widada <i>et al.</i> , 2003; Sahul Hameed <i>et al.</i> , 2004a, b; Sudhakaran <i>et al.</i> , 2007a) GenBank Accession No.: AY222840 (<i>MrNV</i>) and AY247793 (<i>XSV</i>)			
<i>MrNV</i>	Fwd: GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG Rev: AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40sec and 68°C/60 sec
<i>XSV</i>	Fwd: CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA Rev: CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec
Method 2: nested RT-PCR using above-mentioned primers as external primers (Sudhakaran <i>et al.</i> , 2007a)			
<i>MrNV</i>	Internal primers: Fwd: GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT Rev: GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/60 sec, 55°C/60 sec and 72°C/60 sec
<i>XSV</i>	Internal primers: Fwd: ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA Rev: GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/60 sec, 55°C/60 sec and 72°C/60 sec
Method 3: Multiplex RT-PCR (Yoganandhan <i>et al.</i> , 2005) GenBank Accession No.: AY222840 (<i>MrNV</i>) and AY247793 (<i>XSV</i>)			
<i>MrNV</i>	Fwd: GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C Rev: GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec
<i>XSV</i>	Fwd: GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G Rev: CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Haridas *et al.* (2010) have applied loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *MrNV* and *XSV* in the freshwater prawn. A set of four primers, two outer primers and two inner primers, have been designed separately for detection of *MrNV* and *XSV*.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

The presence of *MrNV* in infected cells can be demonstrated in histological sections using a DIG-labelled DNA *in-situ* hybridisation probe specific for *MrNV* (Sri Widada *et al.*, 2003).

4.7. Immunohistochemistry

None developed.

4.8. Bioassay

Not used for diagnostic purposes.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

4.9.1. ELISA

Antibody-based diagnostic methods for *MrNV* include the ELISA described by Romestand & Bonami (2003) or the triple-antibody sandwich (TAS) ELISA based on a monoclonal antibody (Qian *et al.*, 2006).

4.9.2. Lateral flow assay (LFA)

An antibody-based lateral flow assay (LFA) has been developed for the early detection of *MrNV* in the PL stage (Jamalpure *et al.*, 2021).

4.10. Other methods

None

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

Real-time RT-PCR is recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *MrNV*.

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. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 *MrNV* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR
- ii) Positive result by conventional RT-PCR
- iii) Positive result by LAMP

¹ For example transboundary commodities.

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *MrNV* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR result and positive conventional RT-PCR and sequence analysis

6.2 Clinically affected animals

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

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

- i) Clinical signs consistent with infection by *MrNV*
- ii) Histopathology consistent with infection by *MrNV*
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Positive conventional RT-PCR
- v) Positive result by *in situ* hybridisation
- vi) Positive result by LAMP
- vii) Positive result by Ag ELISA
- viii) Positive result by lateral flow assay

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *MrNV* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result for real time RT-PCR and positive result by conventional RT-PCR with sequence analysis
- ii) Positive result by ISH followed by positive result by conventional RT-PCR with sequence analysis
- iii) Positive result by ISH followed by positive result by real-time RT-PCR

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *MrNV* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with *MrNV*, 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 (<i>n</i>)	DSp (<i>n</i>)	Reference test	Citation
RT-PCR	Diagnosis	Clinically affected PL from hatchery and nursery	Whole post-larvae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	100 (<i>n</i> =20)	100 (<i>n</i> =20)	Western blot or ELISA	Sri Widada <i>et al.</i> (2003); Sahul Hameed <i>et al.</i> (2011)
Lateral flow immun assay	Surveillance	PL from prawn hatcheries	Whole post-larvae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	100 (<i>n</i> =80)	90 (<i>n</i> =80)	RT-PCR	Jamalpure <i>et al.</i> (2021)

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study, RT-PCR: = reverse transcription 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, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study, RT-PCR: = reverse transcription polymerase chain reaction.

7. References

- ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
- BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
- FAROOK M.A., SUNDAR RAJ N., MADAN N., VIMAL S., ABDUL MAJEED S., TAJU G., RAJKUMAR T., SANTHOSHKUMAR S., SIVAKUMAR S. & SAHUL HAMEED A.S. (2014). Immunomodulatory effect of recombinant *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid protein (r-MCP) against white tail disease of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture*, **433**, 395–403.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR B., NAIR C.M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.
- HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
- HO K.L., GABRIELSEN M., BEH P.L., KUEH C.L., THONG Q.X. & STREETLEY J. (2018). Structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: a new genus within the nodaviridae? *PLOS Biology*, **16**, e3000038.
- HO K.L., KUEH C.L., BEH P.L., TAN W.S. & BHELLA D. (2017). Cryo-Electron microscopy structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid at 7 angstroms resolution. *Scientific Reports*, **7**, 2083.
- HSIEH C.-Y., WU Z.-B., TUNG M.-C., TU C., LO S.-P., CHANG T.-C., CHANG C.-D., CHEN S.-C., HSIEH Y.-C. & TSAI S.-S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00762.x>
- JAMALPURE S., VIMAL S., NAFEEZ AHMED A., SAHUL HAMEED A.S., PAKNIKAR K.M. & JYTIKA M.R. (2021). On-site detection of nodavirus in post larval (PL) stage of the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: A test to nip the problem in the bud. *Aquaculture*, **534**, 736292; <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736292>
- MURWANTOKO M., ARIF B., ROOSMANTO R & MASASHI K. (2016). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in a giant freshwater prawn hatchery in Indonesia. *Springer Plus*, **5**, 1729.
- NAVEENKUMAR S., SHEKAR M., KARUNASAGAR I. & KARUNAS I. (2013). Genetic analysis of RNA1 and RNA2 of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) isolated from India. *Virus Res.*, **173**, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.003>
- NAVEEN KUMAR S., PRAVEEN R., INDRANI K. & KARUNASAGAR I. (2021). Recombinant viral proteins delivered orally through inactivated bacterial cells induce protection in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) against White Tail Disease. *J. Fish Dis.*, **44**, 601–612.
- OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.
- QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

-
- QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W. LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.
- RAVI N. & SAHUL HAMEED A.S. (2016). Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Aquaculture Res.*, **47**, 1231–1237.
- ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.
- SAEDI T. A., HASSAN M., WEN S. T., KHATIJAH Y., HASSAN M.D., KUA B.C., SOON G.T. & SUBHA B. (2012). Detection and phylogenetic profiling of nodavirus associated with white tail disease in Malaysian *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Mol. Biol. Rep.*, **39**, 5785–5790.
- SAHUL HAMEED A.S. & BONAMI J.R. (2012). White Tail Disease of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Indian J. Virol.*, **23**, 134–140.
- SAHUL HAMEED A.S., RAVI M., FAROOK M.A., TAJU G., HERNANDEZ-HERRERA R.I. & BONAMI J.R. (2011). Screening the post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii* for early detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) by RT-PCR and immunological techniques. *Aquaculture*, **317**, 42–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.022>
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associated small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
- SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.
- SRI WIDADA J., RICHARD V., SHI Z., QIAN D. & BONAMI J.R. (2004). Dot-Blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 83–87.
- SUDHAKARAN R., HARIBABU P., KUMAR S.R., SARATHI M., AHMED V.P., BABU V.S., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145. doi: 10.3354/dao01886.
- SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **30**, 27–35.
- SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) in C6/36 mosquito cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.
- WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H., & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.
- YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.
- YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 65–69.

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease) (please consult the WOA web site: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>) any further information on infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

NB: FIRST ADOPTED IN 2009. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.9
INFECTION WITH
YELLOW HEAD VIRUS GENOTYPE 1

1. Scope

Infection with yellow head virus genotype 1 means infection with the pathogenic agent yellow head virus genotype 1 (YHV1) of the Genus *Okavirus* and Family *Roniviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Yellow head virus genotype 1 (YHV1; species *Yellow head virus*) is one of eight known genotypes in the yellow head complex of viruses and is the only known genotype that causes yellow head disease. YHV1 forms enveloped, rod-shaped particles 40–50 nm × 150–180 nm (Chantanachookin *et al.*, 1993; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Envelopes are studded with prominent peplomers projecting approximately 11 nm from the surface. Nucleocapsids appear as rods (diameter 20–30 nm) and possess a helical symmetry with a periodicity of 5–7 nm. Virions comprise three structural proteins (nucleoprotein p20 and envelope glycoproteins gp64 and gp116) and a ~26 kb positive-sense single-stranded RNA genome. The nucleotide sequence of the ORF1b region of the viral genome has been used to determine the phylogenetic relationships of YHV1 and other yellow head virus genotypes (Dong *et al.*, 2017; Mohr *et al.*, 2015; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

YHV1, yellow head virus genotype 2 (YHV2; species *Gill-associated virus*) and yellow head virus genotype 8 (YHV8; species *Okavirus 1*) have been formally classified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (Walker *et al.*, 2021). Four other genotypes in the complex (YHV3–YHV6) occur commonly in healthy *Penaeus monodon* in East Africa, Asia and Australia and are rarely or never associated with disease (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). Of the remaining two yellow head virus genotypes, YHV7 was detected in diseased *P. monodon* in Australia (Mohr *et al.*, 2015) and YHV8 was detected in *P. chinensis* suspected of suffering from acute hepatopancreatic necrosis disease (Liu *et al.*, 2014). There is evidence of genetic recombination between genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

YHV1, identified by either transmission electron microscopy (TEM) (Nunan *et al.*, 1998), or molecular methods (Durand *et al.*, 2000; McColl *et al.*, 2004), has been detected in frozen commodity prawns with infectivity demonstrated by bioassay.

2.1.3. Survival and stability outside the host

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

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 YHV1 according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), dagger blade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*) 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 infection with YHV1 according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: banana prawn (*Penaeus merguensis*), carpenter prawn (*Palaemon serrifer*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), Pacific blue prawn (*Palaemon styliferus*), red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), Sunda river prawn (*Macrobrachium sintangense*) and yellow shrimp (*Metapenaeus brevicornis*).

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: acorn barnacle (*Chelonibia patula*), blue crab (*Callinectes sapidus*), cyclopoid copepod (*Ergasilus manicatus*), gooseneck barnacle (*Octolasmis muelleri*), Gulf killifish (*Fundulus grandis*) and paste shrimp (*Acetes* sp.).

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

Penaeus monodon are susceptible to YHV1 infection beyond PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Lightner *et al.* (1998) YHV1 challenge caused disease in juveniles of *Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus*, and *P. vannamei* but postlarvae appeared resistant (Lightner *et al.* 1998). YHV1 infections are usually detected only when disease is evident, however infections have been detected in healthy wild populations of *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). Natural YHV1 infections have been detected in *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, and *P. styliferus* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

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

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

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

2.2.6. Vectors

There are no known vectors of YHV1.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In farmed *P. monodon*, YHV disease can cause up to 100% mortality within 3–5 days of the first appearance of clinical signs (Chantanachookin *et al.*, 1993). Mortalities can be induced by experimental exposure of *P. monodon* to YHV1 (Oanh *et al.*, 2011).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Shrimp from late postlarvae (PL) stages onwards can be infected experimentally with YHV1. In cultured shrimp, infection can result in mass mortality occurring, usually in early to late juvenile stages. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax. However, these disease features are not particularly distinctive, and gross signs are not reliable even for preliminary diagnosis of YHV1.

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

2.3.3 Gross pathology

The yellow hepatopancreas of diseased shrimp may be exceptionally soft when compared with the brown hepatopancreas of a healthy shrimp (Chantanachookin *et al.*, 1993).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

YHV1 can be transmitted horizontally by ingestion of infected tissue, immersion in membrane-filtered tissue extracts, or by cohabitation with infected shrimp (Walker & Sittidilokratna, 2008). YHV1 replicates in the cytoplasm of infected cells in which long filamentous pre-nucleocapsids are abundant and virions bud into cytoplasmic vesicles in densely packed paracrystalline arrays for egress at the cytoplasmic membrane (Chantanachookin *et al.*, 1993).

2.3.5. Environmental factors

Elevated virus infection levels accompanied by disease can be precipitated by physiological stress induced by sudden changes in pH or dissolved oxygen levels, or other environmental factors (Flegel *et al.*, 1997).

2.3.6. Geographical distribution

YHV1 has been reported in South-East Asia (Walker *et al.*, 2001). YHV1 has also been detected in *P. stylirostris* and *P. vannamei* in the Americas (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009).

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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 effective commercial anti-viral product is yet available.

2.4.3. Immunostimulation

A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of YHV1 and white spot syndrome virus demonstrated inhibition of the two viruses when administered to shrimp by injection (Chaimongkon *et al.*, 2020)

2.4.4. Breeding resistant strains

Not reported.

2.4.5. Inactivation methods

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

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not reported.

2.4.7. General husbandry

The focus is to exclude YHV1 from entering production systems; for example, by using specific pathogen-free (SPF) stock, batch testing stock and biosecurity measures to reduce entry into culture systems.

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

For diagnosis during a disease outbreak, moribund shrimp collected from pond edges are the preferred source of material for examination. Apparently healthy shrimp should also be collected from the same ponds. For surveillance in populations of apparently healthy shrimp, life stages from PL stage 15 onwards can provide tissue sources useful for testing.

3.2. Selection of organs or tissues

In moribund shrimp suspected to be infected with YHV1, pleopods, gill and lymphoid organ are the most suitable sample tissues. For screening or surveillance of juvenile or adult shrimp that appear grossly normal, pleopods or gills are preferred.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Not determined.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph can be used for non-lethal sampling.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 bioassay

The success of bioassay 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.

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 (absolute) 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 can be frozen at –20°C or below for 1 month or less; for long-term storage, –80°C is recommended.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. 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 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, however, larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

Table 4.1. WOAH 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				
Cell culture												
Real-time RT-PCR												
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						++	++	1				
Bioassay					+	+	+	1				
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 WOAH 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

Fix the cephalothorax tissues of moribund shrimp suspected to be affected by YHV1 in Davidson's fixative, prepare tissue sections and stain with Meyer's haematoxylin and eosin (H&E) using standard histological procedures (Lightner, 1996). Examine tissues of ectodermal and mesodermal origin by light microscopy for the presence of moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions approximately 2 µm in diameter or smaller (Chantanachookin *et al.*, 1993). Tissues of the lymphoid organ, stomach subcuticulum and gills are particularly informative.

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

4.3. Cell culture for isolation

Although primary shrimp cell culture methods are available, they are not recommended to isolate and identify YHV1 as a routine diagnostic method. No continuous cell lines suitable for YHV1 culture are available.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances.

4.4.1. Real-time PCR

Not available.

4.4.2. Conventional RT-PCR

Three RT-PCR protocols are described. For all conventional RT-PCR protocols, assignment to YHV genotype 1 can be achieved by nucleotide sequence analysis of the RT-PCR amplicon. Reference sequences for YHV1 include:

Protocol 1 is a 1-step RT-PCR that can be used to detect YHV1 in affected shrimp. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Wongteerasupaya *et al.* (1997). This protocol will detect YHV1 but not GAV or any of the other genotypes currently recognised.

Protocol 2 is a more sensitive multiplex nested RT-PCR that can be used to differentiate YHV1 from GAV. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Cowley *et al.* (2004). The first stage of the multiplex nested RT-PCR (primary RT-PCR) was designed to detect YHV1 and GAV but has been reported to also detect YHV7 (Mohr *et al.*, 2015). Both the primary RT-PCR and the nested PCR detected the novel YHV genotype from China (People's Rep. of) (Liu *et al.*, 2014). In the second PCR step, a 277 bp product indicates detection of YHV and a 406 bp product indicates detection of GAV. The presence of both 406 bp and 277 bp products indicates a dual infection with GAV and YHV1. The nested PCR can be run as two separate assays specific for YHV1 or GAV by omitting either the G6 or Y3 primer, respectively. **NOTE:** Due to reported problems with primer specificity for some emerging strains, all PCR products generated using protocol 2 should be sequenced to confirm the virus genotype.

Protocol 3 is a multiplex nested RT-PCR protocol that can be used for screening shrimp for any of the seven genotypes of the yellow head complex of viruses. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Wijegoonawardane *et al.* (2008b). Two primers were designed to each site, one accommodating sequence variations

amongst YHV1 isolates and the other variations amongst isolates of the other genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2008b). It is not known whether this assay will detect the YHV genotype recently detected in China (People's Rep. of) (Liu *et al.*, 2014).

Primer sequences

Pathogen / target gene	Primer (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Protocol 1 (Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1997; GenBank Accession No.: ??; amplicon size: 135 bp)			
YHV1 / ORF1b	10F: CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG 144R: AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT	180 nM 180 nM	40 cycles of 94°C for 30sec, 58°C for 45 sec, 68°C for 45 sec,
Protocol 2 (Cowley <i>et al.</i> , 2004; GenBank Accession No.: ??)			
YHV1 and GAV / ORF1b	<p>Primary (Amplicon size: 794 bp)</p> <p>GY1: 5GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG GY4: GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG</p> <p>Nested for detection of YHV1 (Amplicon size: 277 bp)</p> <p>GY2: CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA Y3: ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT</p> <p>Nested for detection of GAV (Amplicon size: 406 bp)</p> <p>GY2: CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA G6: GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT</p>	180 nM 180 nM 360 nM 360 nM 360 nM 360 nM	35 cycles of 95°C for 30 sec, 66°C for 30 sec, and 68 C for 45 sec
Protocol 3 (Wijegoonawardane <i>et al.</i> , 2008b; GenBank Accession No.: ??)			
YHV1 to YHV7 / ORF1b	<p>Primary (amplicon size: 359 bp)</p> <p>YC-F1ab pool: ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC</p> <p>YC-R1ab pool: TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC</p> <p>Nested (amplicon size: 147 bp)</p> <p>YC-F2ab pool: CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA</p> <p>YC-R2ab pool: RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT</p> <p>Mixed base codes: R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).</p>	180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM	35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 68°C for 45 sec, 35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 45 sec;

The primer contains a mismatch for GAV but is specific for YHV1. The mismatch can cause false-positives with GAV in the nested PCR of protocol 2 where GAV generates an amplicon of very similar size to the expected size of the YHV1 amplicon. For GAV, the 7th base from left (T) is substituted for C so that the primer sequence for GAV should be 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', according to the sequence data of the GAV genome (database accession numbers: NC_010306.1 and AF227196.2).

The 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 available.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

The protocol of Tang *et al.* (2002) is suitable for detecting YHV1 or GAV (Tang & Lightner, 1999). To preserve viral RNA accessibility, fix tissues sampled from live shrimp in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RF-fixative) (Hasson *et al.*, 1997). To achieve good tissue preservation whilst also preserving RNA accessibility, normal Davidson's fixative can be used as long as the fixation time is limited to 24 hours (maximum of 48 hours). Detailed methods can be found in Tang *et al.* (2002) YHV-infected cells give a blue to purple-black colour against the brown counter stain. Positive controls of YHV-infected tissue and negative controls of uninfected shrimp tissue should be included. The digoxigenin-labelled DNA probe can be prepared by PCR labelling using the following primers:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'

YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4.7. Immunohistochemistry

Not applicable.

4.8. Bioassay

The bioassay procedure is based on that described by Spann *et al.* (1997), but similar procedures have been described by several other authors (e.g. Lu *et al.*, 1994). The bioassay should be conducted in susceptible shrimp that have been determined to be free from YHV complex viruses.

Suspect YHV1-infected samples should be maintained at 4°C or on ice. If necessary, the whole shrimp or the retained cephalothorax may be snap-frozen and stored at -80°C or in liquid nitrogen until required. Viral inoculum should be prepared as described by Spann *et al.* (1997).

Juvenile shrimp of a known susceptible species are injected with viral inoculum. Negative controls (buffer injected) and positive controls (known YHV1 positive material) treatment groups are required. Shrimp should be maintained separately to prevent cross-contamination between treatments. Observe the shrimp and record mortalities for at least 21 days or until the test and positive control groups reach 100% mortality.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods (ELISA, etc.)

None has been successfully developed.

4.10. Other methods

None at present.

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

Nested RT-PCR (Protocol 3) is recommended for demonstrating freedom from YHV1 in an apparently healthy populations. Sequencing of any amplified PCR products is required to determine the YHV genotype. Two-step PCR negative results are required for YHV1.

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. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 YHV1 shall be suspected if the following criterion is met:

- i) Positive result by a recommended RT-PCR detection test

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with YHV1 is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) A positive result by conventional RT-PCR and identification of YHV1 by sequence analysis of the amplicon

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 YHV1 shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with YHV1 infection
- ii) Histopathology consistent with YHV1 infection
- iii) Positive result by conventional RT-PCR
- iv) Positive result by ISH
- v) Positive result by bioassay

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with YHV1 is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) A positive result from each of two RT-PCR methods targeting non-overlapping parts of the genome followed by sequence analysis of the amplicons to identify YHV1

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with YHV1 are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with YHV1, 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

¹ For example transboundary commodities.

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

7. References

- CASTRO-LONGORIA R., QUINTERO-ARREDONDO N., GRIJALVA-CHON J.M. & RAMOS-PAREDES J. (2008). Detection of the yellow-head virus (YHV) in wild blue shrimp, *Penaeus stylirostris*, from the Gulf of California and its experimental transmission to the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. *J. Fish Dis.*, **31**, 953–956.
- CHAIMONGKON D., ASSAVALAPSAKUL W., PANYIM S. & ATTASART P. (2020). A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of yellow head virus and white spot syndrome virus in shrimp. *J. Biotechnol.*, **321**, 48–56. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.022. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32615142.
- CHANTANACHOOKIN C., BOONYARATPALIN S., KASORNCHANDRA J., DIREKBUSARAKOM S., AEKPANITHANPONG U., SUPAMATTAYA K., SRIURAITANA S. & FLEGEL T.W. (1993). Histology and ultrastructure reveal a new granulosis-like virus in *Penaeus monodon* affected by yellow-head disease. *Dis. Aquat. Org.*, **17**, 145–157.
- COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.018.
- COWLEY J.A., HALL M.R., CADOGAN L.C., SPANN K.M. & WALKER P.J. (2002). Vertical transmission of gill-associated virus (GAV) in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **50**, 95–104.
- DONG X., LIU S., ZHU L., WAN X., LIU Q., QIU L., ZOU P., ZHANG Q. & HUANG J. (2017) Complete genome sequence of an isolate of a novel genotype of yellow head virus from *Fenneropenaeus chinensis* indigenous in China. *Arch Virol* **162**, 1149-1152.
- DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquatic Anim. Health*, **12**, 128–135.
- FLEGEL T.W., BOONYARATPALIN S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1997). Current status of research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture III, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 285–296.
- FLEGEL T.W., FEGAN D.F. & SRIURAITANA S. (1995a). Environmental control of infectious shrimp diseases in Thailand. In: Diseases in Asian Aquaculture II, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 65–79.
- FLEGEL T.W., SRIURAITANA S., WONGTEERASUPAYA C., BOONSAENG V., PANYIM S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (1995b). Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*. In: Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 76–83.

-
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.
- LIGHTNER D.V. (Ed.) (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- LIGHTNER D.V., HASSON K. W., WHITE B. L & REMAN R. M. (1998) Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus *J. Aquatic Anim. Health*, **10**, 271-281
- LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., WANG H.-L., WANG Q.-T., LIU F. & ZHANG Q.-L. (2014) Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709.
- LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.
- LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.
- LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of white spot syndrome virus and yellowhead virus in prawns imported into Australia. *Aust. Vet. J.*, **82**, 69–74.
- MOHR P.G., MOODY N.J.G, HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.St.J. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.
- MOODY N. ET AL (IN PREPARATION). Development of a real-time and conventional PCR assays for the detection of yellow head virus genotype 1.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.
- SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, **17**, 101–112.
- SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.
- TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.
- WALKER P.J., COWLEY J.A. SPANN K.M., HODGSON R.A.J. HALL M.R & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 292–302.
-

Walker P.J. & Sittidilokratna N. (2008). Yellow Head Virus. *In: Encyclopedia of Virology*, third edition. Academic Press, 476–483.
<https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00779-2>

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

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

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

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

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

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with yellow head virus genotype 1
(please consult the WOA web site:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with yellow head virus genotype 1

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS YELLOWHEAD DISEASE. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2019.

CHAPTER 2.4.5.

INFECTION WITH *PERKINSUS MARINUS*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Eastern oyster, *Crassostrea virginica*; Pacific oyster, *C. gigas*; suminoe oyster, *C. ariakensis*; mangrove oyster, *C. rhizophorae*; Cortez oyster, *C. corteziensis* (Andrews 1996; Calvo *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2004; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008); softshell clam, *Mya arenaria*; Baltic macoma, *Macoma balthica* (Dungan *et al.*, 2007).

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Perkinsus marinus* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) are: American cupped oyster (*Crassostrea virginica*), Ariake cupped oyster (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis*), Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*) and palmate oyster (*Saccostrea palmula*).

2.2.2. Susceptible stages of the host Species with incomplete evidence for susceptibility

All stages after settlement are susceptible.

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *P. marinus* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: Gasar cupped oyster (*Crassostrea tulipa*), mangrove cupped oyster (*Crassostrea rhizophorae*), and Pacific cupped oyster (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *gigas*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Columbia black oyster (*Crassostrea columbiensis*), soft shell clam (*Mya arenaria*), and stone oyster (*Striostrea prismatica*).

[...]

Procédure de l'OMSA pour l'enregistrement des kits de diagnostic
Résumé des études de validation

Nom du kit de diagnostic : Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit (Kit de test rapide Innocreate Bioscience WSSV RP)

Fabricant : Innocreate Bioscience Co., Ltd.

Procédure / Numéro d'approbation : 082132

Date d'enregistrement : mai 2023

Maladie : infection par le virus du syndrome des points blancs chez les crevettes

Agent pathogène : Whispovirus, virus du syndrome des points blancs

Type d'épreuve : Test immunochromatographique à flux latéral

Objectif du test :

Le kit de test rapide WSSV RP d'Innocreate Bioscience est un kit de détection qualitative de l'infection par le virus du syndrome des points blancs chez les crevettes. Le dispositif d'immunodosage à flux latéral est conçu pour les objectifs suivants :

1. effectuer un diagnostic de confirmation des cas cliniques sur le terrain (qui comprend la confirmation des suspicions de cas et d'une épreuve de dépistage positive) ;
2. estimer la prévalence de l'infection, de manière à faciliter l'analyse des risques dans les élevages de crevettes de systèmes de production afin d'aider aux pratiques de gestion (le kit ne doit pas être utilisé pour estimer la prévalence chez les reproducteurs ou les crevettes post-larvaires dans le cadre d'une analyse des risques avant le transfert vers d'autres élevages ou un déplacement transfrontalier).
3. être utilisé en conjonction avec d'autres tests ou procédures de diagnostic comme aide au diagnostic ou pour d'autres évaluations cliniques ou épidémiologiques.

Espèces et échantillons : 2 ou 3 petits fragments de branchie de crevette.

1. Informations relatives au kit

Veuillez-vous référer à la notice du kit qui est disponible sur la page web du registre de l'OMSA ou contacter le fabricant sur le site web ou à l'adresse suivante :

Site web : <https://www.innocreatebio.com/>

Courriel : info@innocreatebio.com

2. Résumé des études de validation

Spécificité analytique

Conclusion :

Des crevettes infectées par le *Vibrio parahaemolyticus* responsable de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse, Infection à *Enterocytozoon hepatopenaei*, le baculovirus Monodon, le virus de la tête jaune et le virus du syndrome de Taura ont été testées. Les résultats de tous les échantillons infectés ont été négatifs.

Sensibilité analytique

Conclusion :

Une dilution en série de la protéine cible recombinante du virus du syndrome des points blancs avec des tissus homogénéisés de crevettes a été utilisée afin d'évaluer la limite de détection. Ladite limite a été estimée à 0,4 ng / test.

Répétabilité

Conclusion :

La répétabilité intra-série a été évaluée en utilisant six échantillons en quatre exemplaires, présentant différents niveaux d'infection, qui ont été testés par le même opérateur lors de cinq jours différents. La répétabilité inter-séries a été évaluée en procédant à une analyse des six échantillons, effectuée par trois opérateurs différents utilisant trois lots différents de kits, sur cinq jours. Les résultats des épreuves intra et inter-séries se sont révélés reproductibles avec des valeurs du coefficient kappa de 1,0.

Caractéristiques diagnostiques

Détermination du seuil et estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD) :

Détermination du seuil :

Le kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience est un test immunochromatographique conçu pour la détection qualitative de l'infection par le virus du syndrome des points blancs chez les crevettes. Une bande rose violet doit être observée à la fois au niveau de la ligne de test (T) et de la ligne de contrôle (C) pour révéler que la crevette était infectée par le virus du syndrome des points blancs. Si la bande rose violet n'apparaît que sur la ligne de contrôle (C), ce résultat indique qu'il n'y a pas d'infection par le virus du syndrome des points blancs ou que l'infection est légère et en deçà du seuil de sensibilité du kit. Le seuil est déterminé d'après la sensibilité analytique comme étant de 0,4 ng de la protéine cible.

Estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD) :

1. Estimations de la sensibilité diagnostique et de la spécificité diagnostique - avec des animaux de référence donnés

Deux cent cinquante-deux crevettes indemnes d'agents pathogènes spécifiques ont été soit utilisées comme témoins négatifs (n=105), soit soumises à un test de provocation (n=147) consistant en une injection de 100 µl d'hémolymphe infectée par le virus du syndrome des points blancs, afin de déterminer la sensibilité diagnostique et la spécificité diagnostique pour des échantillons prélevés chez des animaux de référence donnés. Sur les 147 échantillons prélevés chez les animaux soumis à l'épreuve de provocation et positifs avec

la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Durand & Lightner, 2002), les résultats avec le kit de test rapide WSSV RP ont été positifs pour 125 échantillons, tandis que 22 échantillons ont constitué des faux négatifs. Le niveau d'infection de ces 22 échantillons a été considéré comme très léger (nombre de cycle - Ct > 32,5). Parmi les 105 échantillons provenant des animaux témoins n'ayant pas été soumis à un test de provocation et négatifs avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan, aucun résultat faux positif n'a été observé.

Animal de référence :

Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit		Espèce cible / Échantillon : branchie	
		Méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan®	
		Ct < 32,5 est considéré comme positif	Ct < 40 est considéré comme positif
Sensibilité diagnostique	N	(126)	(147)
	SeD	(99,21 %)	(85,03 %)
	IC	(99,66 % - 99,98 %)	(78,22 % - 90,38 %)
Spécificité diagnostique	N	(105)	(105)
	SpD	(100 %)	(100 %)
	IC	(96,55-100 %)	(96,55-100 %)

2. Estimations de la sensibilité diagnostique et de la spécificité diagnostique – avec des crevettes de production :

Un total de 465 crevettes issues de 4 lots de systèmes de production a été testé, dont 45 des 465 crevettes ont été classées comme symptomatiques, et 64 des 465 crevettes ont été classées comme positives (Ct < 40) lors du dépistage par qPCR avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Durand & Lightner, 2002).

Par rapport à la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan, la SeD globale du test rapide WSSV RP a été de 92,50 % lorsqu'un Ct < 32,50 était considéré comme positif, de 84,00 % lorsqu'un Ct < 36 était considéré comme positif, ou de 65,62 % lorsqu'un Ct < 40 était considéré comme positif ; la SpD a été de 100 %.

S'agissant de la performance diagnostique chez les crevettes symptomatiques élevées dans des systèmes de production, la SeD a été de 93,33 %, et la SpD de 100 % lorsqu'un Ct < 40 était retenu comme seuil. La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) ont été de 100 % et 99,3 %. Dans le cas des échantillons pour lesquels le Ct était inférieur à 32,5 (infection modérée à élevée, ≥ 100 copies), la SeD a été de 92,50 %. La concordance globale entre le kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience et le diagnostic est élevée.

Crevettes de production :

		Espèce cible / Échantillon : branchie	
		Méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan	

Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit		Symptomatique	Ct < 32,5 est considéré comme positif	Ct < 36 est considéré comme positif	Ct < 40 est considéré comme positif
Sensibilité diagnostique	N	(45)	(40)	(50)	(64)
	SeD	(93,33 %)	(92,50 %)	(84,00 %)	(65,62 %)
	IC	(95,66 %-99,98 %)	(79,61 %-98,43 %)	(95,66 %-99,98 %)	(52,70 %-77,05 %)
Spécificité diagnostique	N	(420)	(425)	(415)	(401)
	SpD	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)
	IC	(99,13 %-100 %)	(99,14 %-100 %)	(70,89 %-92,83 %)	(99,08 %-100 %)

Conclusion :

Le kit de test rapide WSSV RP est apte à l'emploi pour lequel il est prévu, et démontre une sensibilité globale élevée pour l'identification des niveaux modérés et élevés de l'infection par le virus du syndrome des points blancs, ou lorsqu'il est employé pour des échantillons provenant de crevettes manifestant des signes cliniques, et ce test présente une spécificité très élevée. Les VPP et VPN élevées du test et le court délai de réalisation (15-30 minutes sur place vs plus de 4 heures auxquelles s'ajoute le délai d'expédition) en font un outil robuste pour l'identification des foyers potentiels.

Nous recommandons aux utilisateurs de mettre le test en œuvre chez les crevettes qui présentent des modifications du comportement (léthargie, diminution ou absence de consommation d'aliments pour animaux, et comportements natatoires anormaux tels qu'une nage lente, sur le côté, près de la surface de l'eau, ou des regroupements autour des bords des unités d'élevage), soit sur une base régulière, soit lors d'un stress environnemental, tel que des modifications rapides de la salinité, ou lors de suspicion d'un foyer d'infection par le virus du syndrome des points blancs.

Reproductibilité

Reproductibilité analytique

Conclusion :

Deux laboratoires ont procédé à l'évaluation de la reproductibilité analytique. Six échantillons dans lesquels les niveaux d'infection étaient variés (deux avec une infection légère, deux avec une infection modérée, un avec une infection forte et un indemne d'infection), comme établis avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Durand & Lightner, 2002), ont été sélectionnés et soumis « en aveugle » aux deux laboratoires. Les tests ont été répétés à quatre reprises et une valeur du coefficient Kappa a été calculée à partir des résultats de l'ensemble des 24 tests. Pour l'ensemble des tests, aucune erreur de classification n'a été observée (20 résultats positifs et 4 résultats négatifs) La concordance entre les deux méthodes était de 100 %, et le coefficient Kappa de 1,0.

Reproductibilité diagnostique

Cinq laboratoires de Taïwan et de Thaïlande, comprenant un laboratoire de référence de l'OMSA, ont procédé à l'évaluation de la reproductibilité diagnostique. Le panel de tests était constitué de 25 échantillons pour lesquels les niveaux d'infection virale étaient variés, comprenant 5 échantillons dont les caractéristiques étaient connues (3 positifs avec des concentrations de protéines cibles de 1,6 ; 0,8 ou 0,4 ng et 2 négatifs) et 20 échantillons inconnus, traités « à l'aveugle ». Les laboratoires impliqués ont suivi les procédures décrites dans le manuel d'instructions du kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience.

Conclusion :

Les échantillons ont été analysés par chacun des cinq laboratoires en utilisant le kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience. Les résultats montrent que la reproductibilité est élevée. La concordance observée dans les cinq laboratoires a été de 100 % pour les cinq échantillons dont les caractéristiques étaient connues. Quatre des cinq laboratoires ont obtenu une concordance de 100 % pour tous les échantillons analysés « à l'aveugle », tandis que les résultats du cinquième laboratoire présentaient une légère divergence pour un échantillon. Un test du khi-deux d'homogénéité a été effectué afin d'analyser les résultats expérimentaux des cinq laboratoires. La valeur p du test du khi-deux d'indépendance est de 0,998 (Hsu *et al.*, 2022).

Références

Durand, S., & Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25(7), 381-389.

Hsu, J. C.-K., Hsu, T.-K., Kannan, J., Wang, H.-C., Tassanakajon, A., & Chen, L.-L. (2022). Diagnostic performance of a Rapid Test Kit for white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 558, 738379.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738379>

Annexe 3. Point 5. – Plan de travail et priorités

PLAN DE TRAVAIL DE LA COMMISSION DES ANIMAUX AQUATIQUES

(y compris le calendrier prévisionnel pour le recueil des commentaires et pour adoption)

Chapitre/Sujet	Code aquatique				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Suivi des maladies émergentes et examen des actions à prendre	En cours				
Définitions du Glossaire : Autorité compétente, Autorité vétérinaire et Services chargés de la santé des animaux aquatiques	Examen de l'usage dans le Code aquatique et présentation des amendements pour commentaire		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 1.3. Maladies listées par l'OMSA – Inclusion de l'infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique dans	Examen des commentaires des Membres (premier cycle de consultation)		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
la Liste des maladies de l'OMSA					
Procédures officielles pour l'auto-déclaration de statut indemne	Rédaction d'un modèle d'auto-déclaration afin d'accompagner les Membres lors de la soumission de leurs auto-déclarations	Mise en ligne sur le site web de l'OMSA avant la Session générale			
Article 1.1.5. du chapitre 1.1. Notification des maladies et communication des informations épidémiologique	Révision et amendement de l'article 1.1.5. et soumission pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 4.3. Application de la compartimentation	Examen des réponses des Membres au questionnaire et lancement du travail sur le projet de document de discussion		Soumission du document de discussion pour avis	Examen des réponses fournies au sujet du document de discussion	
Chapitre 4.X. Nouveau projet de chapitre sur la préparation aux situations d'urgence	Poursuite des travaux sur le projet de chapitre 4.X.		Soumission du projet pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 4.Y. Nouveau projet de chapitre sur la gestion des foyers de maladie	Poursuite des travaux sur le projet de chapitre 4.Y.		Soumission du projet de chapitre pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitres 5.6. – 5.9.	Examen du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> rattaché à la Commission du Code		Examen du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> rattaché à la Commission du Code		
Chapitre 5.X. Commerce d'animaux aquatiques d'ornement	Révision d'une ébauche de projet de chapitre		Soumission du projet de chapitre pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 5.Y. Commerce de matériels génétiques	Révision d'une ébauche de projet de chapitre		Soumission du projet de chapitre pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
<u>Chapitre 6.2. Principes d'usage prudent et responsable des agents antimicrobiens chez les animaux aquatiques</u>	Mise à disposition d'un rapport de suivi par la Commission du Code sur la révision en cours du chapitre 6.10. du <i>Code terrestre</i>		Rapport de suivi remis par la Commission du Code sur la révision en cours du chapitre 6.10. du <i>Code terrestre</i>	Rapport de suivi remis par la Commission du Code sur la révision en cours du chapitre 6.10. du <i>Code terrestre</i>	
Espèces sensibles Évaluation de nouvelles espèces ou de nouveaux éléments probants portant sur des maladies précédemment évaluées si besoin	En cours				
Marchandises dénuées de risques – chapitres spécifiques aux maladies Articles 8.X.3.– Amphibiens Articles 9.X.3.– Crustacés Articles 10.X.3.– Poissons Articles 10.X.3.– Mollusques	Amphibien : Revue des commentaires des Membres (premier cycle de consultation), et amendement des articles en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
	Crustacé : articles modifiés en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques et soumission pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
	Poissons : articles modifiés en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques et soumission pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
	Mollusques : Revue des commentaires		Examen des commentaires (deuxième	Examen des commentaires (troisième	Projet de texte proposé à l'adoption

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
	des Membres (premier cycle de consultation), et amendement des articles en fonction de l'évaluation des marchandises dénuées de risques		cycle de consultation)	cycle de consultation)	
Évaluation des périodes établies par défaut dans les articles X.X.4. – X.X.8. des chapitres spécifiques aux maladies			Soumission de l'évaluation des périodes établies par défaut pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Espèces sensibles – Maladies des crustacés – Articles 9.X.1. et 9.X.2. pour : <ul style="list-style-type: none"> – l'infection par le virus iridescent des décapodes – l'infection par le virus du syndrome des points blancs – l'infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse) – l'examen de nouveaux éléments probants portant sur des maladies précédemment évaluées 	Nouvelle convocation d'un Groupe <i>ad hoc</i> et tenue de la prochaine réunion en mars 2023		Infection par le virus iridescent des décapodes : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
				Infection par le virus du syndrome des points blancs : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	
Article 9.3.1. du chapitre 9.3. Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Article 9.5.2. du chapitre 9.5. Infection par le virus de la myonécrose infectieuse	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Espèces sensibles – Maladies des poissons – Articles 10.X.1. et 10.X.2. pour : – l’infection par l’iridovirus de la daurade japonaise – l’infection par le virus du tilapia lacustre – l’infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (syndrome ulcératif épizootique)	Infection par l’iridovirus de la daurade japonaise : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i>				
	Infection par le virus du tilapia lacustre : tenue de la prochaine réunion du Groupe <i>ad hoc</i> en avril 2023		Infection par le virus du tilapia lacustre : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption
				Syndrome ulcératif épizootique : revue du rapport d’étape du Groupe <i>ad hoc</i>	
Article 10.9.2. du chapitre 10.9. Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			
Chapitre 10.X. Infection par le virus du tilapia lacustre	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			
Espèces sensibles – Maladies des mollusques – Articles 11X.1. et 11X.2. pour : – l’infection à <i>Marteilia refringens</i> – l’infection à <i>Perkinsus marinus</i> – l’infection à <i>Xenohaliotis californiensis</i> – l’infection à <i>Perkinsus olseni</i>	<i>Marteilia refringens</i> : examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption			
	<i>Perkinsus marinus</i> : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis		Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l’adoption
			<i>Perkinsus olseni</i> : revue du rapport d’étape du Groupe <i>ad hoc</i>	<i>Perkinsus olseni</i> : revue du rapport du Groupe <i>ad hoc</i> et soumission des articles amendés pour avis	

Code aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Espèces sensibles – Article 11.2.2. du chapitre 11.2. Infection à <i>Bonamia exitiosa</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Espèces sensibles – Article 11.3.2. du chapitre 11.3. Infection à <i>Bonamia ostrea</i> »	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Modèles d'articles 11.X.9. – 11.X.14. : harmonisation avec d'autres chapitres spécifiques aux maladies	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			

Manual aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
Section 2.2.0. Dispositions générales – Crustacés	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 2.1.1. Maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.2. Infection à <i>Aphanomyces astaci</i> (peste de l'écrevisse)	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)		Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption
Chapitre 2.2.3. Infection à <i>Hepatobacter penaei</i> (hépatopancréatite nécrosante)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.4. Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuses	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.5. Infection par le virus de la myonécrose infectieuse	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.6. Infection par le nodavirus de <i>Macrobrachium</i>	Examen de la version réactualisée du		Examen des commentaires (premier cycle	Examen des commentaires (deuxième	Projet de texte proposé à l'adoption

Manual aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
rosenbergii (maladie des queues blanches)	projet de texte et soumission pour commentaire		de consultation)	cycle de consultation)	
Chapitre 2.2.7. Infection par le virus du syndrome de Taura	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.8. Infection par le virus du syndrome des points blancs	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.2.X. Infection par le virus 1 iridescent des décapodes			Examen de la version réactualisée du projet de texte et soumission pour commentaire	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 2.3.1. Infection à <i>Aphanomyces invadans</i> (syndrome ulcératif épizootique)	Examen des commentaires (deuxième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.3.2. Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique	Examen des commentaires (troisième cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Sections 2.2.2. du chapitre 2.3.9. Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.3.X. Infection par le virus du tilapia lacustre			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 2.4.0. Informations générales			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Chapitre 2.4.1. Infection par l'herpesvirus de l'orveau			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	

Manual aquatique					
Chapitre/Sujet	Status				
	Février 2023	Session générale de mai 2023	Septembre 2023	Février 2024	Session générale de mai 2023
			soumission aux Membres pour avis		
Sections 2.2.1. et 2.2.2. du chapitre 2.4.4. Infection à <i>Marteilia refringens</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Section 2.2.2. du chapitre 2.4.2. Infection à <i>Bonamia exitiosa</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.4.3. Infection à <i>Bonamia ostreae</i>			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	
Section 2.2.2. du chapitre 2.4.2. Infection à <i>Bonamia ostreae</i>	Examen des commentaires (premier cycle de consultation)	Projet de texte proposé à l'adoption			
Chapitre 2.4.7. Infection à <i>Xenohalictis californiensis</i>			Revue de la version actualisée du projet de chapitre et soumission aux Membres pour avis		

CHAPITRE 9.3.

INFECTION À *HEPATOBACTER PENA EI* (HEPATOPANCRÉATITE
NÉCROTISANTE)

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*~~ *Hepatobacter penaei* ; appartenant à la famille des Holosporaceae et à l'ordre des Rickettsiales 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*.

[...]

Annexe 5. Point 7.2. – Articles 9.4.1. et 9.4.2. du chapitre 9.4. Infection par le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique infectieuse

CHAPITRE 9.4.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HYPODERMIQUE ET HÉMATOPOÏÉTIQUE INFECTIEUSE

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 penstyldensovirus penstylhamaparvovirus 1 des décapodes, ~~couramment désigné comme le virus de la nécrose hypodermique et hématopoïétique~~ ; il s'agit d'un *agent pathogène* appartenant au genre *Penstyldensovirus* 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*) et la crevettes à pattes jaunes (*Penaeus californiensis*).

[...]

CHAPITRE 9.5.
INFECTION PAR LE VIRUS
DE LA MYONÉCROSE INFECTIEUSE

[...]

Article 9.5.2.

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 tigrée brune (*Penaeus esculentus*)~~, la crevette ~~banana~~ banane (*Penaeus merguensis*), ~~la crevette tigrée sombre (*Penaeus esculentus*)~~ et la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*).

[...]

CHAPITRE 10.9.
INFECTION PAR LE VIRUS
DE LA VIRÉMIE PRINTANIÈRE DE LA CARPE

[...]

Article 10.9.2.

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. :

Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Bbrème (= brème d'eau douce)
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Ecarpe à grosse tête
	<i>Carassius auratus</i>	Ccyprin doré (= poisson rouge; = carpe dorée)
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Ecarpe herbivore (= carpe chinoise; = carpe de roseau)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Ecarpe commune (toutes les variétés et sous-espèces)
	<i>Danio rerio</i>	Ppoisson zèbre
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Ggolden shiner]
	<i>Pimephales promelas</i>	Htête de boule-Vairon à grosse tête (=méné à grosse tête du Nord ; = vairon à grosse tête)
	<i>Percocypris pingi</i>	[Jinsha barbel bass carp]
	<i>Rutilus kutum</i>	[Caspian white fish]
	<i>Rutilus rutilus</i>	Ggardon
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Ssilure glane

[...]

Annexe 8. Point 7.5. – Chapitre 10.X. Infection par le virus du tilapia lacustre

CHAPITRE 10.X.

INFECTION PAR LE VIRUS DU TILAPIA LACUSTRE

Article 10.X.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection par le virus du tilapia lacustre » désigne une *infection* causée par *Tilapia tilapiaevirus*. Il s'agit d'un *agent pathogène* appartenant au genre *Tilapiaevirus* et à la famille des *Amnoonviridae*.

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

Article 10.X.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. : [*Oreochromis aureus*, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*, *Sarotherodon galilaeus*, Tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*), *Oreochromis niloticus*, *Tilapia zilli*, *Barbonymus schwanenfeldii*, *Tristramella simonis* et *Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*] (à l'étude).

Article 10.X.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 le virus du tilapia lacustre

Les *produits issus d'animaux aquatiques* ~~suivants 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 au virus du tilapia lacustre, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre :

- 1) ~~{~~ *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 5660°C pendant au moins ~~une~~ 120 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du tilapia lacustre ;
- 2) *farine* de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 5660°C pendant au moins ~~une~~ 120 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du tilapia lacustre ; ~~(à l'étude)~~
- 3) huile de poisson ;
- 4) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

Article 10.X.4.

Exigences pour l'auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre

Un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour l'intégralité du pays, une *zone* ou un *compartiment* conformément aux dispositions des articles 10.X.5. à 10.X.8., le cas échéant. L'auto-déclaration

d'absence de maladie doit également être déposée conformément aux autres exigences pertinentes du *Code aquatique*, qui prévoient entre autres que l'État membre satisfasse aux conditions suivantes :

- 1) il respecte les dispositions du chapitre 3.1., et
- 2) il utilise des méthodes de *diagnostic* appropriées, telles que recommandées dans le *Manuel aquatique*, et
- 3) il répond à toutes les exigences mentionnées dans le chapitre 1.4. qui sont pertinentes pour l'auto-déclaration d'absence de maladie.

Article 10.X.5.

Pays indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

En cas de partage des étendues d'eau avec d'autres pays, un pays ne peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre que si toutes les étendues d'eau partagées sont situées dans des pays ou des zones déclarés indemnes de cette *infection* (voir l'article 10.X.6.).

Comme indiqué à l'article 1.4.4., un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour l'ensemble de son *territoire* s'il peut démontrer :

- 1) qu'aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 10.X.2. n'est présente dans le pays et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* sont réunies sans discontinuer depuis au moins [six mois] ;

OU

- 2) qu'aucune infection par le virus du tilapia lacustre n'est apparue depuis au moins [10] ans, et :
 - a) que l'État membre peut démontrer que les conditions propices à l'expression clinique de l'infection par le virus du tilapia lacustre sont réunies, comme indiqué au chapitre correspondant du *Manuel aquatique*, et
 - b) que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* telles que décrites dans le chapitre 1.4. sont réunies sans discontinuer depuis au moins [10] ans ;

OU

- 3) qu'une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre depuis au moins [deux] ans sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* ont été réunies sans discontinuer et mises en œuvre au moins [un] an avant le commencement de la *surveillance ciblée* ;

OU

- 4) que le pays, après avoir déposé une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du tilapia lacustre, mais que les conditions suivantes sont remplies :
 - a) dès la détection du virus du tilapia lacustre, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
 - b) les populations touchées par l'*infection* de la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité de nouvelle transmission du virus du tilapia lacustre, et les opérations appropriées de *désinfection* (décrites au chapitre 4.4.) ont été menées à bien et suivies d'une période de *vide sanitaire* comme indiqué au chapitre 4.7., et
 - c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du tilapia lacustre, et
-

-
- d) une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est exercée :
- i) depuis au moins [deux] ans sur les *espèces sensibles* d'élevage et sauvages sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, ou
 - ii) depuis au moins [un] an sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée dans le cas où les *établissements d'aquaculture* touchés ne présentent aucun lien épidémiologique avec des populations sauvages d'*espèces sensibles*.

Entre-temps, la partie du pays située en dehors de la zone infectée et des zones de protection tout ou partie du pays, à l'exclusion des zones infectées et des zones de protection, peut être déclarée zone indemne conformément à l'article 1.4.4. pour autant que les points 4 a) à 4 c) se soient concrétisés. sous réserves que les conditions énoncées au point 2 de l'article 10.X.6. soient remplies.

Article 10.X.6.

Zone indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

En cas d'extension au-delà du *territoire* de plus d'un pays, une *zone* ne peut être déclarée indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre que si l'ensemble des *Autorités compétentes* concernées confirment que toutes les conditions voulues sont remplies.

Comme indiqué dans l'article 1.4.4., un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour une *zone* établie sur son *territoire* s'il peut démontrer :

- 1) qu'aucune des *espèces sensibles* visées à l'article 10.X.2. n'est présente et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* sont réunies sans discontinuer depuis au moins [six mois] ;

OU

- 2) qu'aucune infection par le virus du tilapia lacustre n'est apparue depuis au moins [dix] ans, et :
 - a) que l'État membre peut démontrer que les conditions propices à l'expression clinique de l'infection par le virus du tilapia lacustre sont réunies, comme décrit à l'article 1.4.8. du chapitre 1.4., et
 - b) que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* telles que décrites dans le chapitre 1.4. sont réunies sans discontinuer dans la *zone* depuis au moins [dix] ans ;

OU

- 3) qu'une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre dans la *zone* depuis au moins [deux] ans sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* ont été réunies sans discontinuer et mises en œuvre au moins [un] an avant le commencement de la *surveillance ciblée* ;

OU

- 4) que le pays, après avoir déposé une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour une *zone*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du tilapia lacustre dans cette *zone*, mais que les conditions suivantes sont remplies :
 - a) dès la détection du virus du tilapia lacustre, le secteur touché a été déclaré *zone infectée* et une *zone de protection* a été établie, et
 - b) les populations touchées par l'*infection* de la *zone infectée* ont été abattues et éliminées par des moyens réduisant autant que possible la probabilité de nouvelle transmission du virus du tilapia lacustre, et les opérations appropriées de *désinfection* (décrites au chapitre 4.4.) ont été menées à bien et suivies d'une période de *vide sanitaire* comme indiqué au chapitre 4.7., et

-
- c) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis l'éradication de l'infection par le virus du tilapia lacustre, et
 - d) une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre depuis au moins [deux] ans sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée.

Entre-temps, une partie de la zone située en dehors de la zone infectée et des zones de protection peut être déclarée comme une nouvelle zone indemne conformément à l'article 1.4.4., pour autant que les points 4 a) à 4 c) se soient concrétisés.

Article 10.X.7.

Compartiment indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Comme indiqué dans l'article 1.4.4., un État membre peut déposer une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour un *compartiment* établi sur son *territoire* s'il peut démontrer :

- 1) qu'une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre dans le *compartiment* depuis au moins [un] an sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée, et que les *conditions élémentaires de sécurité biologique* ont été réunies sans discontinuer et mises en œuvre au moins [un] an avant le commencement de la *surveillance ciblée* ;

OU

- 2) que le pays, après avoir déposé une auto-déclaration d'absence d'infection par le virus du tilapia lacustre pour un *compartiment*, a perdu son statut indemne par suite de la détection du virus du tilapia lacustre dans ce *compartiment*, mais que les conditions suivantes sont remplies :

- a) tous les *animaux aquatiques* détenus dans le *compartiment* ont été abattus et éliminés par des moyens réduisant autant que possible la probabilité de nouvelle transmission du virus du tilapia lacustre, les opérations de *désinfection* appropriées (décrites au chapitre 4.4.) ont été menées à bien, et un *vide sanitaire* a été mis en place dans le *compartiment* comme indiqué au chapitre 4.7., et
- b) les *conditions élémentaires de sécurité biologique* existant antérieurement, incluant le *plan de sécurité biologique* applicable au *compartiment*, ont été réexaminées, et sont en place sans discontinuer, avec les modifications éventuellement nécessaires, depuis le repeuplement avec des *animaux aquatiques* issus d'une source agréée indemne d'agents pathogènes, dans le respect des exigences mentionnées dans l'article 10.X.9. ou dans l'article 10.X.10. selon le cas, et
- c) une *surveillance ciblée*, comme décrit au chapitre 1.4., est mise en œuvre dans le *compartiment* depuis au moins [un] an une étude concernant l'infection par le virus du tilapia lacustre a été réalisée au moins [six mois] après le repeuplement (comme décrit à l'article 1.4.14.) sans que la présence du virus du tilapia lacustre ait été décelée.

Article 10.X.8.

Maintien du statut indemne

Un pays, une *zone* ou un *compartiment* qui est déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre conformément aux dispositions prévues aux articles 10.X.4. à 10.X.7. (selon le cas) peut conserver son statut indemne au regard de cette *infection* sous réserve que les exigences mentionnées à l'article 1.4.15. soient constamment respectées.

Article 10.X.9.

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

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., ou de *produits issus d'animaux aquatiques* dérivés de ces espèces, à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* déclaré indemne d'infection par le virus du

tilapia lacustre, l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur. Le *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* ou des *produits issus d'animaux aquatiques* est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre sur la base des procédures définies par les articles 10.X.5., 10.X.6. ou 10.X.7. (selon le cas) et 10.X.8.

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

Le présent article ne s'applique pas aux *produits issus d'animaux aquatiques visés énumérés* à l'article 10.X.3.

Article 10.X.10.

Importation d'animaux aquatiques à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2. à des fins d'*aquaculture* à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures d'atténuation du *risque* prévues aux points 1 et 2 ci-dessous.

- 1) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et
 - b) avant leur départ de *quarantaine* (qu'il s'agisse de l'installation d'origine ou d'une autre installation de *quarantaine* jusqu'à laquelle les animaux ont été transportés dans des conditions de *sécurité biologique* adéquates), la mise à mort et la transformation des *animaux aquatiques* en l'un ou plusieurs des *produits issus d'animaux aquatiques* visés à l'article 10.X.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
 - c) le traitement de toute l'eau utilisée pour le transport ainsi que de tous les équipements, effluents et déchets afin d'inactiver le virus du tilapia lacustre conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5.

OU

- 2) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'*aquaculture*, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) dans le pays exportateur :
 - i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des *animaux aquatiques* qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'*animaux aquatiques* présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre ;
 - b) dans le pays importateur :
 - i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de *quarantaine* ;
 - ii) tester la population F-0 aux fins de la recherche du virus du tilapia lacustre conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en *quarantaine* ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de *quarantaine* pendant une durée suffisante, et dans des conditions propices, pour permettre l'expression clinique de l'infection par le virus du tilapia lacustre, et prélever des

échantillons et tester la présence du virus du tilapia lacustre chez cette population conformément au chapitre 1.4. du *Code aquatique* et au chapitre X.X.6. du *Manuel aquatique* ;

- v) si le virus du tilapia lacustre n'est pas détecté dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre et libérée de sa *quarantaine* ;
- vi) si le virus du tilapia lacustre est détecté dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine*, et sera tuée puis éliminée de manière biosécurisée, conformément au chapitre 4.8.

Article 10.X.11.

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

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., ou de *produits issus d'animaux aquatiques* dérivés de ces espèces, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou d'entreposage jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits visés à l'article 10.X.3. ou au point 1 de l'article 10.X.14. ou en ~~l'un des~~ autres produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, *conteneurs* et matériaux d'emballage utilisés lors du transport ~~en vue d'assurer l'inactivation dans des conditions permettant d'inactiver~~ le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

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

Article 10.X.12.

Importation d'animaux aquatiques ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, ~~et~~ les usages agricoles, industriels, ~~ou~~ pharmaceutiques ~~ou~~ ~~de~~ la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., ou de *produits issus d'animaux aquatiques* dérivés de ces espèces, destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, ~~et~~ les usages agricoles, industriels, ~~ou~~ pharmaceutiques ~~ou~~ ~~de~~ la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien, dans des installations de *quarantaine* ou d'entreposage jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits visés à l'article 10.X.3. ou en l'un des produits autorisés par l'*Autorité compétente*, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, *conteneurs* et matériaux d'emballage utilisés lors du transport ~~en vue d'assurer l'inactivation dans des conditions permettant d'inactiver~~ le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

Article 10.X.13.

Importation d'animaux aquatiques destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2. qui sont destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit veiller :

- 1) à la livraison directe du chargement, ainsi qu'à son maintien, dans des installations de *quarantaine* agréées par l'*Autorité compétente*, et
- 2) au traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, *conteneurs* et matériaux d'emballage utilisés lors du transport ~~en vue d'assurer l'inactivation dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et~~
- 3) au traitement de tous les effluents et déchets issus des installations de *quarantaine* des laboratoires ou des établissements zoologiques dans des conditions permettant d'inactiver le virus du tilapia lacustre ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8., et
- 4) à l'élimination des cadavres conformément au chapitre 4.8.

Article 10.X.14.

Importation ou transit par le territoire de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, indépendamment du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre

- 1) [Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus du tilapia lacustre, les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée au virus du tilapia lacustre quand elles autorisent l'importation (ou le transit par leur territoire) des ~~marchandises~~ produits issus d'animaux aquatiques suivants qui ont été ~~préparés~~ préparés et ~~emballés~~ emballés pour la vente au détail lorsqu'~~elles~~ ils satisfont aux dispositions prévues à l'article 5.4.2. :

- a) filets ou de darnes ou pavés de poisson (à l'état réfrigéré)] (à l'étude).

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

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

- 2) Lors d'une importation de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., à l'exclusion de ceux visés au point 1 qui précède, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par le virus du tilapia lacustre, l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation et appliquer des mesures appropriées visant à atténuer ce *risque*.

CHAPITRE 11.2.
INFECTION À *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

Article 11.2.2.

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. : l'huître argentine (*Ostrea puelchana*), *Magallana* [syn. *Crassostrea*] *ariakensis*, l'huître plate australienne (*Ostrea angasi*), l'huître plate chilienne (*Ostrea chilensis*), *Ostrea equestris*, l'huître creuse américaine (*Crassostrea virginica*), l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), et l'huître plate indigène (*Ostrea lurida*). et l'huître creuse de Suminoe (*Magallana* [syn. *Crassostrea*] *ariakensis*).

[...]

CHAPITRE 11.3.
INFECTION À *BONAMIA OSTREAE*

[...]

Article 11.3.2.

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. : *Magallana* [syn. *Crassostrea*] *ariakensis*, l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), l'huître plate chilienne (*Ostrea chilensis*) et l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), *Magallana* (syn. *Crassostrea*) *ariakensis*.

[...]

CHAPITRE 11.4.
INFECTION À *MARTEILIA REFRINGENS*

Article 11.4.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection à *Marteilia refringens* » désigne une infection causée exclusivement par *Marteilia refringens* y compris les types O et M; il s'agit d'un agent pathogène appartenant à la famille des Marteiliidae.

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

Article 11.4.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent à la moule commune (*Mytilus edulis*), à l'huitre naine (*Ostrea stentina*), à l'huitre plate européenne (*Ostrea edulis*), au couteau d'Europe (*Solen marginatus*), à *Xenostrobus securis*, à l'huitre plate australienne (*Ostrea angasi*), à l'huitre plate argentine (*Ostrea puelchana*), à l'huitre plate chilienne (*Ostrea chilensis*), à la moule commune (*Mytilus edulis*) et à la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) et à la petite praire (*Chamelea gallina*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

[...]

Annexe 12. Point 7.8. – Modèles d'articles 11.X.9. – 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

Modèles d'articles 11.X.9. à 11.X.14. destinés aux chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

CHAPITRE 11.X.

INFECTION PAR [L'AGENT PATHOGÈNE X]

[...]

Article 11.X.9.

Importation d'animaux aquatiques ~~et~~ ou de produits issus d'animaux aquatiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors d'une importation d'*animaux aquatiques* ~~et de produits issus d'animaux aquatiques~~ appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques appartenant à des espèces visées à l'article 11.2.2. dérivés de ces espèces, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger que l'envoi soit accompagné d'un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques délivré par l'Autorité compétente du pays exportateur., ~~ou par un agent certificateur agréé par le pays importateur, et attestant~~ Le certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques doit attester que le lieu de production des *animaux aquatiques* ~~et~~ ou des produits issus d'animaux aquatiques est un pays, une zone ou un compartiment déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X] sur la base des procédures définies par les articles 11.X.4~~5~~, ~~ou~~ 11.X.5-6. ou 11.X.7. (selon le cas) et 11.X.6~~8~~.

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

Le présent article ne s'applique pas aux ~~marchandises~~ produits issus d'animaux aquatiques visés ~~énumérés~~ au point 1 de l'article 11.X.3.

Article 11.X.10.

Importation d'animaux aquatiques à des fins d'aquaculture, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors de l'importation d'*animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2. à des fins d'aquaculture à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation conformément au chapitre 2.1. et prendre en considération les mesures d'atténuation du *risque* prévues aux points 1 et 2 ci-dessous.

- 1) Si l'objectif est le grossissement et la récolte des *animaux aquatiques* importés, il convient d'appliquer les principes suivants :
 - a) la livraison directe et le maintien à vie des *animaux aquatiques* importés dans une installation de *quarantaine*, et
 - b) avant leur départ de quarantaine (qu'il s'agisse de l'installation d'origine ou d'une autre installation de quarantaine jusqu'à laquelle les animaux ont été transportés dans des conditions de sécurité biologique adéquates), la mise à mort et la transformation des animaux aquatiques en l'un ou plusieurs des produits issus d'animaux aquatiques visés au point 1 de l'article 11.X.3. ou en l'un des autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et

-
- c) le traitement de toute l'eau utilisée pour le transport ainsi que de tous les équipements, effluents et déchets afin d'inactiver [l'agent pathogène X] conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5.

OU

- 2) Si l'objectif est l'établissement d'une nouvelle population à des fins d'aquaculture, il convient d'appliquer les principes suivants :
- a) dans le *pays exportateur* :
- i) identifier les populations sources potentielles et évaluer les données sanitaires des *animaux aquatiques* qui les composent ;
 - ii) tester les populations sources conformément au chapitre 1.4. et sélectionner une population de géniteurs (F-0) d'*animaux aquatiques* présentant un statut sanitaire élevé au regard de l'infection par [l'agent pathogène X] ;
- b) dans le *pays importateur* :
- i) placer la population de géniteurs (F-0) importée dans une installation de *quarantaine* ;
 - ii) tester la population F-0 aux fins de la recherche de [l'agent pathogène X] conformément au chapitre 1.4. afin de déterminer si elle constitue une population de géniteurs adéquate ;
 - iii) produire une première génération (F-1) en *quarantaine* ;
 - iv) élever la population F-1 dans une installation de *quarantaine* pendant une durée suffisante, et dans des conditions propices, pour permettre l'expression clinique de l'infection par [l'agent pathogène X] (tels qu'ils sont décrits au chapitre 2.4.X. du Manuel aquatique), et prélever des échantillons et tester la présence de [l'agent pathogène X] chez cette population conformément au chapitre 1.4. du Code aquatique et du chapitre 2.4.X. du Manuel aquatique ;
 - v) si [l'agent pathogène X] n'est pas détecté dans la population F-1, cette dernière pourra être reconnue indemne d'infection par [l'agent pathogène X] et libérée de sa *quarantaine* ;
 - vi) si [l'agent pathogène X] est détecté dans la population F-1, cette dernière ne sera pas libérée de sa *quarantaine*, et sera tuée puis éliminée de manière biosécurisée conformément au chapitre 4.8.

Article 11.X.11.

Importation d'animaux aquatiques et ou de produits issus d'animaux aquatiques à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors de l'importation, d'*animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques dérivés de ces espèces*, à des fins de transformation ultérieure en vue de la consommation humaine, d'*animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques dérivés de ces espèces*, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit apprécier le risque associé à cette importation et, si la situation le justifie, exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien et son entreposage dans des installations de *quarantaine* ou d'*entreposage jusqu'à ce qu'il soit transformé* de confinement jusqu'au moment de sa transformation en l'un des produits visés au point 1 de l'article 11.X.3. ou produits décrits au point 1 de l'article 11.X.12-14., ou encore en d'autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, conteneurs et matériaux d'emballage utilisés lors du transport et celui de tous les effluents et déchets résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver en vue d'assurer l'inactivation de [l'agent pathogène X] ou de les

éliminer de manière à empêcher leur contact avec des espèces sensibles biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et

- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

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

Article 11.X.12.

Importation d'animaux aquatiques ou de produits issus d'animaux aquatiques destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, et les usages agricoles, industriels, ou pharmaceutiques ou et de la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors de l'importation d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., ou de produits issus d'animaux aquatiques dérivés de ces espèces, destinés à des fins autres que la consommation humaine, parmi lesquelles l'alimentation animale, et les usages agricoles, industriels, ou pharmaceutiques ou et de la recherche, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit exiger :

- 1) la livraison directe du chargement, ainsi que son maintien, dans des installations de quarantaine ou d'entreposage en vue d'y être abattu et jusqu'à ce qu'il soit transformé en l'un des produits visés au point 1 de l'article 11X.3. ou en d'autres produits autorisés par l'Autorité compétente, et
- 2) le traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, conteneurs et matériaux d'emballage utilisés lors du transport résultant des opérations de transformation dans des conditions permettant d'inactiver en vue d'assurer l'inactivation de [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) le traitement de tous les effluents et de tous les déchets dans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8.

Le présent article ne s'applique pas aux marchandises visées au point 1 de l'article 11.2.3.

Article 11.X.13.

[Note : il s'agit d'un nouvel article devant être aligné sur les autres chapitres spécifiques aux maladies figurant dans le *Code aquatique*.]

Importation d'animaux aquatiques destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]

Lors d'une importation d'animaux aquatiques appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2. qui sont destinés à des laboratoires ou à des établissements zoologiques à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'Autorité compétente du pays importateur doit veiller :

- 1) à la livraison directe du chargement, ainsi qu'à son maintien, dans des installations de quarantaine agréées par l'Autorité compétente, et
- 2) au traitement de toute l'eau (y compris sous forme de glace) ainsi que de l'ensemble des équipements, conteneurs et matériaux d'emballage utilisés lors du transport en vue d'assurer l'inactivation dedans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4., 4.8. et 5.5., et
- 3) au traitement de tous les effluents et déchets issus des installations de quarantaine des laboratoires ou des établissements zoologiques dans des conditions permettant d'inactiver [l'agent pathogène X] ou de les éliminer de manière biosécurisée conformément aux chapitres 4.4. et 4.8., et

4) à l'élimination des cadavres conformément au chapitre 4.8.

Article 11.X.1314.

Importation ~~(ou transit par le territoire)~~ d'animaux aquatiques et de produits issus d'animaux aquatiques pour la vente au détail de marchandises destinées à la consommation humaine, à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X] indépendamment du statut sanitaire du pays exportateur ou de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par [l'agent pathogène X]

- 1) Quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par [l'agent pathogène X], les *Autorités compétentes* ne doivent imposer aucune condition liée à ~~l'infection par~~ [l'agent pathogène X] quand elles autorisent l'importation ou le transit par leur *territoire* des ~~marchandises~~ produits issus d'animaux aquatiques suivantes qui ont été préparées et emballées pour la vente au détail lorsqu'elles satisfont aux conditions énoncées à l'article 5.4.2. :

a) [...].

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

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

- 2) Lors d'une importation ~~d'animaux aquatiques~~ et de *produits issus d'animaux aquatiques* appartenant à l'une des espèces visées à l'article 11.X.2., à l'exclusion de ceux visés au point 1 qui précède, ~~dérivés d'une des espèces visées à l'article 11.X.2.~~ à partir d'un pays, d'une zone ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], l'*Autorité compétente* du pays importateur doit apprécier le *risque* associé à cette importation et appliquer des mesures appropriées visant à réduire atténuer ce *risque*.

Annexe 13. Point 8.1. – Définitions du Glossaire : « Services chargés de la santé des animaux aquatiques », « Autorité compétente » et « Autorité vétérinaire »

Article	Numéro de page dans le Code aquatique de 2022	Usage
Guide de l'utilisateur : B.5.	vii	5) Les normes figurant dans les chapitres du titre 3 ont pour objet la mise en place, le maintien et l'évaluation des Services chargés de la santé des animaux aquatiques, y compris les questions afférentes à la communication. Ces normes visent à aider les <u>Services chargés de la santé des animaux aquatiques et les Autorités compétentes des États membres</u> à atteindre leurs objectifs d'amélioration de la santé des animaux aquatiques et du bien-être des poissons d'élevage, ainsi qu'à instaurer et préserver la confiance dans leurs certificats sanitaires internationaux relatifs aux animaux aquatiques.
Guide l'utilisateur : C.8.	xi	8) Certificats sanitaires internationaux pour les animaux aquatiques Un certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques est un document officiel que l'Autorité compétente du pays exportateur délivre conformément aux chapitres 5.1. et 5.2. Il énonce les exigences auxquelles répondent les marchandises exportées en matière de santé des animaux aquatiques. C'est de la qualité des Services chargés de la santé des animaux aquatiques du pays exportateur, notamment des principes éthiques <u>de l'Autorité compétente pertinente</u> régissant l'établissement des certificats sanitaires et de l'expérience <u>des Services chargés de la santé des animaux aquatiques de l'Autorité vétérinaire</u> dans la satisfaction des obligations en matière de notification, que dépend l'assurance qu'auront les partenaires commerciaux de la sécurité sanitaire des marchandises issues d'animaux aquatiques.
Glossaire	xiii	NOTIFICATION désigne la procédure par laquelle : c) l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> porte à la connaissance du <i>Siège</i> , d) le <i>Siège</i> porte à la connaissance des Autorités compétentes <u>de l'Autorité vétérinaire</u> des États membres l'apparition d'une <i>maladie</i> , conformément aux dispositions prévues au chapitre 1.1.
Article 1.1.1.	1	Aux fins du <i>Code aquatique</i> et conformément aux dispositions prévues aux articles 5, 9 et 10 des Statuts organiques de l'OMSA, les États membres reconnaissent au <i>Siège</i> le droit de communiquer directement avec l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> de son ou de ses <i>territoires</i> . Toute <i>notification</i> ou toute information adressée par l'OMSA à l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> est considérée comme ayant été adressée à l'État dont elle relève et toute <i>notification</i> ou toute information adressée à l'OMSA par l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> est considérée comme ayant été envoyée par l'État dont elle relève.
Article 1.1.3. paragraphe 1	2	Sous la responsabilité du Délégué, l'Autorité compétente <u>l'Autorité vétérinaire</u> adressera au <i>Siège</i> :

Article 1.1.4. paragraphe 1	2	Sous la responsabilité du Délégué, L'Autorité compétente <u>L'Autorité vétérinaire</u> adressera au <i>Siège</i> :
Article 1.1.5. point 1	2	L'Autorité compétente <u>L'Autorité vétérinaire</u> d'un pays comptant une <i>zone</i> ou un <i>compartiment</i> infecté avisera le <i>Siège</i> dès que ce pays, cette <i>zone</i> ou ce <i>compartiment</i> aura recouvré le statut indemne au regard de la <i>maladie</i> considérée.
Article 1.1.5. point 3	2	L'Autorité compétente <u>L'Autorité vétérinaire</u> d'un État membre qui a établi une ou plusieurs <i>zones indemnes</i> ou un ou plusieurs <i>compartiments indemnes</i> , doit en informer le <i>Siège</i> en donnant les détails nécessaires, notamment les critères sur lesquels repose le statut de territoire indemne et les conditions applicables de maintien de ce statut, et en indiquant clairement l'emplacement de ces <i>zones</i> et de ces <i>compartiments</i> sur une carte du territoire de l'État membre.
Article 3.1.2. point 7 paragraphe 3	36	Les Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>Les Autorités compétentes</u> doivent définir et consigner par écrit les responsabilités et l'organisation (notamment de la chaîne de commandement) de la structure chargée de la délivrance des <i>certificats sanitaires internationaux applicables aux animaux aquatiques</i> .
Article 3.1.2. point 10	37	10. <u>Demandes d'information, réclamations et recours</u> Les Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>L'Autorité compétente pertinente</u> doivent s'engager à répondre aux sollicitations des Services chargés de la santé des animaux aquatiques de l'Autorité compétente des autres États membres ou de toute autre autorité , en veillant notamment à ce que les demandes d'information, les réclamations et les recours soient traités dans un délai raisonnable. Un relevé de toutes ces réclamations et de tous ces recours, ainsi que des suites que les Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>L'Autorité compétente</u> leur auront réservées, doit être tenu.
Article 3.1.5. paragraphe 4	38	L'(les) expert(s) réalise(nt) l'évaluation des <i>Services chargés de la santé des animaux aquatiques</i> de l'État membre en prenant pour guide l'ouvrage « <i>Outil de l'OMSA pour l'évaluation des performances des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques (Outil PVS de l'OMSA : animaux aquatiques)</i> ». La mise en pratique de l'outil doit être adaptée au contexte de l'évaluation. L'(les) expert(s) rédige(nt) un rapport après consultation des <i>Services chargés de la santé des animaux aquatiques</i> de l'État membre.
Article 3.2.1. paragraphe 2	39	Il est primordial de reconnaître la communication en tant que discipline au sein des <i>Services chargés de la santé des animaux aquatiques</i> et de l'y intégrer afin de permettre le bon fonctionnement de ces <i>Services</i> . L'intégration de compétences en santé des <i>animaux aquatiques</i> et en communication est essentielle pour une communication efficace. La communication entre les Services chargés de la santé des animaux aquatiques et les Services vétérinaires (en particulier lorsque les Services chargés de la santé des animaux aquatiques sont distincts et indépendants des Services vétérinaires) est capitale.
Article 4.2.3. point 1	55	2) L'étendue d'une <i>zone</i> doit être fixée par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>L'Autorité compétente</u> , en s'appuyant sur la définition du terme <i>zone</i> , et être rendue publique par des canaux officiels.

Article 4.2.3. point 3	55	4) Les facteurs définissant un <i>compartiment</i> doivent être établis par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>l'Autorité compétente</u> , en s'appuyant sur des critères pertinents tels que les pratiques de gestion et d'élevage reposant sur la sécurité biologique. Ils doivent être rendus publics par des canaux officiels.
Article 4.2.3. Point 6	56	6) Le <i>plan de sécurité biologique</i> fourni pour un <i>compartiment</i> doit consigner par écrit le partenariat entre l'entreprise ou le secteur industriel concerné et le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>l'Autorité compétente</u> , ainsi que leurs responsabilités respectives (procédures de supervision de l'opération relative au <i>compartiment</i> par le Service chargé de la santé des animaux aquatiques <u>l'Autorité compétente</u> y compris).
Article 5.3.4. point 2) a)	93	b) infrastructure : comprend le support réglementaire (par exemple, les lois relatives à la santé des animaux aquatiques) et les systèmes administratifs (par exemple, organisation des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques <u>de l'Autorité compétente</u>) ;
Article 5.3.7. point 1) d) i)	96	iii) l'évaluation des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques du pays exportateur ;
Article 5.3.7. point 2) e) i)	97	iv) l'évaluation des Services vétérinaires ou des Services chargés de la santé des animaux aquatiques du pays exportateur ;

Annexe 14. Point 8.2. – Article 1.1.5. du chapitre 1.1. « Notification des maladies et communication des informations épidémiologique »

CHAPITRE 1.1.

NOTIFICATION DES MALADIES ET COMMUNICATION DES
INFORMATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

[...]

Article 1.1.5.

- 1) ~~L'Autorité compétente d'un pays comptant une zone ou un compartiment infecté avisera le Siège dès que ce pays, cette zone ou ce compartiment aura recouvré le statut indemne au regard de la maladie considérée.~~
- 2) ~~Un pays, une zone ou un compartiment peut être considéré comme ayant recouvré le statut indemne d'une maladie déterminée s'il remplit toutes les conditions énoncées dans le Code aquatique.~~
- 3) ~~L'Autorité compétente d'un État membre qui a établi une ou plusieurs zones indemnes ou un ou plusieurs compartiments indemnes, doit en informer le Siège en donnant les détails nécessaires, notamment les critères sur lesquels repose le statut de territoire indemne et les conditions applicables de maintien de ce statut, et en indiquant clairement l'emplacement de ces zones et de ces compartiments sur une carte du territoire de l'État membre.~~

Article 1.1.65.

- 1) Bien qu'ils soient tenus de notifier seulement les *maladies listées* et les *maladies émergentes*, les États membres sont encouragés à fournir à l'OMSA toute autre information importante relative à la santé des *animaux aquatiques*.
- 2) Le Siège transmettra aux *Autorités compétentes* par courrier électronique ou par le biais de l'application WAHIS toutes les *notifications* reçues conformément aux articles 1.1.2. à 1.1.54, ainsi que toute autre information jugée pertinente.

[...]

Annexe 15. Point 8.3. – Article 1.3.1. du chapitre 1.3. « Maladies listées par l'OMSA » – Inclusion de l'infection par tous les génogroupes de l'espèce de virus *virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique*

CHAPITRE 1.3.
MALADIES LISTÉES PAR L'OMSA

[...]

Article 1.3.1.

Les *maladies* suivantes de poissons, sont des *maladies listées* :

- Infection à *Aphanomyces invadans* (syndrome ulcératif épizootique)
- Infection à *Gyrodactylus salaris*
- Infection par des variants délétés dans la RHP du virus de l'anémie infectieuse du saumon ou par des variants RHP0 de ce virus
- Infection par l'alphavirus des salmonidés
- Infection par l'herpèsvirus de la carpe koï
- ~~Infection par l'iridovirus de la daurade japonaise~~
- Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique
- Infection par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse
- Infection par **le-tous les génogroupes de l'espèce** virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique
- Infection par le virus de la septicémie hémorragique virale
- Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe
- Infection par le virus du tilapia lacustre.

[...]

Annexe 16. Point 8.3. – Évaluation de l’infection par tous les génogroupes de l’espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique

ÉVALUATION DE L’INFECTION PAR TOUS LES GÉNOGROUPES DE L’ESPÈCE VIRUS DE LA NÉCROSE INFECTIEUSE RÉNALE ET SPLÉNIQUE (ISKNV) EN VUE DE SON INCLUSION DANS LA LISTE DES MALADIES DU CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L’OMSA

Récapitulatif de l’évaluation

4. La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques a évalué l’infection par l’espèce virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV), et notamment ses trois génogroupes que sont l’iridovirus de la daurade japonaise (RSIV), le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV) et l’iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV) au regard des critères d’inclusion dans la liste des maladies figurant à l’article 1.2.2. du *Code aquatique*.
5. La Commission des animaux aquatiques est convenue que le génogroupe RSIV, actuellement listé dans le *Code aquatique*, ainsi que les deux génogroupes ISKNV et TRIBV satisfaisaient aux critères 1, 2, 3, et 4b (voir Tableau 1 ci-dessous).
6. La Commission des animaux aquatiques a noté que les trois génogroupes présentaient des similitudes en matière d’espèces sensibles, d’épidémiologie et de méthodes de diagnostic. À ce titre, la Commission a estimé que la maladie devait être listée sous la désignation « Infection par tous les génogroupes de l’espèce ISKNV ». Il est proposé que la définition de l’infection par tous les génogroupes de l’espèce ISKNV désigne une infection causée par les trois génogroupes (ISKNV, RSIV and TRBIV) mais exclue une autre espèce de *Megalocytivirus*, le virus de la maladie de perte d’écailles (« scale drop disease virus »).

	Critères d’inclusion dans la Liste de l’OMSA						Conclusion
	1	2	3	4a	4b	4c	
Infection par tous les génogroupes de l’espèce virale ISKNV	+	+	+	NA	+	-	La maladie satisfaisait aux critères d’inclusion dans la Liste de l’OMSA.

NA = non applicable.

Critères d’inclusion figurant au chapitre 1.2. du *Code aquatique*

Les critères d’inclusion d’une maladie dans la liste de l’OMSA sont les suivants :

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

ET

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

ET

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

ET

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

OU

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

OU

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

Contexte

Le genre *Megalocytivirus* est un des sept genres de la famille des *Iridoviridae*. À l'instar des genres *Ranavirus* et *Lymphocystivirus*, il appartient à la sous-famille des *Alphairidovirinae* (Chinchar *et al.*, 2017 ; Chinchar *et al.*, 2020). Les mégalyocytivirus se différencient des ranavirus et des lymphocystivirus par leur capacité à induire une augmentation marquée de la taille des cellules des tissus infectés et par l'analyse séquentielle des gènes viraux principaux (Chinchar *et al.*, 2017). Les mégalyocytivirus sont les agents étiologiques de maladies graves associées à des mortalités importantes chez plusieurs espèces de poissons marins et dulçaquicoles (Kurita & Nakajima, 2012 ; Hick *et al.*, 2016).

Le Comité international sur la taxonomie des virus (ICTV) reconnaît deux espèces appartenant au genre *Megalocytivirus* : le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique (ISKNV) et le virus de la maladie de perte d'écaillés (SDDV) (Chinchar *et al.*, 2017). Le SDDV se distingue d'un point de vue génétique et épidémiologique de l'ISKNV et donc n'est pas inclus dans la présente évaluation.

Au sein de l'espèce ISKNV ont été reconnus trois génogroupes : l'ISKNV, le RSIV et le TRBIV (Song *et al.*, 2008). Toutefois, il n'a pas encore été déterminé si ces trois génogroupes correspondaient à des espèces distinctes ou à des souches distinctes d'une seule et même espèce (Chinchar *et al.*, 2017). Les mégalyocytivirus portent des noms variés et choisis d'après l'espèce dans laquelle ils ont été détectés pour la première fois ; toutefois, tous les variants de l'espèce ISKNV dont le génome a été analysé ont été placés dans un des trois génogroupes (ISKNV, RSIV and TRBIV) (Chinchar *et al.*, 2017).

Le nom « ISKNV » est employé pour désigner une des deux espèces reconnues du genre *Megalocytivirus* mais également pour désigner un des trois génogroupes de cette espèce. Dans le présent document, l'emploi du terme « génogroupe ISKNV » fait référence au génogroupe ISKNV alors que le terme « espèce ISKNV » fait référence à l'espèce ISKNV.

L'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise (RSIV) a été listée par l'OMSA dans le *Code sanitaire*¹ pour les animaux aquatiques pour la première fois en 2003. Son inclusion dans la liste a été maintenue depuis et il figure dans l'édition de 2022 du *Code aquatique*. La maladie causée par le RSIV a été détectée pour la première fois dans un élevage de dorades roses (*Pagrus major*), au Japon, en 1990 (Inouye *et al.*, 1992). Le RSIV a été principalement détecté chez des poissons marins. Parmi les espèces listées comme étant sensibles² à l'infection par le RSIV dans le *Code aquatique* de l'OMSA figurent la dorade rose (*Pagrus major*), la sériole du Japon (*Seriola quinqueradiata*), la sériole couronnée (*Seriola dumerilii*), une espèce de *Lateolabrax*, la perche barramundi (*Lates calcarifer*), le thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), *Oplegnathus fasciatus*, la carangue dentue (*Caranx delicatissimus*), *Siniperca chuatsi*, le tambour rouge (*Sciaenops ocellatus*), le mullet à grosse tête (*Mugil cephalus*) et des espèces de mérous (*Epinephelus spp.*).

Le génogroupe ISKNV n'est actuellement pas listé dans le *Code aquatique* de l'OMSA. La morphologie des virions est évocatrice de celle des iridovirus. En outre, l'augmentation de la taille des cellules présentant des corps d'inclusion similaires à ceux des mégalyocytivirus a été rapportée chez des espèces de poissons dulçaquicoles depuis la fin des années 80 et des années 90 (par exemple, Armstrong & Ferguson, 1989 ; Anderson *et al.*, 1993). Le génogroupe ISKNV a été détecté dans des échantillons de poissons d'ornements provenant d'archives datant de 1996 (Go *et al.*, 2006 ; Go *et al.*, 2016 ; Becker *et al.*, 2022). L'infection par le virus de la nécrose infectieuse rénale et splénique a été décrite chez *Siniperca chuatsi* (He *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2002). En 2001, le génome du génogroupe ISKNV a été analysé et il a été conclu qu'il était similaire à celui du RSIV (He *et al.*, 2001). Le génogroupe ISKNV a été détecté chez de nombreux poissons dulçaquicoles, notamment de nombreuses espèces de la filière des poissons d'ornement (voir la revue de Johan & Zainathan, 2020). La présence de ce génotype a été rapportée chez de nombreuses espèces de poissons d'ornement faisant l'objet d'échanges commerciaux au niveau international (voir la publication de Johan & Zainathan, 2020; Becker *et al.*, 2022). Il a été également rapporté que le génogroupe ISKNV était responsable de mortalités massives d'espèces

¹ Le RSIV a été inclus dans le *Code aquatique* avant 2003, mais comme « autre maladie d'importance ».

² Il faut noter que la liste des espèces sensibles à l'infection par le RSIV conformément au chapitre 1.5. du *Code aquatique* n'a pas été révisée pour suivre les recommandations du Groupe *ad hoc*.

importantes pour la consommation humaine (par exemple, Subramaniam *et al.*, 2016 ; Ramirez-Paredes *et al.*, 2020 ; Fusianto *et al.*, 2021).

Le génogroupe de l'iridovirus du corps rougeâtre du turbot (TRBIV) n'est actuellement pas inclus dans le *Code aquatique* de l'OMSA. Il a été décrit pour la première fois comme responsable de la maladie chez le turbot *Scophthalmus maximus* (Shi *et al.*, 2004). Le TRBIV est connu comme la cause principale de maladie chez les poissons plats en Chine et en Corée (par exemple Shi *et al.*, 2004 ; Do *et al.*, 2005). En outre, il a également été détectée chez d'autres espèces, notamment celles de la filière de poissons d'ornement (Go *et al.*, 2016 ; Koda *et al.*, 2018). Le TRBIV est également à l'origine de maladie chez d'autres espèces d'élevage présentant une importance économique telles que la perche barramundi (*Lates calcarifer*) (Tsai *et al.*, 2020) et *Oplegnathus fasciatus* (Huang *et al.*, 2011).

La Commission des animaux aquatiques a précédemment proposé une approche pour différencier les souches d'agents pathogènes (se référer aux rapports de la Commission de [février](#) et [octobre 2011](#)). Les trois principaux critères qui ont été pris en compte pour l'applicabilité de la différenciation des souches de l'agent pathogène dans les normes du *Code aquatique* et du *Manuel aquatique* étaient les suivants : 1) les variants de l'agent pathogène sont clairement identifiées dans la littérature scientifique et les caractéristiques des maladies qu'ils causent sont différentes ; 2) il existe des méthodes robustes qui permettent de toujours les différencier ; 3) il y a ou il peut possiblement y avoir une gestion différenciée des variants dans ou entre les pays. Dans le cas de l'espèce ISKNV, le RSIV a été listé avant même que soit conduits les travaux de recherche pour définir ses trois génogroupes au sein de l'espèce ISKNV ainsi que pour établir leurs liens épidémiologiques et génétiques. Etant donné que la Liste inclut le RSIV et non l'ISKNV ou le TRBIV, la présente évaluation expose les informations spécifiques à chacun de ces trois génogroupes. Toutefois, il est proposé de lister les trois génogroupes comme étant l'espèce ISKNV.

Évaluation au regard des critères d'inclusion dans la Liste

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

Évaluation

L'espèce ISKNV peut être transmise horizontalement par l'eau et demeure viable dans les tissus congelés de l'hôte. Il est attendu que la probabilité de transmission soit plus grande dans la filière de commercialisation des poissons vivants mais elle est également possible dans les produits issus d'animaux aquatiques, en particulier si ces derniers ne sont pas éviscérés.

De nombreux poissons marins et dulçaquicoles sont sensibles à l'espèce ISKNV. Ils font l'objet d'échanges commerciaux au niveau international, que ce soit sous forme de poissons vivants (destinés à la consommation humaine, à l'aquaculture ou un usage ornemental) ou de produits issus d'animaux aquatiques.

Le RSIV a été détecté dans plusieurs pays d'Asie où il a été associé à des foyers de maladies chez des espèces de poissons d'élevage marins (Kurita & Nakajima, 2012). Certaines espèces, destinées à la consommation humaine, sont commercialisées vivantes (par exemple la dorade rose, les mérus), alors que d'autres sont commercialisées sous forme de produits issus d'animaux aquatiques.

Le génogroupe ISKNV a été détecté chez de nombreuses espèces commercialisées dans la filière des poissons d'ornement. Cette filière a été mise en cause dans l'apparition et la propagation de la maladie (par exemple, Jeong *et al.*, 2008 ; Johan & Zainathan, 2020). Les poissons d'ornement infectés peuvent ne pas présenter de signes cliniques (par exemple, Subramaniam *et al.*, 2014 ; Rimmer *et al.*, 2015) et, à ce titre, peuvent avoir un rôle de porteurs du virus. Le génogroupe ISKNV a également été détecté chez des espèces d'élevage d'importance pour la consommation humaine, et qui font l'objet d'échanges commerciaux au niveau international, telles que le tilapia (Ramirez-Paredes *et al.*, 2020). Le génogroupe ISKNV a également été détecté chez des poissons non transformés utilisés comme aliment pour les animaux d'aquaculture (Lajimin *et al.*, 2015), ce qui suggère que les poissons commercialisés comme aliment pour animaux d'aquaculture ou comme appâts pourraient constituer une voie d'introduction. La transmission de l'agent pathogène aux espèces de poissons marins par des espèces de poissons dulçaquicoles a été démontrée par inoculation directe et cohabitation (Jeong *et al.*, 2008b ; Go & Whittington, 2019).

Le TRBIV a été observé chez plusieurs espèces d'importance pour les échanges internationaux (par exemple, le turbot, le cardeau hirame, la perche barramundi), qu'elles soient commercialisées vivantes ou sous forme de produits issus d'animaux aquatiques. Les résultats de l'analyse phylogénétique indiquent une récente propagation internationale du TRBIV (Tsai *et al.*, 2020).

Les variants de l'espèce ISKNV ont été détectés chez de nombreuses espèces d'espèces de poissons marins et dulçaquicoles qui font l'objet d'échanges internationaux. Chacun des trois génogroupes a été détecté dans des marchandises commercialisées et il y a des preuves établissant un lien de causalité entre la propagation internationale et les échanges commerciaux.

Conclusion

Le critère est satisfait.

Critère n°2. Au moins un pays peut démontrer l'absence de la maladie sur son territoire ou dans une zone chez les animaux aquatiques sensibles conformément aux dispositions prévues au chapitre 1.4.

Évaluation

L'infection par le RSIV est notifiable à l'OMSA depuis 2003. Plusieurs pays continuent de rapporter qu'ils n'ont jamais détecté le virus sur leur territoire (se référer au Système Mondial d'information Zoosanitaire de l'OMSA) ; il est probable que certains de ces pays puissent démontrer leur statut indemne de la maladie.

La présence du génogroupe ISKNV a été rapportée chez un grand nombre de poissons commercialisés dans la filière des poissons d'ornement et il est fortement probable que ce génogroupe soit largement répandu le long des chaînes d'approvisionnement. Toutefois, certains pays réunissent de façon continue des conditions élémentaires de sécurité biologique^{2F2F2F3} pour le génogroupe ISKNV et sont en capacité de démontrer leur statut indemne. En outre, les tests PCR utilisés aux fins de la surveillance du RSIV détecteraient également le génogroupe ISKNV, ce qui constituerait la preuve de l'absence du génogroupe ISKNV.

Le TRBIV a été détecté pour la première fois dans des élevages de poissons plats en Chine et en Corée. Il a également été détecté chez des poissons d'ornement et dans les élevages de perches barramundi. Les tests PCR recommandés dans le chapitre du *Manuel aquatique* de l'OMSA dédié à l'infection par le RSIV pourraient ne pas détecter le TRBIV, avec comme conséquence une moins grande confiance concernant la distribution de ce génogroupe. Toutefois, le TRBIV ayant été démontré comme étant pathogène pour les populations de certaines espèces d'élevage, il est probable qu'il soit détecté en cas d'apparition de la maladie chez ces espèces. Bien qu'il y ait moins de certitude concernant la distribution du TRBIV, il semble probable qu'au moins un pays pourrait déposer une auto-déclaration d'absence pour l'intégralité du pays ou une zone.

Conclusion

Le critère est satisfait.

Critère n°3. Une définition de cas précise est disponible et il existe une méthode fiable de détection et de diagnostic.

Évaluation

Les définitions de cas pour la suspicion et la confirmation de l'infection par le RSIV sont disponibles dans le *Manuel aquatique* de l'OMSA. Étant donné que la plupart des tests PCR pour le RSIV (et d'autres méthodes comme, par exemple, l'histologie) détectent le génogroupe ISKNV, les définitions de cas pourraient être aisément adaptées afin d'inclure le génogroupe ISKNV. Kawato *et al.* (2021) ont comparé les performances analytiques de quatre méthodes de PCR en temps réel pour la détection des mégalocytivirus (à l'exclusion du SDDV). Ils ont démontré que trois des quatre tests détectaient les virus ciblés, à savoir les génogroupes ISKNV, RSIV, et TRBIV. Le nombre d'outils de diagnostic disponibles pour détecter l'espèce ISKNV et élaborer les définitions de cas incluant les trois génogroupes est suffisant.

Conclusion

Le critère est satisfait.

³Les conditions élémentaires de sécurité biologique sont définies dans l'article 1.4.6. du *Code aquatique* et comprennent, comme exigences, un système de détection précoce (tel que décrit à l'article 1.4.7.) ainsi que des mesures de prévention de l'introduction de l'agent pathogène.

Critère n°4.a. La transmission naturelle à l'homme a été prouvée, et la présence de l'infection chez l'homme est associée à des conséquences graves.

Évaluation

Il n'y a aucune preuve de transmission à l'homme.

Conclusion

Le critère n'est pas applicable.

Critère n°4b. Lorsqu'elle apparaît, il est prouvé que la maladie affecte la santé des animaux aquatiques d'élevage à l'échelle d'un pays ou d'une zone, avec de lourdes conséquences telles que, par exemple, des pertes de production, une morbidité ou une mortalité constatée au niveau du pays ou de la zone.

Évaluation

Le RSIV a causé des mortalités massives dans les populations de poissons d'élevage. La maladie a été détectée pour la première fois chez la dorade rose au Japon et se caractérisait par une léthargie, une anémie sévère, des pétéchies au niveau des branchies et une splénomégalie (Inouye *et al.*, 1992 ; Jung *et al.*, 1997 ; Nakajima & Maeno, 1998). Il a été rapporté que le RSIV était responsable de pertes de production, de morbidités et de mortalités chez de nombreuses autres espèces (par exemple Chao *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2003 ; Girisha *et al.*, 2020 ; Ni *et al.*, 2021 ; Sumithra *et al.*, 2022).

La présence du génogroupe ISKNV a été associée à de nombreux cas de maladies observées chez des poissons d'ornement (voir la revue de Johan & Zainathan, 2020 ; Becker *et al.*, 2022). Le génogroupe ISKNV a également été associé à des mortalités massives chez des espèces de poissons d'importance élevées pour la consommation humaine ; par exemple, la perche barramundi (Dong *et al.*, 2017 ; Kerddee *et al.*, 2021), le tilapia (par exemple, Figueiredo *et al.*, 2021 ; Ramírez-Paredes *et al.*, 2021) et les mérous (par exemple, Chao *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2020 ; Fusianto *et al.*, 2021).

Le TRBIV est responsable de maladies et de mortalités massives chez le turbot d'aquaculture en Chine (par exemple, Shi *et al.*, 2010). Des mortalités pouvant atteindre 90 % ont été observées chez la perche barramundi à Taiwan (Tsai *et al.*, 2020).

Conclusion

Le critère est satisfait.

Critère n°4c. On a montré la présence de la maladie ou on dispose d'éléments de preuve scientifiques indiquant que la maladie affecterait la santé des animaux aquatiques sauvages avec de lourdes conséquences telles que, par exemple, une morbidité ou une mortalité à l'échelle de la population, une baisse de productivité ou des répercussions sur l'écologie.

Évaluation

Il y a un nombre limité d'informations sur la présence des génogroupes RSIV, ISKNV ou TRBIV dans les populations de poissons sauvages et sur les conséquences en termes de morbidité, mortalité ou d'impact écologique. Il a été rapporté que le génogroupe ISKNV était à l'origine d'un épisode de mortalités massives chez des populations de cichlidés sauvages en Inde (Swaminathan *et al.*, 2022) et qu'il a été également détecté chez diverses espèces de poissons sauvages apparemment en bonne santé (Wang *et al.*, 2007).

Conclusion

Le critère n'est pas satisfait.

Références

ARMSTRONG, R. & FERGUSON, H. (1989). Systemic viral disease of the chromide cichlid *Etilapia maculatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **7**, 155-157.

-
- ANDERSON, I.G., PRIOR, H.C., RODWELL, B.J. & HARRIS, G.O. (1993). Iridovirus-like virions in imported dwarf gourami (*Colisa lalia*) with systemic amoebiasis. *Australian Veterinary Journal*, **70**(2), 66-67.
- BECKER, J.A., FUSIANTO, C., HICK, P.M. (2022). Infection with Megalocytivirus in Ornamental Fish. In: *Aquaculture Pathophysiology, Pharmacology and Toxicology* (F. Kibenge, R.S. Chong, B. Baldisserotto, eds), Elsevier. (Currently IN REVIEW).
- CHAO, C.B., CHEN, C.Y., LAI, Y.Y., LIN, C.S. & HUANG, H.T. (2004). Histological, ultrastructural, and in situ hybridization study on enlarged cells in the grouper *Epinephelus* hybrids infected with grouper iridovirus in Taiwan (TGIV). *Diseases of Aquatic Organisms*, **58**, 127–142.
- 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. *Journal of Fish Diseases*, **26**, 615-619.
- CHINCHAR, V.R., HICK, P., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q. (2017). ICTV Report Consortium ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, **98**, 890–891.
- CHINCHAR, V.G., HICK, P.H., HUANG, J., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T. & ZHANG, Q. (2020) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae*, *Journal of General Virology*, **98**, 890-891.
- DO, J.W., CHA, S.J., KIM, J.S., AN, E.J., LEE, N.S., CHOI, H.J., LEE, C.H., PARK, M.S., KIM, J.W., KIM, Y.C. & PARK, J.W. (2005). Phylogenetic analysis of the major capsid protein gene of iridovirus isolates from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms*, **64**, 193–200.
- DONG, H.T., JITRAKORN, S., KAYANSAMRUJ, P., PIRARATE, N., RODKHUM, C., RATTANAROJPONG, T., SENAPIN, S., SAKSMERPROME, V. (2017). Infectious spleen and kidney necrosis disease (ISKND) outbreaks in farmed barramundi (*Lates calcarifer*) in Vietnam. *Fish & Shellfish Immunology*, **68**, 65-73.
- FIGUEIREDO, H.C.P., TAVARES, G.C., DORELLA, F.A., ROSA, J.C.C., MARCELINO, S.A.C., PIEREZAN, F. & PEREIRA, F.L. (2022). First report of infectious spleen and kidney necrosis virus in Nile tilapia in Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(5), 3008-3015.
- FUSIANTO, C., HICK, P.M., HERLAMBANG, A., WHITTINGTON, R.J. & BECKER, J.A. (2021). Outbreak investigation attributes Infectious spleen and kidney necrosis virus as a necessary cause of a mortality epidemic in farmed grouper (*Epinephelus* spp.) in Bali, Indonesia. *Aquaculture Reports* **20**, 100723.
- GIRISHA, S.K., PUNEETH, T.G., NITHIN, M.S., NAVEEN KUMAR, B.T., AJAY, S.K., VINAY, T.N. & RAMESH, K.S. (2020). Red sea bream iridovirus disease (RSIVD) outbreak in Asian seabass (*Lates calcarifer*) cultured in open estuarine cages along the west coast of India: first report. *Aquaculture*, **520**, 734712.
- 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., TWEEDIE, A. & WHITTINGTON, R.J. (2016). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139.
- GO, J. & WHITTINGTON, R. (2006). Experimental transmission and virulence of a megalocytivirus (Family Iridoviridae) of dwarf gourami (*Colisa lalia*) from Asia in Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) in Australia. *Aquaculture*, **258**, 140-149.
- GO, J. & WHITTINGTON, R.J. (2019). Experimental transmission of Infectious Spleen and Kidney Necrosis Virus (ISKNV) from freshwater ornamental fish to silver sweep *Scorpiis lineolata*, an Australian marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, **137**(1), 1-21.
- HE, J.G., DENG, M., WENG, S.P., LI, Z., ZHOU, S.Y., LONG, Q.X., WANG, X.Z. & CHAN, S.M. (2001). Complete genome analysis of the mandarin fish infectious spleen and kidney necrosis iridovirus. *Virology*, **291**, 126–139, doi: 10.1006/viro.2001.1208.
- HE, J.G., ZENG, K., WENG, S.P. & CHAN, S.M. (2000). Systemic disease caused by an iridovirus-like agent in cultured mandarin fish *Siniperca chuatsi* (Basillewsky), in China, *Journal of Fish Diseases*, **23**, 219–222.
-

-
- HE, J.G., ZENG, K., WENG, S.P. & CHAN, S.M. (2002), Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV), *Aquaculture*, **204**, 11–24. doi: 10.1016/S0044-8486(01)00639-1.
- HICK, P.M., BECKER, J.A. & WHITTINGTON, R.J. (2016). Iridoviruses of fish In: *Aquaculture Virology* (F. Kibenge and M. Godoy, eds), Elsevier, London, UK, 127-152.
- HUANG, S.M., TU, C., TSENG, C.H., HUANG, C.C., CHOU, C.C., KUO, H.C. & CHANG, S.K. (2011). Genetic analysis of fish iridoviruses isolated in Taiwan during 2001-2009. *Archives of Virology*, **156**, 1505-1515.
- HUANG, Y., CAI, S., JIAN, J., LUI, G., & XU, L. (2020). Co-infection of infectious spleen and kidney necrosis virus and *Francisella* sp. in farmed pearl gentian grouper (♀ *Epinephelus fuscoguttatus* × ♂ *E. lanceolatus*) in China — A case report. *Aquaculture*, **526**, 735409.
- 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 Pathology*, **27**, 19–27.
- JEONG, J.B., KIM, H.Y., JUN, L.J., LYU, J.H., PARK, N.G., KIM, J.K. & JEONG, H.D. (2008a). Outbreaks and risks of infectious spleen and kidney necrosis virus diseases in freshwater ornamental fishes, *Diseases of Aquatic Organisms*, **78**, 209–215. doi: 10.3354/dao01879.
- JEONG, J., CHO, H., JUN, L., HONG, S., CHUNG, J. & JEONG, H. (2008b). Transmission of Iridovirus from freshwater ornamental fish (pearl gourami) to marine (rock bream). *Diseases of Aquatic Organisms*, **82(1)**, 27-36.
- JOHAN, C.A.C. & ZAINATHAN, S.C. (2020). Megalocytiviruses in ornamental fish: A review. *Veterinary 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, *Journal of Fish Diseases*, **23**, 223–226. doi: 10.1046/j.1365-2761.2000.00212.x.
- KERDDEE, P., DINH-HUNG, N., THANH DONG, H., HIRONO, I., SOONTARA, C., AREECHON, N., SRISAPOOME, P. & KAYANSAMRUJ, P. (2021). Molecular evidence for homologous strains of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) genotype I infecting inland freshwater cultured Asian sea bass (*Lates calcarifer*) in Thailand. *Archives of Virology*, **166**, 3061–3074.
- KIM, K.H., CHOI, K.M., KANG, G., WOO, W.S., SOHN, M.Y., SON, H.J., YUN, D., KIM, D.H. & PARK, C.I. (2022). Development and Validation of a Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Red Sea Bream Iridovirus. *Fishes*, **7**, 236. <https://doi.org/10.3390/fishes7050236>
- KODA, S.A., SUBRAMANIAM, K., HICK, P.M., HALL, E., WALTZEK, T.B. & BECKER, J.A. (2023). Partial validation of a TaqMan quantitative polymerase chain reaction for the detection of the three genotypes of *Infectious spleen and kidney necrosis virus*. *PLoS ONE*, **18(2)**:e0281292.
- KODA, S.A., SUBRAMANIAM, K., FLOYD-FRANCIS, R., YANONG, R.P., FRASCA, S., 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. *Diseases of Aquatic Organisms*, **130(1)**, 11-24.
- KURITA, J., NAKAJIMA, K., (2012), Megalocytiviruses, *Viruses*, **4(4)**, 521-538.
- KAWATO, Y., CUMMINS, D.M., VALDETER, S., MOHR, P., ITO, T., MIZUNO, K., KAWAKAMI, H., WILLIAMS, L.M., CRANE, M.ST.J. & MOODY, N.J.G. (2021). Development of New Real-time PCR Assays for Detecting *Megalocytivirus* Across Multiple Genotypes. *Fish Pathology*, **56 (4)**, 177-186. doi.org/10.3147/jsfp.56.177
- LAJIMIN, S., RAZAK, A.A., DENIL, D. J., RANSANGAN, J., ABDUL WAHID, M.E. & SADE, A. (2015). First detection of Megalocytivirus (*Iridoviridae*) in trash fish used for aquaculture feed in Sabah, Malaysia. *Int. J. of Aquatic Science*, **6(1)**: 54-66.
- 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, *Diseases of Aquatic Organisms*, **36(1)**, 73-5.
-

NI, S.Z., WANG, Y.J., HU, J. B., SHI, J., XU, Y., ZHOU, S.M., LI, J.J., HONG, B.H. & QIAN, D. (2021). Identification, histopathology, and phylogenetic analysis of an iridovirus from cultivated silver pomfret in Zhejiang Province, East China. *Aquaculture*, **530**,735619.

RAMÍREZ-PAREDES, J.G., PALEY, R.K., HUNT, W., FEIST, S.W., STONE, D.M., FIELD, T.R., HAYDON, D.J., ZIDDAH, P.A., NKANSA, M., GUILDER, J., GRAY, J., DUODU, S., PECKU, E.K., AWUNI, J.A., WALLIS, T.S. & VERNER-JEFFREYS, D.W. (2021). First detection of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) associated with massive mortalities in farmed tilapia in Africa. *Transboundary Emerging Diseases*, **68**, 1550–1563. <https://doi.org/10.1111/tbed.13825>

RIMMER A.E., BECKER J.A., TWEEDIE A., LINTERMANS M., LANDOS M. & WHITTINGTON R.J. (2015). Detection of dwarf gourami iridovirus (Infectious spleen and kidney necrosis virus) in populations of ornamental fish prior to and after importation into Australia, with the first evidence of infection in domestically farmed Platy (*Xiphophorus maculatus*). *Preventive Veterinary Medicine*, **122**, 181-194.

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**, 11-15. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.11.007>

SONG, J-Y., KITAMURA, S-I., JUNG, S-J., MIYADAI, T., TANAKA, S., FUKUDA, Y., KIM, S-R. & OH, M-J. (2008). Genetic variation and geographic distribution of megalocytiviruses. *Journal of Microbiology*, **46**, 29-33.

SUBRAMANIAM, K., SHARIFF, M., OMAR, A.R., HAIR-BEJO, M. & ONG, B.L. (2014). Detection and molecular characterisation of infectious spleen and kidney necrosis virus from major ornamental fish breeding states in peninsular Malaysia, *Journal of Fish Diseases*, **37**, 609–618, <https://doi.org/10.1111/jfd.12152>

SUBRAMANIAM, K., GOTESMAN, M., SMITH, C.E., STECKLER, N.K., KELLEY, K.L., GROFF, J.M. & WALTZEK, T.B. (2016). *Megalocytivirus* infection in cultured Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **119**, 253-258. <https://doi.org/10.3354/dao02985>

SUMITHRA, T.G., KRUPESHA SHARMA, S.R., NEELIMA, L., DHANUTHA, N.R., JOSHY, A., ANUSREE, V.N., GAYATHRI, S., RAGHU, R.K., PRAVEEN, N.D., THOMAS, S. & RAJESH, K.M. (2022). Red sea bream iridovirus infection in cage farmed Asian sea bass (*Lates calcarifer*): Insights into the pathology, epizootiology, and genetic diversity. *Aquaculture*, **548**, 737571. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737571>

SWAMINATHAN, T.R., JOHNY, T.K., NITHIANANTHAM, S.R., SUDHAGAR, A., PRADHAN, P.K., SULUMANE RAMACHANDRA, K.S., NAIR, R.R., & SOOD, N. (2022). A natural outbreak of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) threatens wild pearlspot, *Etroplus suratensis* in Peechi Dam in the Western Ghats biodiversity hotspot, India. *Transboundary and Emerging Diseases*, **69(5)**, 1595-1605. <https://doi.org/10.1111/tbed.14494>

TSAI, J.M., HUANG, S.L. & YANG, C.D. (2020). PCR Detection and Phylogenetic Analysis of *Megalocytivirus* Isolates in Farmed Giant Sea Perch *Lates calcarifer* in Southern Taiwan. *Viruses*, **12(6)**, 681. <https://doi.org/10.3390/v12060681>

WANG, Y.Q., LÜ, L., WENG, S.P., HUANG, J.N., CHAN, S.M. & HE, J.G. (2007). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of a marine fish infectious spleen and kidney necrosis viruslike (ISKNV-like) virus. *Archives of Virology*, **152**, 763–773.

Annexe 17. Point 8.4.1. – Articles 8.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens

(VERSION AVEC 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 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*);~~
 - d) 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*);
 - e) 3) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.
- 2) ~~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 visés au point 1 de l'article 8.1.3., les Autorités compétentes doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.1.9. à 8.1.14. en fonction du statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. dendrobatidis*.~~
- 3) ~~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 doit procéder à une analyse des risques conformément aux~~

~~recommandations contenues dans le chapitre 2.1. L'Autorité compétente du pays exportateur doit être tenue informée du résultat de cette analyse.~~

[...]

(VERSIONS 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*

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. 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* ;
- 2) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.

[...]

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*

~~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'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*) :
 - d) 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 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*) :
 - e) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.
- 2) 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 visés au point 1 de l'article 8.2.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.2.9. à 8.2.14. en fonction du statut sanitaire du pays exportateur ou de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *B. salamandrivorans*.

-
- 3) ~~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. L'Autorité compétente doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1.~~

[...]

(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. dendrobatidis*

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. 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'au moins 60°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. salamandrivorans* ;
- 2) cuir élaboré à partir de peau d'amphibien.

[...]

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*

~~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 6560°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) ~~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 visés au point 1 de l'article 8.3.3., les *Autorités compétentes* doivent imposer le respect des conditions prescrites aux articles 8.3.9. à 8.3.14. en fonction du statut sanitaire du pays exportateur ou de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par les espèces du genre *Ranavirus*.~~
- 2) ~~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 doit procéder à une analyse des risques conformément aux recommandations contenues dans le chapitre 2.1. 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*.

[...]

CHAPITRE 9.3.

INFECTION À *HEPATOBACTER PENAEI*
(HEPATOPANCREATITE NECROSANTE)

[...]

Article 9.3.3.

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 *H. penaei*

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 *H. penaei*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *H. penaei* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~63~~95°C pendant au moins ~~30~~cing minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *H. penaei* ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~63~~95°C pendant au moins ~~30~~cing minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *H. penaei* ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.5.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA MYONÉCROSE INFECTIEUSE

[...]

Article 9.5.3.

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 par le virus de la myonécrose infectieuse

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 au virus de la myonécrose infectieuse, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus de la myonécrose infectieuse :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~75°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la myonécrose infectieuse ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~75°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la myonécrose infectieuse ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.6.

INFECTION PAR LE NODAVIRUS DE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (MALADIE DES QUEUES BLANCHES)

[...]

Article 9.6.3.

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 par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*

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 au nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~50°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~50°C pendant au moins ~~60~~cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le nodavirus de *Macrobrachium rosenbergii* ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.7.

INFECTION PAR LE VIRUS DU SYNDROME DE TAURA

[...]

Article 9.7.3.

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 par le virus du syndrome de Taura

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 au virus du syndrome de Taura, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus du syndrome de Taura :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 70°C pendant au moins ~~30~~108 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du syndrome de Taura ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 70°C pendant au moins ~~30~~108 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus du syndrome de Taura ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.

[...]

CHAPITRE 9.10.

INFECTION PAR LE VIRUS 1 IRIDESCENT DES DÉCAPODES

[...]

Article 9.10.3.

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 le virus 1 iridescent des décapodes

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 au virus 1 iridescent des décapodes, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection par le virus 1 iridescent des décapodes :

- 1) [*produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~56~~80°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus 1 iridescent des décapodes ;
- 2) *farine* de crustacés ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~56~~80°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus 1 iridescent des décapodes ;
- 3) huile de crustacés ;
- 4) chitine extraite par un procédé chimique.] (à l'étude)

[...]

CHAPITRE 10.1.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE
HÉMATOPOÏÉTIQUE ÉPIZOOTIQUE

[...]

Article 10.1.3.

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 le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique

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 au virus de la nécrose hématopoïétique épizootique, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique :

- 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 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique ;
- ~~2) poissons éviscérés et 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 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique ;~~
- ~~3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique épizootique ;~~
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.2.

INFECTION À *APHANOMYCES INVADANS* (SYNDROME ULCÉRATIF ÉPIZOOTIQUE)

[...]

Article 10.2.3.

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 *A. invadans*

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 *A. invadans*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *A. invadans* :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~100°C pendant au moins ~~cinqu~~ne minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *A. invadans* ;
- ~~2) poissons éviscérés et 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 *A. invadans* ;~~
- 32) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~60~~100°C pendant au moins ~~cinqu~~ne minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *A. invadans* ;
- 43) huile de poisson ;
- 54) poissons éviscérés congelés ;
- 65) filets ou darnes / pavés de poisson congelés.

[...]

CHAPITRE 10.3.

INFECTION À *GYRODACTYLUS SALARIS*

[...]

Article 10.3.3.

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 *G. salaris*

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 *G. salaris*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection à *G. salaris* :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant subi un traitement thermique et qui sont présentés en conditionnement hermétique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 40°C pendant au moins une minute, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *G. salaris* ;
- ~~2) poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ;~~
- 32) poissons éviscérés et séchés dans des conditions naturelles (c'est-à-dire à l'air ou au soleil) ;
- 43) poissons éviscérés et congelés ayant été soumis à des températures inférieures ou égales à moins 18 °C ;
- 54) filets ou darnes / pavés de poisson congelés ayant été soumis à des températures inférieures ou égales à moins 18 °C ;
- 65) poissons éviscérés réfrigérés ayant été pêchés dans une eau de mer de salinité supérieure ou égale à 25 ppt ;
- 76) filets ou darnes / pavés réfrigérés de poissons ayant été pêchés dans une eau de mer de salinité supérieure ou égale à 25 ppt ;
- 87) produits réfrigérés à base de poisson dont la peau, les arêtes et les nageoires ont été retirés ;
- 98) œufs de poisson non viables ;
- 109) huile de poisson ;
- 140) farine de poisson ;
- 121) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.4.

INFECTION PAR LE VIRUS DE L'ANÉMIE INFECTIEUSE DU SAUMON

[...]

Article 10.4.3.

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 par le virus de l'anémie infectieuse du saumon

Les dispositions figurant au présent article s'appliquent à l'ensemble des formes du virus de l'anémie infectieuse du saumon, y compris les variants RHPO.

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 au virus de l'anémie infectieuse du saumon, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon :

- 1) *produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de l'anémie infectieuse du saumon ;*
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de l'anémie infectieuse du saumon ;~~
- 3) *farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de l'anémie infectieuse du saumon ;*
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.5.

INFECTION PAR L'ALPHAVIRUS DES SALMONIDÉS

[...]

Article 10.5.3.

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 par l'alphavirus des salmonidés

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'alphavirus des salmonidés, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par l'alphavirus des salmonidés :

- 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 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'alphavirus des salmonidés ;
- 2) ~~poissons éviscérés et 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 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'alphavirus des salmonidés ;~~
- 3) *farine* de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 60°C pendant au moins 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'alphavirus des salmonidés ;
- 4) huile de poisson ;
- 5) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.6.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA NÉCROSE HÉMATOPOÏÉTIQUE INFECTIEUSE

[...]

Article 10.6.3.

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 par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse

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 au virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 30 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse ;
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique~~ ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 30 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse ;
- 32) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 30 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse ;
- 43) huile de poisson ;
- 54) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.7.

INFECTION PAR L'HERPESVIRUS DE LA CARPE KOÏ

[...]

Article 10.7.3.

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 par l'herpèsvirus de la carpe koï

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 la carpe koï, 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 la carpe koï :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 50°C pendant au moins ~~trois~~une minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de la carpe koï ;
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 50°C pendant au moins trois minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de la carpe koï ;~~
- 3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 50°C pendant au moins ~~trois~~une minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'herpèsvirus de la carpe koï ;
- 4) huile de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.8.

INFECTION PAR L'IRIDOVIRUS DE LA DAURADE JAPONAISE

[...]

Article 10.8.3.

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'iridovirus de la daurade japonaise

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'iridovirus de la daurade japonaise, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par l'iridovirus de la daurade japonaise :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'iridovirus de la daurade japonaise ;
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique~~ ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'iridovirus de la daurade japonaise ;
- 32) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 56°C pendant au moins 30 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive l'iridovirus de la daurade japonaise ;
- 43) huile de poisson ;
- 54) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.9.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA VIRÉMIE PRINTANIÈRE DE LA CARPE

[...]

Article 10.9.3.

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 le virus de la virémie printanière de la carpe

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 au virus de la virémie printanière de la carpe, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~90~~60°C pendant au moins 60 ~~secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la virémie printanière de la carpe ;
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique~~ ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 60 secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la virémie printanière de la carpe ;
- 3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~90~~60°C pendant au moins 60 ~~secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la virémie printanière de la carpe ;
- 4) huile de poisson.

[...]

CHAPITRE 10.10.

INFECTION PAR LE VIRUS DE LA SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE VIRALE

[...]

Article 10.10.3.

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 le virus de la septicémie hémorragique virale

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 au virus de la septicémie hémorragique virale, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la zone ou du compartiment d'exportation au regard de l'infection par le virus de la septicémie hémorragique virale :

- 1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~90~~60°C pendant au moins ~~60-secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la septicémie hémorragique virale ;
- 2) ~~poissons éviscérés et séchés par un procédé mécanique~~ ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 90°C pendant au moins 60-secondes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la septicémie hémorragique virale ;
- 3) farine de poisson ayant été soumise à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins ~~90~~60°C pendant au moins ~~60-secondes~~minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive le virus de la septicémie hémorragique virale ;
- 4) poissons éviscérés et séchés dans des conditions naturelles (c'est-à-dire à l'air ou au soleil) ;
- 5) huile de poisson ;
- 6) cuir élaboré à partir de peau de poisson.

[...]

Annexe 20. Point 8.4.4. – Articles 11.X.3. des chapitres spécifiques aux maladies des mollusques

(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

~~1. 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 121,50°C pendant au moins 3 cinq 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'au moins 50°C pendant au moins cinq minutes, 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*

~~1. 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* :~~

~~1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. exitiosa* ;~~

~~a) 2) chair d'huître à l'état congelé ; et~~

~~b) 3) 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) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. exitiosa* ;
- 2) chair d'huître à l'état congelé ;
- 3) huîtres congelées en demi-coquille.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 11.3.

INFECTION À *BONAMIA OSTREAE*

[...]

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*

~~1. 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* :~~

1) produits issus d'animaux aquatiques ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. ostreae* ;

a) 1) 2) chair d'huître à l'état congelé ; ~~et~~

b) 2) 3) 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 OSTREAE*

[...]

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) *produits issus d'animaux aquatiques* ayant été soumis à un traitement thermique suffisant pour atteindre une température à cœur d'au moins 100°C pendant au moins 15 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *B. ostreae* ;
- 2) chair d'huître à l'état congelé ;
- 3) huîtres congelées en demi-coquille.

[...]

(VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION)

CHAPITRE 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*

~~1. 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 trois 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 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*

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 trois 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*

~~1. 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 12160°C pendant au moins 360 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 60°C pendant au moins 60 minutes, 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*

~~1. 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 11.6.2. 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 12160°C pendant au moins 360 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. olsenii*

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. olsenii*, quel que soit le statut sanitaire du pays, de la *zone* ou du *compartiment* d'exportation au regard de l'infection à *P. olsenii* :

- 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 60 minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *P. olsenii*.

[...]

(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*

~~1. 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 121,95°C pendant au moins 3 cinq 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)

CHAPITRE 11.7.

INFECTION À *XENOHALLOTIS 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 95°C pendant au moins cinq minutes, ou à un couple temps/température équivalent qui inactive *X. californiensis*.

[...]

CHAPITRE 11.5.
INFECTION À *PERKINSUS MARINUS*

Article 11.5.1.

Aux fins du Code aquatique, l'expression « infection à *Perkinsus marinus* » désigne une infection causée exclusivement par l'agent pathogène *P. marinus* appartenant à la famille Perkinsidae.

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

Article 11.5.2.

Champ d'application

Les recommandations du présent chapitre s'appliquent à l'huître creuse américaine (*Crassostrea virginica*), à l'huître du Pacifique (~~*Crassostrea gigas*~~), à l'huître de Suminoe (~~*Crassostrea ariakensis*~~), à *Mya arenaria*, à ~~*Macoma balthica*~~ *Magallana* [~~*Syn. Crassostrea*~~] *ariakensis*, l'huître creuse de Cortez (*Crassostrea corteziensis*) et l'huître palmée (*Saccostrea palmula*) ~~la praire (*Mercenaria mercenaria*)~~. Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le Manuel aquatique lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

[...]

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 *Photobacterium* insect-related (Pir) toxins, PirA and PirB. Although there are reports of the isolation of other *Vibrio* species from clinical cases of AHPND, only 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 *Photobacterium* insect-related (Pir) binary toxin, PirA and PirB (Gomez-Gil *et al.*, 2014; Gomez-Jimenez *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2015a; Kondo *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). The plasmid within 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: fleshy 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 including 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). None known.~~

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 of disease and mortality can start as early as 10 days post-stocking. Clinical Signs include: of disease in moribund prawns sink to bottom, may include pale to white hepatopancreas (HP) due to pigment loss in the connective tissue capsule (NACA, 2014). 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 haemocytetes) (NACA, 2014). Behavioural changes such as frequent sinking to the bottom of tanks may also be noted.

2.3.3 Gross pathology

Gross pathological observations include pale-to-white 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 haemocytetes) (NACA, 2014). 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

*Vp*_{AHPND} 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 WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 a DNA preservative DNAzol for PCR testing. If material cannot be fixed it may be frozen, but repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans).

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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	G. Surveillance of apparently healthy animals				H. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				I. 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 - Isolation					±	±	±	NA				
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2	++	++	++	2
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	±2
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay					+	+	+	NA	+	+	+	NA
LAMP		++	++	1								
Ab-ELISA												
Ag-ELISA		±	++	1		±	++	1		±	++	1
Other antigen detection methods ³												
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP 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

Histological examination of AHPND infected shrimp reveals that pathological changes are limited to the hepatopancreas. 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. No B-, F- and R-cells are seen in the hepatopancreatic tubule and some nuclei of tubule epithelial cells are enlarged (karyomegaly). No significant bacterial involvement appears during this phase 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, 2012-2014; Nunan *et al.*, 2014; Soto-Rodriguez *et al.*, 2015; Tran *et al.*, 2013; 2014).
- iii) In *Penaeus vannamei* AHPND tolerant lines, a chronic phase can be observed. 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 isolation

*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 assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

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 Vp_{AHPND}-PCR assays: a) negative extraction control i.e. DNA template extracted at the same time from a known negative sample; b) DNA template from a known positive sample, such as Vp_{AHPND}-affected shrimp tissue or DNA from an Vp_{AHPND}-positive bacterial culture, or plasmid DNA that contains the target region of the specific set of primers; c) a non-template control. In addition, a further control is required to demonstrate that extracted nucleic acid is free from PCR inhibitors, for example, for shrimp tissues use of the decapod 18S rRNA PCR (Lo *et al.*, 1996) or use the 16S rRNA PCR for bacteria (Weisburg *et al.*, 1991).

4.4.1. Real-time PCR

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
Method 1: Han <i>et al.</i> , 2015b; GenBank Accession No.: KM067908			
<u>pirA</u>	<u>Fwd VpPirA-F: TTG-GAC-TGT-CGA-ACC-AAA-CG</u> <u>Rev VpPirA-R: GCA-CCC-CAT-TGG-TAT-TGA-ATG</u> <u>VpPirA Probe: FAM-AGA-CAG-CAA-ACA-TAC-ACC-TAT-CAT-CCC-</u> <u>GGA-TAMRA</u>	<u>Fwd: 0.3 µM</u> <u>Rev: 0.3 µM</u> <u>probe: 0.1 µM</u>	<u>95°C/20 sec; 45 cycles</u> <u>95°C/3 sec and 60°C/30</u> <u>sec</u>

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 Vp_{AHPND}-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

<u>Primer/probe name</u>	<u>Sequence (5'–3')</u>	<u>Target gene</u>	<u>Reference</u>
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

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1 (AP1): Flegel & Lo, 2014; GenBank : KP324996; 700 bp</u>			
<u>pVA1</u>	<u>Fwd AP1F: 5CCT TGG GTG TGC TTA GAG GAT G</u> <u>Rev AP1R: GCA AAC TAT CGC GCA GAA CAC C</u>	<u>0.2 µM each</u>	<u>94°C/5 min; 25–30 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/60 sec; final extension step at 72°C/10 min. Reaction mixture can be held at 4°C</u>
<u>Method 2 (AP2): Flegel & Lo, 2014; GenBank : KP324996; 700 bp</u>			
<u>pVA1</u>	<u>Fwd AP2F: TCA CCC GAA TGC TCG CTT GTG G</u> <u>Rev AP2R: CGT CGC TAC TGT CTA GCT GAA G</u>	<u>0.2 µM each</u>	<u>94°C/5 min; 25–30 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/60 sec; final extension step at 72°C/10 min. Reaction mixture can be held at 4°C</u>
<u>Method 13 (AP3): Sirikharin et al., 2015; GenBank Accession No.: JALL01000066.1; amplicon size: 333 bp</u>			
<u>pirA^{vp}</u>	<u>Fwd AP3-F: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC</u> <u>Rev AP3-R: GTG-GTA-ATA-GAT-TGT-ACA-GAA</u>	<u>0.2 µM each</u>	<u>94°C/5 min; 30 cycles of 94°C/30 sec, 53°C/30 sec, 72°C/40 sec; final elongation step at 72°C/7 min; Reaction mixture can be held at 4°C</u>
<u>Method 24 (TUMSAT-Vp3): Tinwongger et al., 2014; GenBank Accession No.: AB972427; amplicon size: 360 bp</u>			
<u>pVA1</u>	<u>Fwd TUMSAT-Vp3 F: GTG-TTG-CAT-AAT-TTT-GTG-CA</u> <u>Rev TUMSAT-Vp3 R: TTG-TAC-AGA-AAC-CAC-GAC-TA</u>	<u>0.6 µM each</u>	<u>95°C/2 min; 30 cycles of 95°C/30 sec, 56°C/30 sec, 72°C/30 sec</u>
<u>Method 35 (VpPirA-284): Han et al., 2015a; GenBank Accession No.: KM067908; amplicon size: 284 bp</u>			
<u>pirA^{vp}</u>	<u>Fwd VpPirA-284F: TGA-CTA-TTC-TCA-CGA-TTG-GAC-TG</u> <u>Rev VpPirA-284R: CAC-GAC-TAG-CGC-CAT-TGT-TA</u>	<u>0.2 µM each</u>	<u>94°C/3 min; 35 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec; final extension 72°C/7 min</u>
<u>Method 46 (VpPirB-392): Han et al., 2015a; GenBank Accession No.: KM067908; amplicon size: 392 bp</u>			
<u>pirB^{vp}</u>	<u>Fwd VpPirB-392F: TGA-TGA-AGT-GAT-GGG-TGC-TC</u> <u>Rev VpPirB-392R: TGT-AAG-CGC-CGT-TTA-ACT-CA</u>	<u>0.2 µM each</u>	<u>94°C/3 min; 35 cycles of 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, 72°C/30 sec; final extension 72°C/7 min</u>
<u>Method 57 (AP4): Dangtip et al., 2015; GenBank Accession No.: JPKS01000000; amplicon size: 1269 bp</u>			
<u>PirA and PirB toxin genes</u>	<u>Primary</u> <u>Fwd AP4-F1: ATG-AGT-AAC-AAT-ATA-AAA-CAT-GAA-AC</u> <u>Rev AP4-R1: ACG-ATT-TCG-ACG-TTC-CCC-AA</u> <u>Nested</u> <u>Fwd AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG</u> <u>Rev AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC</u>	<u>0.2 µM each</u>	<u>Primary</u> <u>94°C/2 min; 30 cycles of 94°C/30 sec, 55°C/30 sec, 72°C/90 sec; final extension step at 72°C/2 min; hold at 4°C</u> <u>Nested</u> <u>94°C/2 min; 25 cycles of 94°C/20 sec, 55°C/20 sec, 72°C/20 sec; hold at 4°C</u>
<u>Method 8 (AP4): Dangtip et al., 2015; GenBank : JPKS01000000; amplicon size: 230 bp</u>			

PirA and PirB toxin genes	Fwd AP4-F2: TTG-AGA-ATA-CGG-GAC-GTG-GG Rev AP4-R2: GTT-AGT-CAT-GTG-AGC-ACC-TTC	0.2 µM each	94°C/2 min; 25 cycles of 94°C/20 sec, 55°C/20 sec, 72°C/20 sec; hold at 4°C
----------------------------------	---	--------------------	--

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	<i>pVA1</i>	700bp	Flegel & Lo (2014)
AP2	AP2F: TCA-CCC-GAA-TGC-TCG-CTT-GTG-G AP2R: CGT-CGC-TAC-TGT-CTA-GCT-GAA-G	<i>pVA1</i>	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 4.4.2.2.

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

The nested PCR primers, designed using the China (People's Rep. of) isolate of AHPND bacteria (Yang *et al.*, 2014), are shown in Table 4.4.2.73. 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. Isothermal loop-mediated amplification protocol (LAMP)

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method: Koiwai <i>et al.</i> , 2017; GenBank Accession No.: AB972427.1			
Toxin PirAB-like	F3: TGA-TAA-TGC-ATT-CTA-TCA-TCA-GC B3: ATT-TGA-AAG-ACC-AAA-TGA-AAC-C FIP-F1c: GTG-AGC-ACC-TTC-TTA-GTG-GTA-ATA FIP-F2: GTT-GTA-ATT-AAC-AAT-GGC-GCT-AG	F3: 5.0 pmol B3: 5.0 pmol	65°C/60 min and 80°C/5 min

	<u>BIP-B1c: TGA-CGG-AAT-TTA-ACC-CTA-ACA-ATG-C</u> <u>BIP-B2: GCT-TTG-AAA-GCA-TAG-TTA-GGA-TC</u>	<u>FIP: 40 pmol</u> <u>BIP: 40 pmol</u>	
--	--	--	--

4.4.34. 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 size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

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) and conventional PCR (Dangtip *et al.*, 2015) are 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical-Hydrographical 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 PCR
- ii) A positive result by ~~or conventional PCR methods recommended in Table 4.1~~
- iii) A positive result by LAMP
- iv) Histopathology ~~or cytopathological changes~~ consistent with the ~~presence of the pathogen or the disease~~
- v) A positive result by Ag-ELISA

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 at least one of the following ~~criterion~~ criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- iii) Positive results by Ag-ELISA 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~~
- ii) A positive result by agent isolation

¹ For example transboundary commodities.

- iii) A positive result by real-time PCR
- iv) A positive result by conventional PCR
- v) A positive result by bioassay
- vi) A positive result by LAMP
- vii) A positive result by Ag-ELISA

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 at least one of the following criterion-criteria is met:

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis.
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR followed by amplicon sequence analysis
- iii) Positive results by Ag-ELISA 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 (no data are currently available). 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 pose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe	DSp	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.

Aranguren Caro L.F., Mai H.N., Noble B. & Dhar A.K. (2020b). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VP_{AHPND}), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. *J. Invertebr. Pathol.*, **174**, 107424. doi: 10.1016/j.jip.2020.107424. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32535000

CRUZ-FLORES R., MAI H.N. & DHAR A.K. (2019). Multiplex SYBR Green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of *Photobhabdus* 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. <https://enaca.org/enclosure/?id=88>

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). *Photobhabdus* 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., CHAWEEPACK T., MAVICHAK R., UNAJAK S., NOZAKI R., KONDO H. & HIRONO I. (2014). Development of PCR diagnosis method for shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Pathol.*, **49**, 159–164.

TRAN L.H., FITZSIMMONS K. & LIGHTNER D.V. (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 WOAHP Reference Laboratories for acute hepatopancreatic necrosis disease
(please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact the WOAHP Reference Laboratory for any further information on
acute hepatopancreatic necrosis disease

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

CHAPTER 2.2.3.

INFECTION WITH HEPATOBACTER PENA EI (NECROTISING HEPATOPANCREATITIS)

1. Scope

Infection with infectious salmon anaemia virus (ISAV) means infection with the pathogenic agent highly polymorphic region (HPR)-deleted ISAV, or the non-pathogenic HPRO (non-deleted HPR) ISAV of the Genus *Isavirus* and Family *Orthomyxoviridae*.

Infection with ~~*Candidatus*~~ *Hepatobacter penaei* means infection with the pathogenic agent *Candidatus* *H. penaei*, an obligate intracellular bacterium of the Family Holosporaceae, Order Rickettsiales ~~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 Family Holosporaceae family within the Order Rickettsiales (Leyva *et al.*, 2018). The predominant form is a rod-shaped rickettsial-like organism (0.25 × 0.9 μm), whereas the helical form (0.25 × 2–3.5 μm) possesses eight flagella at the basal apex (Frelier *et al.*, 1992; Lightner & Redman, 1994; Loy & Frelier, 1996; Loy *et al.*, 1996). Genetic analysis of *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 confirms 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~~ are: 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~~ are: aloha prawn (*P. marginatus*), banana prawn (*P. merguensis*), blue shrimp (*P. stylirostris*), giant tiger prawn (*P. monodon*), northern brown shrimp (*P. aztecus*), northern pink shrimp (*P. duorarum*) and northern white shrimp (*P. setiferus*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but an active infection has not been demonstrated: American lobster (*Homarus americanus*) (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 (PL), 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* often causes an acute disease with very high mortalities in young juveniles, adults and broodstock. In horizontally infected young juveniles, adults and broodstock, the incubation period and severity of the disease are somewhat size or age dependent, with juveniles always being the most severely affected. 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 epicomensal organisms; bacterial shell disease, including ulcerative cuticle lesions or melanised appendage erosion; and expanded chromatophores resulting in the appearance of darkened edges in uropods and pleopods. None of these signs are pathognomonic. (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 atrophied hepatopancreas, empty guts, soft shells and flaccid bodies; black or darkened gills; 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) ~~a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance including pale discoloration 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 PL that were also *H. penaei*-positive, which suggests that a transmission from broodstock to progeny can occur (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-Gamez *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 following (Lightner *et al.*, 2012).

See WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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* 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 (Ca(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: 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 and this organ should be selected preferentially (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

Hepatobacter penaei can be detected in faeces samples collected from clinically affected populations of *Penaeus vannamei* may be collected and used for testing (usually by PCR), when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary (Brinez *et al.*, 2003; Frellet *et al.*, 1993; Lightner, 1996). However, the use of faeces samples to detect *H. penaei* NHP in apparently healthy shrimp has not been evaluated. Faeces samples have not been validated to the same level as hepatopancreas samples.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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, but repeated freezing and thawing should be avoided.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. 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 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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	++	+++	+++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> 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 WOAHP 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.

³~~Specify 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 screening populations for infection with 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* in cell culture. No crustacean cell lines exist (Vincent & Lotz, 2007).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

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

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

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).

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Aranguren <i>et al.</i>, 2010; GenBank U65509</u>			
<u><i>H. penaei</i> 16S rRNA-gene</u>	Fwd NHP1300F: CGT-TCA-CGG-GCC-TTG-TAC-AC Rev NHP1366R: GCT-CAT-CGC-CTT-AAA-GAA-AAG-ATA-A Probe: CCG-CCC-GTC-AAG-CCA-TGG-AA	300 nM 100 nM	40 cycles: 95°C/15 sec and 60°C/1 min
<u>Method 2: Aranguren & Dhar 2018; GenBank JQAJ01000001.1</u>			
<u><i>H. penaei</i> Flagella hook gene-protein</u>	Fwd NHP FlgE3qF: AAC-ACC-CTG-TCT-CCC-CAA-TTC Rev FlgE3qR: CCA-GCC-TTG-GAC-AAA-CAC-CTT Probe: CGC-CCC-AAA-GCA-TGC-CGC	500 nM 100 nM	40 cycles: 95°C/1 sec and 60°C/20 sec

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 & Frellet, 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 TAC AC 3' and 5' GCT CAT CGC CTT AAA GAA AAG ATA A 3', respectively. The TaqMan probe NHP: 5' CCG CCC GTC AAG CCA TGG AA 3', which corresponds to the region from nucleotides 1321–1340, is synthesised and labelled with fluorescent dyes 6-carboxyfluorescein (FAM) on the 5' and N,N,N,N-tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA) on the 3' end.
- ii) 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,N-tetramethyl-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 flagella hook** gene separately.

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Aranguren et al., 2010; GenBank Accession No.: MH230908.1; amplicon size 379 bp</u>			
<u><i>H. penaei</i>/16S rRNA gene</u>	Fwd NHPF2: CGT-TGG-AGG-TTC-GTC-CTT-CAG-T Rev NHPR2: GCC-ATG-AGG-ACC-TGA-CAT-CAT-C	200 nM	35 cycles: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/30 sec
<u>Method 2: Aranguren & Dhar, 2018; GenBank Accession No.: JQAI01000001.1; amplicon size 333 bp</u>			
<u><i>H. penaei</i>/ Flagella hook gene protein</u>	Fwd FlgE 1143F: AGG-CAA-ACA-AAC-CCT-TG Rev FlgE 1475R: GCG-TTG-GGA-AAG-TT	0.2 µM-200 nM	35 cycles; 95°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec

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- μ l total volume) for detection of *H. penaei* in shrimp hepatopancreas samples are: primers (0.2 μ M each), dNTPs (200 μ M each), Taq polymerase (0.1 U μ l⁻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

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

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 exist 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~~ is 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory-Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. ~~Hydrographical~~ 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) A positive result by real-time PCR
- ii) A 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:

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

¹ For example transboundary commodities.

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) A positive result by real-time PCR
- iv) A positive result by conventional PCR
- v) A positive result by *in-situ* hybridisation
- vi) A positive result by bioassay

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 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 followed by amplicon sequencing
- iii) ~~Histopathology consistent with *H. penaei* and positive *in-situ* hybridisation test~~ A positive result by *in-situ* hybridisation and real-time PCR
- iv) A positive result by *in-situ* hybridisation and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- v) ~~A positive result by bioassay followed by real-time PCR~~
- vi) ~~A positive result by bioassay followed by conventional PCR followed by 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

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 (no data are currently available for either). 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 (<i>n</i>)	DSp (<i>n</i>)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = 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 (<i>n</i>)	DSp (<i>n</i>)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = 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., BRIÑEZ B., ARAGON L., PLATZ C., CARABALLO X., SUAREZ A. & SALAZAR M. (2006). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) infected *Penaeus vannamei* female broodstock: effect on reproductive parameters nauplii and larvae quality. *Aquaculture*, **258**, 337–343.
- ARANGUREN L.F. & 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.
- BRINEZ 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 YEPÍZ-PLASCENCIA G., HERNÁNDEZ-LÓPEZ J., MENDOZA-CANO F., GARCÍA-SANCHEZ G. & GOLLAS-GALVÁN T. (2011). Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at –20°C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, **311**, 105–109.
- IBARRA-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: 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 a WOA Reference Laboratory for infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis)
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with *Hepatobacter penaei* (necrotising hepatopancreatitis).

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

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 *Decapod penstylhamaparvovirus 1*, of the Genus *Penstylhamaparvovirus* and Family *Parvoviridae* ~~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 ([GenBank NC_002190](#)), 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 South-East Asia (principally the Philippines) and Type 2 is from South-East Asia. These genotypes were shown to be are-infectious to *Penaeus vannamei* and *P. monodon* (Tang *et al.*, 2003). IHHNV genotypes in Ecuador and Peru were found to be within a separate lineage of IHHNV type 2 genotypes circulating within these countries (Aranguen Caro *et al.*, 2022). 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 IHNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: yellowleg shrimp (*Penaeus californiensis*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), and white leg 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 infection with IHNV 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 IHNV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.~~

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: ~~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*).~~

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Achiridae</u>	<u><i>Achirus mazatlanus</i></u>	<u>Mazatlan sole</u>
<u>Centropomidae</u>	<u><i>Centropomus medius</i></u>	<u>blackfin snook</u>
<u>Cichlidae</u>	<u><i>Oreochromis</i> sp.</u>	<u>tilapias</u>
<u>Clupeidae</u>	<u><i>Lile stolifera</i></u>	<u>Pacific piquitinga</u>
<u>Gerreidae</u>	<u><i>Gerres cinereus</i></u>	<u>yellowfin mojarra</u>
<u>Palaemonidae</u>	<u><i>Macrobrachium rosenbergii</i></u>	<u>giant river prawn</u>
<u>Penaeidae</u>	<u><i>Penaeus duorarum</i></u>	<u>northern pink shrimp</u>
	<u><i>Penaeus occidentalis</i></u>	<u>western white shrimp</u>
	<u><i>Penaeus japonicus</i></u>	<u>kuruma prawn</u>
	<u><i>Penaeus semisulcatus</i></u>	<u>green tiger prawn</u>
	<u><i>Artemesia longinaris</i></u>	<u>Argentine stiletto shrimp</u>
<u>Portunoidea-Portunidae</u>	<u><i>Callinectes arcuatus</i></u>	<u>Cuata swimcrab</u>
<u>Varunidae</u>	<u><i>Hemigrapsus penicillatus</i></u>	

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

IHNV 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 IHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

IHNV 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 IHNV 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

~~IHNV was found in wild crabs~~ has been detected in many crustacean and non-crustacean species however their (*Hemigrapsus penicillatus*, *Neohelice granulata*), but there were no clinical signs. Adults of *Macrobrachium rosenbergii* are carriers of IHNV without apparent signs. Although the mussel *Mytilus edulis* is an important reservoir of IHNV (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 IHNV varies among shrimp species and populations, where infections can be either acute or chronic. For example, in unselected populations of *P. stylirostris*, infection with IHNV results in acute, usually catastrophic, disease with mortalities approaching 100%. 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).

In contrast, in populations of *P. vannamei*, some selected lines of *P. stylirostris*, and some populations of *P. monodon*, infection with IHNV 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). 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.

~~Infection with IHNV 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).~~

There was no mortality or clinical signs of disease in *P. vannamei*, *P. monodon* or *P. stylirostris* when experimentally challenged with IHNV genotypes from Ecuador and Peru (Aranguen Caro *et al.*, 2022). The IHNV genotypes were found to be within a separate lineage of IHNV type 2 genotypes circulating within these countries (Aranguen Caro *et al.*, 2022).

~~In the past, stocks of *P. stylirostris*, juveniles, subadults, and adults showed persistently high mortality rates due to infection with IHNV. 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 IHNV 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 IHNV has been found in various surveys to range from 0 to 100%. Some reported mean values for IHNV prevalence in wild stocks are: 26% and 46% in *P. stylirostris* in the lower and upper Gulf of California, respectively (Pantoja *et al.*, 1999); 100% and 57%, respectively, in adult female and adult male *P. stylirostris* from the mid-region of the Gulf of California (Morales-Covarrubias *et al.*, 1999); 28% in wild *P. vannamei* collected from the Pacific coast of Panama (Nunan *et al.*, 2001); 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 IHNV 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

Animals with this disease may show one or more of these signs, but the pathogen may still be present in the absence of any signs. Clinical signs are non-specific, but juvenile *P. stylirostris* with acute infection with IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV 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.

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

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

Infection with IHNV 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).

2.3.3. Gross pathology

Infection with IHNV in Penaeus stylirostris

Infection with IHNV 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 IHNV show a marked reduction in food consumption, followed by changes in behaviour and appearance. Shrimp of this species infected with IHNV 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 IHNV, moribund shrimp are often distinctly bluish in colour, with opaque abdominal musculature (Lightner *et al.*, 1983).

Infection with IHNV in Penaeus vannamei

RDS, a chronic form of infection with IHNV, 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 IHNV (and thus RDS-free) usually show CVs of 10–30% (Lightner, 1996; Primavera & Quintio, 2000).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission of IHNV 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 IHNV 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 IHNV 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.

IHNV 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 WOAHS WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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 IHNV 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 IHNV (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 IHNV susceptibility in *P. vannamei* has been reported (Alcivar-Warren *et al.*, 1997).

2.4.5. Inactivation methods

IHNV 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

IHNV 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 IHNV contamination of spawned eggs and larvae but is not effective for preventing transovarian transmission of IHNV (Motte *et al.*, 2003).

2.4.7. General husbandry

Some husbandry practices have been successful in preventing the spread of IHNV. 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 IHNV (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

Specimens suitable for testing for infection with IHNV include postlarvae (PL), juveniles and adults. While IHNV may infect all life stages, virus load Infection with IHNV 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 IHNV.

3.2. Selection of organs or tissues

IHNV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissues for IHNV 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 IHNV (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).

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 bioassay

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-molecular techniques can be found in Section B. 2-5-5.5. 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. 2-2-5.3 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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	++	++	++	±
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						+	+	1		++	++	1
Bioassay					±	±	±	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 WOAH 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-marginated, hypertrophied nuclei of cells in tissues of ectodermal (epidermis, hypodermal epithelium of fore- and hindgut, nerve cord and nerve ganglia) and mesodermal origin (haematopoietic organs, antennal gland, gonads, lymphoid organ, and connective tissue). Intranuclear inclusion bodies caused by infection with IHHNV may be easily confused with developing intranuclear inclusion bodies caused by WSSV infection. ISH assay (see Section 4.6 *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

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can should be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances optical density or running a gel.

There are multiple geographical variants of IHHNV, some of which are not detected by all of the ~~some~~ 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; [Taengchaiyaphum *et al.*, 2022](#); 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 IHNV sequence but do not amplify IHNV-related EVEs present in the *P. monodon* stocks from Africa, Australia (Tang *et al.*, 2007), or Thailand (Saksmerprom *et al.*, 2011). Primer set 309F/R amplifies only a genomic segment of IHNV types 1 and 2 (the infectious forms of IHNV), 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 IHNV 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 IHNV (Dhar *et al.*, 2001; Tang & Lightner, 2001). A highly sensitive SYBR Green real-time PCR targeting a segment of the IHNV genome that is considered less susceptible to endogenisation was developed (Encinas-Garcia *et al.*, 2015). More recently, a TaqMan real-time assay capable of differentiating endogenous virus element-EVEs from infectious form of IHNV in *P. monodon* has been reported (Cowley *et al.*, 2018); however, analysis of a *P. monodon* whole genome sequence has identified 100% primer and probe sequence matches to EVEs (Taengchaiyaphum *et al.*, 2022). The real-time PCR method using TaqMan chemistry described in Table 4.4.1 below for IHNV generally follows the method used in Tang & Lightner (2001).

Table 4.4.1. Primers and probes for real-time PCR detection of IHNV

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1* Tang & Lightner, 2001; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266			
<u>IHNV and IHNV-related EVEs</u>	Fwd IHNV1608F: TAC-TCC-GGA-CAC-CCA-ACC-A Rev IHNV1688R: GGC-TCT-GGC-AGC-AAA-GGT-AA	300 nM primers 150 nM probe	40 cycles of: 95°C/1 sec and 60°C/20 sec
<u>non-structural protein</u>	Probe: FAM-ACC-AGA-CAT-AGA-GCT-ACA-ATC-CTC-GCC-TAT-TTG-TAMRA		

***NOTE – this method will amplify EVEs within the genome of *P. monodon*. Positive results in this species must be confirmed by a method that does not react with IHNV EVEs.**

- i) The PCR primers and TaqMan probe are selected from a region of the IHNV genomic sequence (GenBank AF218266) that encodes for a non-structural protein. The upstream (IHNV1608F) and downstream (IHNV1688R) primer sequences are: 5' TAC TCC GGA CAC CCA ACC A 3' and 5' GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA 3', respectively. The TaqMan probe 5' ACC AGA CAT AGA GCT ACA ATC CTC GCC TAT TTG 3', 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 (Krabsetsve *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 IHNV detection. Nested methods are also available. In addition to IHNV, some of these methods will amplify EVEs in *Penaeus monodon*. Positive results in *P. monodon* should be followed up with other methods that will not react with EVEs. 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.

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

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
<u>Method 1* Tang <i>et al.</i>, 2007; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 389 bp-product</u>			
IHNV and IHNV-related EVEs Non-structural protein	Fwd 389F: CGG-AAC-ACA-ACC-CGA-CTT-TA Rev 389R: GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	200 nM	35 cycles of: 94°C/30 sec, 60°C/30 sec, and 72°C/30 sec
<u>Method 2* Nunan <i>et al.</i>, 2000; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 356 bp-product</u>			
IHNV and IHNV-related EVEs Between the non-structural and capsid protein-coding regions	Fwd 77012F: TAC TCC GGA CAC CCA ACC A ATC GGT GCA CTA CTC GGA Rev 77353R: GGC TCT GGC AGC AAA GGT AA TCG TAC TGG CTG TTC ATC	1000 nM	35 cycles of: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec, and 72°C/30 sec
<u>Method 3* Tang <i>et al.</i>, 2000; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 392 bp-product</u>			
IHNV and IHNV-related EVEs Non-structural protein	Fwd 392F: GGG-CGA-ACC-AGA-ATC-ACT-TA Rev 392R: ATC-CGG-AGG-AAT-CTG-ATG-TG	300 nM	35 cycles of: 95°C/30 sec, 60°C/30 sec, and 72°C/30 sec
<u>Method 4 Tang <i>et al.</i>, 2007; GenBank Accession No.: Acc. No. AF218266; amplicon size 309 bp-product</u>			
IHNV ORF1	Fwd 309F: TCC-AAC-ACT-TAG-TCA-AAA-CCA-A Rev 309R: TGT-CTG-CTA-CGA-TGA-TTA-TCC-A	200 nM	35 cycles of: 94°C/30 sec, 55°C/30 sec, and 72°C/30 sec

***NOTE – these methods will amplify EVEs within the genome of *P. monodon*. Positive results in this species must be confirmed by a method that does not react with IHNV EVEs.**

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 IHNV
389R		GGC-CAA-GAC-CAA-AAT-ACG-AA	45%/71°C	(Tang <i>et al.</i> , 2007)	and IHNV-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 IHNV and IHNV-related EVEs

Primer	Product	Sequence (5'-3')	G+C%/Temp.	GenBank & References	Specificity
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 a real-time isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) assay are available to detect and confirm IHHNV infection have been published (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

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands must be sequenced and analysed and compared with published in comparison with reference sequences.

PCR products may be directly sequenced or cloned and sequenced when necessary to confirm infection with IHNV, to identify false positives or nonspecific amplification, or to distinguish the amplified products from the infectious form of the virus and demonstrate the presence of the non-infectious IHNV-related EVEs in the host genome (Tang & Lightner, 2006).

4.6. *In-situ* hybridisation

Direct detection methods using DNA probes specific for IHNV are available in dot-blot and ISH formats. The ISH method uses a DIG-labelled DNA probe for IHNV 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 IHNV diagnosis.

- i) For bioassay, feed the minced shrimp tissue suspected of being infected with IHNV 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 **molecular** test results are negative, then it is safe to conclude that the bioassay results are negative.

Known IHNV 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 IHNV 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status.¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Geographical-Hydrographical 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 IHNV 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 IHNV is considered to be confirmed if at least one of the following criterion criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR and a positive result by conventional PCR ~~targeting non-overlapping regions of the viral genome and followed by~~ 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 IHNV 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) Histopathology consistent with IHNV infection
- iii) Positive result by conventional PCR
- iii iv) Positive result by real-time PCR
- iv) ~~Histopathology consistent with IHNV infection~~
- v) Positive result by *in-situ* hybridisation
- vi) Positive result by bioassay

¹ For example transboundary commodities.

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) Positive result by real-time PCR and a positive result by conventional PCR targeting non-overlapping regions of the viral genome and followed by amplicon sequencing
- ii) ~~Histopathology consistent with IHNV infection coupled with A positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHNV~~ a positive result by real-time PCR
- iii) ~~Histopathology consistent with IHNV infection coupled with A positive result by *in-situ* hybridisation and detection of IHNV~~ by a positive result by conventional PCR and followed by 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 IHNV is provided in Table 6.3.1 (none no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with IHNV, 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, DSp = 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, DSp = 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 (IHNV) in cultured penaeid shrimp in Egypt. *Dis. Aquat. Org.*, **143**, 57–67.

ARANGUREN CARO L.F., GOMEZ-SANCHEZ M.M., PIEDRAHITA Y., MAL H.N., CRUZ-FLORES R., ALENTON R.R.R. & DHAR A.K. (2022). Current status of infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) in the Peruvian and Ecuadorian shrimp industry. *PLoS One*, **17**(8):e0272456. doi: 10.1371/journal.pone.0272456.

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). IHNV virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **38**, 185–194.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1987). IHNV disease of *Penaeus stylirostris*: effects of shrimp size on disease expression. *J. Fish Dis.*, **10**, 165–170.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 114 pp.
- BONAMI J.R., TRUMPER B., MARI J., BREHELIN M. & LIGHTNER D.V. (1990). Purification and characterization of IHNV virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2657–2664.
- 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., PRATANPIPAT P., SRIURARAIATANA S. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2004). Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. *Dis. Aquat. Org.*, **60**, 89–96.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- COWLEY J.A., RAO M., COMAN G.J. & COWLEY J. (2018). Real-time PCR tests to specifically detect Infectious hypodermal and haematopoietic 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 stylirostris* densovirus in penaeid shrimp. *J. Virol. Methods*, **212**, 53–58.
- FERNANDO M.C., ENRIQUEZ-ESPINOZA T., VALENZUELA-CASTILLO A., ENCINAS-GARCIA T. & SANCHEZ-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: BRAQQCON 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). IHNV virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. *J. World Aquacult. Soc.*, **22**, 235–243.
- KRABETSVE 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 IHNV 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 stylirostris* from the upper Gulf of California, Mexico. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 296–301.
- MOTTE, E., YUGCHA E., LUZARDO J., CASTRO F., LECLERCQ G., RODRÍGUEZ J., MIRANDA P., BORJA O., SERRANO J., TERREROS M., MONTALVO K., NARVÁEZ A., TENORIO N., CEDEÑO V., MIALHE E. & BOULO V. (2003). Prevention of IHHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, **219**, 57–70.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2000). Use of polymerase chain reaction (PCR) for the detection of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in penaeid shrimp. *Mar. Biotechnol.*, **2**, 319–328.
- NUNAN L.M., ARCE S.M., STAHA R.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Prevalence of Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) and White spot syndrome virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Pacific Ocean off the coast of Panama. *J. World 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. & QUINITIO 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 stylirostris* 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.
-

TAENGCHAIYAPHUM S., WONGKHALUANG P., SITTIKANKAEW K., KAROONUTHAISIRI N., FLEGEL T.W. & SRITUNYALUCKSANA K. (2022). Shrimp genome sequence contains independent clusters of ancient and current Endogenous Viral Elements (EVE) of the parvovirus IHNV. *BMC Genomics*, **23**, 565. doi: 10.1186/s12864-022-08802-3.

TANG K.F.J., DURAND S.V., WHITE B.L., REDMAN R.M., PANTOJA C.R. & LIGHTNER D.V. (2000). Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. *Aquaculture*, **190**, 203–210.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2001). Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 79–85.

TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2006). Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHNV) 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 (IHNV) 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 (IHNV) 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 (IHNV). *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 (IHNV) by real-time, isothermal recombinase polymerase amplification assay. *Arch. Virol.*, **160**, 987–994.

*
* *

NB: There are WOAHP Reference Laboratories for infection with infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:

<http://www.woah.org/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

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

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

CHAPTER 2.2.5.

INFECTION WITH
INFECTIOUS MYONECROSIS VIRUS

1. Scope

Infection with infectious myonecrosis virus means infection with the pathogenic agent infectious myonecrosis virus (IMNV) that is tentatively assigned to the Family *Totiviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

~~Phylogenetic analysis of its RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene coding sequence indicates that IMNV is most closely related to *Giardia lamblia* virus, tentatively assigned to the family *Totiviridae*—a member of the family *Totiviridae* (Fauquet *et al.*, 2005; Lightner, 2011; Nibert, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Wickner *et al.*, 2011).~~

IMNV particles are icosahedral in shape and 40 nm in diameter, with a buoyant density of 1.366 g ml⁻¹ in caesium chloride. The genome consists of a single, double-stranded (ds) RNA molecule of 8226–8230 bp (Loy *et al.*, 2015; Naim *et al.*, 2015). Sequencing of the viral genome reveals two non-overlapping open reading frames (ORFs). The first ORF (ORF1, 470–5596 nt) encodes a putative RNA-binding protein and a capsid protein. The coding region of the RNA-binding protein is located in the first half of ORF1 and contains a dsRNA-binding motif in the first 60 amino acids. The second half of ORF1 encodes a capsid protein, as determined by amino acid sequencing, with a molecular mass of 106 kDa. The second ORF (ORF2, 5884–8133 nt) encodes a putative RdRp (Poulos *et al.*, 2006). The most variable region of IMNV genome is located in the first half of ORF1, coinciding with a region which probably encodes the capsid protrusions (Dantas *et al.*, 2015).

The complete genomes of IMNV types originating from Brazil and Indonesia have been sequenced and found to be 99.6% identical at the nucleotide level (Poulos *et al.*, 2006; Senapin *et al.*, 2007). The 99.6% full genome sequence identity (and anecdotal information on the introduction of *Penaeus vannamei* stocks from Brazil) indicate that the disease was introduced from Brazil to Indonesia in 2006. A new genotype was analysed in infected samples in 2018 in Indonesia, including an isolate that contains a deletion of 622 amino acids (Mai *et al.*, 2019).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

No data.

2.1.3. Survival and stability outside the host

No information available.

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 IMNV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: brown tiger prawn (*Penaeus esculentus*), banana prawn (*P. merguensis*), and 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 IMNV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) and blue shrimp (*P. stylirostris*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following organisms, but an active infection has not been demonstrated: southern brown shrimp (*P. subtilis*).

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

Juveniles and subadults of *P. vannamei*, farmed in marine, brackish, and low salinity brackish water, appear to be most severely affected by infection with IMNV (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The principal target tissues for IMNV include the striated muscles (skeletal and less often cardiac), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ parenchymal cells (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some members of populations of *P. vannamei* that survive IMNV infections or epizootics may carry the virus.

2.2.6. Vectors

Experimental studies have demonstrated that brine shrimp *Artemia franciscana* can act as a vector for IMNV (da Silva *et al.*, 2015).

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In early juvenile, juvenile, or adult *P. vannamei* in regions where infection with IMNV is enzootic, outbreaks of IMNV infections associated with sudden high morbidity and mortality may follow 'stress' events such as capture by cast-netting, feeding and sudden changes in water salinity or temperature (Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). Feed conversion ratios of affected populations can increase from a normal value of ~ 1.5 up to 4.0 or higher (Andrade *et al.*, 2007). Mortalities from infection with IMNV can range from 40% to 70% in cultivated *P. vannamei*.

In regions where infection with IMNV is enzootic in farmed stocks of *P. vannamei*, its prevalence may reach 100% (Andrade *et al.*, 2007; Nunes *et al.*, 2004).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Affected shrimp present with visibly white tails. Such severely affected shrimp may have been feeding just before the onset of stress and may have a full gut. High mortality can occur suddenly and continue for several days. A sudden onset of clinical signs may have a sudden onset occur following stress events (e.g. capture by cast-netting, feeding, and sudden changes in temperature or salinity).

Only shrimp in the acute phase of disease present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp become lethargic during or soon after stress events such as capture by cast-netting, feeding, sudden changes in water temperature, sudden reductions in water salinity, etc.

2.3.3 Gross pathology

Shrimp in the acute phase of disease present focal-to-extensive white necrotic areas in striated (skeletal) muscles, especially in the distal abdominal segments and tail fan, which can become necrotic and reddened in some individual shrimp.

Exposing the paired lymphoid organs (LO) by simple dissection will show that they are hypertrophied (3–4 times their normal size) (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

IMNV has been demonstrated to be transmitted horizontally by cannibalism (Lightner, 2011; Poulos *et al.*, 2006). Transmission via water probably occurs. Although vertical transmission is suspected from anecdotal evidence, it is not known whether this occurs via transovarial mechanism or by surface contamination of newly spawned eggs.

2.3.5. Environmental factors

Temperature and salinity effects are likely predisposing factors to disease outbreaks, but no experimental data are available (Nunes *et al.*, 2004).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with IMNV has been reported to occur in some countries in the Americas, Asia and Africa (Aly *et al.*, 2021; Andrade *et al.*, 2007; Lightner *et al.*, 2004; Naim *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006; Sahul *et al.*, 2017).

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

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for infection with IMNV are available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Ctn[15-34], a cathelicidin-derived eicosapeptide was found to demonstrate antiviral activity against IMNV in primary haemocyte cultures (Vieira-Girao *et al.*, 2017).

2.4.3. Immunostimulation

No data.

2.4.4. Breeding resistant strains

There are anecdotal reports of some selected lines of *P. vannamei* having better survival and culture performance in farms where infection with IMNV is enzootic. During a 20-day controlled laboratory study in which the shrimp were challenged with IMNV, some domesticated lines of *P. vannamei* were found to survive better than other lines (White-Noble *et al.*, 2010).

Penaeus monodon and *P. stylirostris*, for which there is incomplete evidence of susceptibility (see section 2.2.2), are considered to be more resistant to infection with IMNV than *P. vannamei* (Tang *et al.*, 2005).

2.4.5. Inactivation methods

No data.

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

While IMNV is believed to be transmitted vertically, there are no scientific data confirming this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is a good management practice recommended to reduce the potential for transmission of a number of penaeid shrimp diseases from female spawners to their eggs or larvae, and the practice may reduce IMNV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.7. General husbandry

Management practices in endemic areas principally involves exclusion of IMNV from shrimp farms. Broodstock or their spawned eggs or nauplii are PCR-tested and those that test positive are discarded (Andrade *et al.*, 2007). Following and restocking of affected farms or entire culture regions with IMNV-free stocks of *P. vannamei* most suited to local culture conditions has proven to be the most successful for preventing and controlling other virus diseases of shrimp, and should be applicable to control and prevent infection with IMNV (Lee & O'Bryen, 2003; Lightner, 2005; Lightner *et al.*, 2009; Moss & Moss, 2009).

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

Specimens suitable for testing for infection with IMNV using molecular methods (e.g. RT-PCR, nested RT-PCR, real-time RT-PCR, etc.) include postlarvae (PL), juveniles, subadults and adults. While IMNV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in larval stages, so these life stages may not be suitable for demonstrating freedom from infection with IMNV unless validated for those life stages.

3.2. Selection of organs or tissues

IMNV infects tissues of mesodermal origin. The principal target tissues in the acute phase of infection with IMNV are the striated muscles (skeletal and less commonly cardiac muscle), connective tissues, haemocytes, and the lymphoid organ tubule parenchymal cells. In chronic infections, the lymphoid organ may be the principal target tissue.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

IMNV replicates systemically but does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of IMNV infection.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

3.5. Preservation of samples for submission

Several factors can affect specimen quality during collection, handling and storage, such as exposure to light, heat, desiccation, and incomplete preservation. Hence, standard operating protocols or recommended practices should be followed at all steps of the diagnostic process.

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

3.5.1. Samples for pathogen isolation

Not applicable.

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples (pleopods, cephalothorax, muscle, haemolymph) 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.

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 2.3.0 *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. 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 fry can be pooled to obtain the minimum amount of material for 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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					++	++	++	2				
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+	++	++	1	++	++	++	2	++	++	++	2
Conventional RT-PCR	+	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												
Other antigen detection methods												
Other methods												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

4.1. Wet mounts

Stained or unstained tissue squashes of affected skeletal muscle or of the LO may show abnormalities. Tissue squashes of skeletal muscle when examined with phase or reduced light microscopy may show loss of the normal striations. Fragmentation of muscle fibres may also be apparent. Squashes of the LO may show the presence of significant accumulations of spherical masses of cells called lymphoid organ spheroids (LOS) amongst normal LO tubules.

4.2. Histopathology and cytopathology

Infection with IMNV in the acute and chronic phases can be presumptively diagnosed using histology (Bell & Lightner, 1988; Lightner, 2011; Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006). However, the lesions in striated muscles and LO are not pathognomonic for infection with IMNV. White tail disease of penaeid shrimp caused by the *P. vannamei* nodavirus (PvNV) can mimic infection with IMNV (Tang *et al.*, 2007).

Haematoxylin and eosin stained tissue sections from shrimp with acute-phase infection with IMNV present myonecrosis with characteristic coagulative necrosis of striated (skeletal) muscle fibres, often with marked oedema among affected muscle fibres. Some shrimp may present a mix of acute and older lesions. The affected muscle fibres appear to progress from presenting coagulative necrosis to liquefactive necrosis, which is accompanied by moderate infiltration and accumulation of haemocytes. In the most advanced lesions, haemocytes and inflamed muscle fibres are replaced by a loose matrix of fibrocytes and connective tissue fibres that are interspersed with haemocytes and foci of (presumed) regenerating muscle fibres (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

Significant hypertrophy of the LO caused by accumulations of LOS is a highly consistent lesion in shrimp with acute or chronic-phase infection with IMNV lesions. Often, many ectopic LOS are found in other tissues not near the main body of the LO. Common locations for ectopic LOS include the haemocoelom in the gills, heart, near the antennal gland tubules, and ventral nerve cord (Lightner *et al.*, 2004; Poulos *et al.*, 2006).

4.3. Cell culture for isolation

No crustacean cell lines exist, but IMNV was observed to propagate in C6/36 subclone of *Aedes albopictus* cell line (Kumar *et al.*, 2020). Performance of the test should be confirmed before being recommended.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

Published methods are available for the molecular detection of IMNV by *in-situ* hybridisation (ISH), nested RT-PCR and quantitative real-time RT-PCR (Andrade *et al.*, 2007; Poulos *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2005). A nested RT-PCR kit for detection of the virus is available commercially.

4.4.1. Real-time RT-PCR

A real-time RT-PCR method was developed to detect and quantify IMNV in shrimp tissue. The method which can detect as few as 10 IMNV RNA copies μl^{-1} total RNA (Andrade *et al.*, 2007) is summarised below.

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
------------------------	----------------------	---------------	--------------------

Method 1: Andrade <i>et al.</i> , 2007; GenBank Accession No.: AY570982			
IMNV Capsid protein gene	Fwd IMNV412F: GGA-CCT-ATC-ATA-CAT-AGC-GTT-GCA Rev IMNV545R: AAC-CCA-TAT-CTA-TTG-TCG-CTG-GAT Probe: CCA-CCT-TTA-CTT-TCA-ATA-CTA-CAT-CAT-CCC-CGG	300 Nm 200 nM	40 cycles of: 95°C/3 sec and 60°C/30 sec

4.4.2. Conventional PCR

The nested RT-PCR method to detect IMNV uses two PCR primer sets that produce a 328 bp one-step amplicon and 139 bp two-step amplicon. The 1-step PCR can detect as little as 100 IMNV RNA copies and the 2-step PCR can detect in the order of 10 IMNV RNA copies (Poulos & Lightner, 2006).

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Poulos & Lightner, 2006; GenBank Accession No.: KJ636783.2; amplicon size: 328/139 bp			
IMNV Capsid protein gene (nested-PCR)	<u>Outer-Primary</u> Fwd 4587F: CGA-CGC-TGC-TAA-CCA-TAC-AA Rev 4914R: ACT-CGG-CTG-TTC-GAT-CAA-GT	200 nM	45 cycles of: 95°C/45 sec; 60°C/45 sec; 60°C/7 min
	<u>Inner-Nested</u> Fwd 4725 NF: GGC-ACA-TGC-TCA-GAG-ACA Rev 4863 NR: AGC-GCT-GAG-TCC-AGT-CTT-G	620 nM	39 cycles of: 95°C/30 sec, 65°C/30 sec, 72°C/30 sec; 72°C/2 min

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

DNA probe for ISH detection of IMNV

A cDNA library was generated from RNA extracted from purified IMNV. A IMNV-specific ISH DNA probe is prepared from clone IMNV-317 by PCR labelling with digoxigenin-11-dUTP (DIG). The PCR primers used for amplification of the 993 bp probe are IMNV993F (5'-AAC-ACA-AAA-TCT-GCC-AGC-AA-3') and IMNV993R (5'-CCC-AAC-CAC-CCA-AAT-TCA-TA-3'). Following PCR, the DIG-labelled DNA probe is precipitated with ethanol, re-suspended in water and stored at -20°C until used. The ISH procedure for detecting IMNV follows that outlined by Tang *et al.* (2005). Negative and positive controls should be sourced from PCR-confirmed uninfected and infected shrimp, respectively.

4.7. Immunohistochemistry

Monoclonal antibodies have been generated using recombinant IMNV capsid protein fragments to immunise mice (Kunanopparat *et al.*, 2011). Immunohistochemical analysis demonstrated strong reactivity in muscle, gill, heart, LO and connective tissue derived from IMNV-infected *P. vannamei* similar to that demonstrated by *in-situ* hybridisation (Tang *et al.*, 2005). There was no cross-reactivity to tissues derived from uninfected shrimp or shrimp infected with other viral pathogens such as WSSV, YHV, TSV among others.

4.8. Bioassay

Not applicable.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

None are recommended, however an immunochromatographic strip test has been developed (Chaivisuthangkura *et al.*, 2013) using the monoclonal antibodies developed by Kunanopparat *et al.* (2011). While the test is simple, fast and low-cost it is approximately 300-fold less sensitive than one-step RT-PCR (Chaivisuthangkura *et al.*, 2013).

4.10. Other methods

A chromatographic method for detection of PCR amplicons has been developed (Koiwai *et al.*, 2018).

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

Real-time RT-PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with IMNV in apparently healthy populations as described in Section 4.1.1.

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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free. There are currently no WOA Reference Laboratories designated for IMN.~~

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status.¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 IMNV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- ~~iv) Histopathology consistent with the presence of the pathogen or the disease~~
- i) Positive result by real-time RT-PCR
- ii) Positive result by conventional RT-PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

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

- i) Positive result by real-time RT-PCR and positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

¹ For example transboundary commodities.

- ii) ~~Histopathology consistent with IMNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IMNV in a tissue sample by real-time RT-PCR~~
- v) ~~Histopathology consistent with IMNV infection coupled with *in-situ* hybridisation and detection of IMNV in a tissue sample by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing~~

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 IMNV 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 RT-PCR
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Histopathology consistent with the presence of the pathogen or the disease

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) Positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR
- vi) Positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IMNV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with IMNV, 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	Experimentally infected SPF <i>P. vannamei</i>	abdominal muscle	<i>P. vannamei</i>	100 (<u>n=30</u>)	100 (<u>n=30</u>)	Histopathology	Andrade <i>et al.</i> (2007)

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = 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
-----------	--------------	--------------------	------------------------	---------	---------	---------	----------------	----------

Real-time PCR								
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = 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. doi: 10.3354/dao03556. PMID: 33570040.
- ANDRADE T.P.D., SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2007). Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of infectious myonecrosis virus (IMNV). *Aquaculture*, **264**, 9–15.
- BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 114 p.
- CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., WANGMAN P., LONGYANT S. & SITHIGORNUL P. (2013). Simple and rapid detection of infectious myonecrosis virus using an immunochromatographic strip test. *Arch Virol.*, **158**, 1925–1930.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- DANTAS M.D., CHAVANTE S.F., TEIXEIRA D.I., LIMA J.P. & LANZA D.C. (2015). Analysis of new isolates reveals new genome organization and a hypervariable region in infectious myonecrosis virus (IMNV). *Virus Res.*, **20**, 66–71. doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.015. Epub 2015 Apr 4. PMID: 25849112.
- DA SILVA S.M.B.C., LAVANDER H.D., DE SANATANA LUNA M.M., DA SILVA A.O.M.E., GALVEZ A.O. & COIMBRA M.R.M. (2015). *Artemia franciscana* as a vector for infectious myonecrosis virus (IMNV) to *Litopenaeus vannamei* juvenile. *J. Invertebr. Pathol.*, **126**, 1–5.
- FAUQUET C.M., MAYO M.A., MANILOFF J., DESSELBERGER U. & BALL L.A., EDITORS (2005). Totiviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Francisco, USA, pp. 571–580.
- KOIWAI K., KODERA T., THAWONSUWAN J., RIANI S., KAWASE M., KONDO H. & HIRONO I. (2018). Rapid diagnosis of three shrimp RNA viruses using RT-PCR-DNA chromatography. *J. Fish Dis.*, 2018 May 28. doi: 10.1111/jfd.12821. Epub ahead of print. PMID: 29806113.
- KUNANOPPARAT A., CHAVISUTHANGKURA P., SENAPIN S., LONGYANY S., RUKPRATANPORN S., FLEGEL T.W. & SITHIGORNGUL P. (2011). Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. *J. Virol. Methods*, **171**, 141–148.
- LEE C.S. & O'BRYEN P.J., EDITORS (2003). *Biosecurity in Aquaculture Production Systems: Exclusion of Pathogens and Other Undesirables*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 293 p.
- LIGHTNER D.V. (2005). Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *J. World Aquac. Soc.*, **36**, 229–248.
- LIGHTNER D.V. (2011). Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J. Invertebr. Pathol.*, **106**, 110–130.

-
- LIGHTNER D.V., PANTOJA C.R., POULOS B.T., TANG K.F.J., REDMAN R.M., PASOS DE ANDRADE T. & BONAMI J.R. (2004). Infectious myonecrosis: new disease in Pacific white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, **7**, 85.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK, pp. 384–424.
- LOY D.S., LIU S., MOGLER M.A., LOY D.J., BLITVICH B.J. & BARTHOLOMAY L.C. (2015). Characterization of newly revealed sequences in the infectious myonecrosis virus genome in *Litopenaeus vannamei*. *J. Gen. Virol.*, **96** (Pt 7), 1821–1819.
- MAI H.N., HANGGONO B., CARO L.F.A., KOMARUDDIN U., NUR'AINI Y.L. & DHAR A.K. (2019). Novel infectious myonecrosis virus (IMNV) genotypes associated with disease outbreaks on *Penaeus vannamei* shrimp farms in Indonesia. *Arch. Virol.*, **164**, 3051–3057. doi: 10.1007/s00705-019-04408-5. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31531743.
- MOSS S.M. & MOSS D.R. (2009). Chapter 17: Selective breeding of penaeid shrimp. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 425–452.
- NAIM S., BROWN J.K. & NIBERT M.L. (2014). Genetic diversification of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus between Indonesia and Brazil. *Virus Res.*, **189**, 99–105.
- NAIM S., TANG K.F.J., YANG M., LIGHTNER D.V. & NIBERT M.L. (2015). Extended genome sequences of penaeid shrimp infectious myonecrosis virus strains from Brazil and Indonesia. *Arch. Virol.*, **160**, 1579–1583.
- NIBERT M.L. (2007). '2A-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1315–1318.
- NUNES A.J.P., CUNHA-MARTINS P. & VASCONSELOS-GESTEIRA T.C. (2004). Carcinicultura ameaçada. *Rev. Panoram. Aquic.*, **83**, 37–51 (in Portuguese).
- POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2006). Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 69–72.
- POULOS B.T., TANG K.F.J., PANTOJA C.R., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (2006). Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **87**, 987–996.
- SAHUL HAMEED A.S., ABDUL MAJEED S., VIMAL S., MADAN N., RAJKUMAR T., SANTHOSHKUMAR S. & SIVAKUMAR S. (2017). Studies on the occurrence of infectious myonecrosis virus in pond-reared *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in India. *J. Fish Dis.*, **40**, 1823–1830. doi: 10.1111/jfd.12655. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28631825
- SANTHOSH KUMAR S., SIVAKUMAR S., ABDUL MAJEED S., VIMAL S., TAJU G. & SAHUL HAMEED A.S. (2021). *In vitro* propagation of infectious myonecrosis virus in C6/36 mosquito cell line. *J. Fish Dis.*, **44**, 987–992. doi: 10.1111/jfd.13359. Epub 2021 Feb 25. PMID: 33631045.
- SENAPIN S., PHEWSAIYA K., BRIGGS M. & FLEGEL T.W. (2007). Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. *Aquaculture*, **266**, 32–38.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., POULOS B.T., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2005). *In situ* hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 261–265.
- TANG K.F.J., PANTOJA C.R., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (2007). Development of *in situ* hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 183–190.
-

VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.

VIEIRA-GIRÃO P.R.N., FALCÃO C.B., ROCHA I.R.C.B., LUCENA H.M.R., COSTA F.H.F. & RÁDIS-BAPTISTA G. (2017). Antiviral Activity of Ctn[15–34], A Cathelicidin-Derived Eicosapeptide, Against Infectious Myonecrosis Virus in *Litopenaeus vannamei* Primary Hemocyte Cultures. *Food Environ. Virol.*, **9**, 277–286. doi: 10.1007/s12560-017-9285-5. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28210987.

WHITE-NOBLE B.L., LIGHTNER D.V., TANG K.F.J. & REDMAN R. (2010). Lab challenge for selection of IMNV-resistant white shrimp. *Global Aquaculture Advocate*, July/August, 71–73.

Wickner R.B., Ghabrial S.A., Nibert M.L., Patterson J.L. & Wang C.C. (2011). Totiviridae. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Elsevier, San Diego, USA.

*
* *

NB: At the time of publication (2022) there was no WOA Reference Laboratory for infection with infectious myonecrosis virus (please consult the WOA web site: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

NB: FIRST ADOPTED IN 2009. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.7.

INFECTION WITH TAURA SYNDROME VIRUS

1. Scope

Infection with Taura syndrome virus means infection with the pathogenic agent Taura syndrome virus (TSV), Genus Aparavirus, Family *Dicistroviridae*, Order Picornavirales.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

TSV was described as the cause of the disease commonly known as Taura syndrome by Hasson *et al.* (1995), Bonami *et al.* (1997) and Mari *et al.* (1998; 2002). At least four genotypes (strains) of TSV have been documented based on the gene sequence encoding VP1 the largest and presumably dominant of the three major structural proteins of the virus. Based on VP1 sequence variations, these genotypic groups are: 1) the Americas group; 2) the South-East Asian group; 3) the Belize group; and 4) the Venezuelan group (Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Wertheim *et al.*, 2009).

At least two distinct antigenic variants of TSV have been identified by their differential reactivity to monoclonal antibody MAb 1A1, produced using a reference isolate from the Americas (TSV USA-HI94 – GenBank AF277675) (Poulos *et al.*, 1999) as the immunogen: Type A represents those that react with MAb 1A1 (in the enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], Western blots and immunohistochemistry (IHC) with infected tissues) and those that do not were subdivided into Type B (TSV 98 Sinaloa, Mexico) and Type C (TSV 02 Belize), based on host species and virulence. All TSV isolates of the Americas and most, if not all, South-East Asian genotypes react with MAb 1A1. In marked contrast, none of the Belize genotype group reacts with MAb 1A1 (Robles-Sikisaka *et al.*, 2002), nor does a TSV isolate from the 2005 epizootic in Venezuelan shrimp farms.

TSV particles are 32 nm in diameter, non-enveloped icosahedrons and have a buoyant density of 1.338 g ml⁻¹ in CsCl. The genome of TSV consists of a linear, positive-sense single-stranded RNA 10,205 nucleotides in length, excluding the 3' poly-A tail, and it contains two large open reading frames (ORFs). ORF 1 contains the sequence motifs for non-structural proteins, such as helicase, protease and RNA-dependent RNA polymerase. ORF 2 contains the sequences for TSV structural proteins, including the three major capsid proteins VP1, VP2 and VP3 (55, 40, and 24 kDa, respectively). The virus replicates in the cytoplasm of host cells (Bonami *et al.*, 1997; Mari *et al.*, 1998; 2002; Robles-Sikisaka *et al.*, 2001).

Other reported causes of Taura syndrome: TS in Ecuador was initially linked to fungicide contamination of shrimp farms, a contention that was supported by litigation for ~16 years after the disease was scientifically shown to have a viral aetiology (Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995). Hence, several papers in the literature propose a toxic aetiology for TS (Intriago *et al.*, 1997; Jimenez, 1992; Jimenez *et al.*, 2000).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

No information available.

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 TSV according to Chapter 1.5 of *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), greasyback shrimp (*Metapenaeus ensis*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), 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 infection with TSV according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: fleshy prawn (*Penaeus chinensis*), giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*), the copepod *Ergasilus manicatus*, and the barnacles *Chelonibia patula* and *Octolasmis muelleri*. Evidence is lacking for these species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is TSV, 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 species, but no active infection has been demonstrated: blue crab (*Callinectes sapidus*), the crabs *Uca vocans* and *Sesarma mederi*, gulf killifish (*Fundulus grandis*), Indo-Pacific swamp crab (*Scylla serrata*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*) and southern white shrimp (*P. schmitti*).

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

Infection with TSV has been documented in all life stages (i.e. post-larvae [PL], juveniles and adults) of *P. vannamei* except eggs, zygotes and larvae (Lightner, 1996a).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

Using injection and *per os* challenge experiments, Nunan *et al.* (2004) demonstrated TSV could be detected in different body parts including gills, head, whole tail, tail muscle, pleopod and tail fan (Nunan *et al.*, 2004). While there was no significant difference in the viral copy number contained in different body parts when TSV was administered via injection, there was a statistically significant difference between tail/gills, tail/head, tail/tail fan, whole tail/tail fan and pleopods/tail fan when the viral inoculum was administered *per os*. The tail samples had the lower viral copy numbers, as did the whole tail and pleopods when compared to the tail fan (Nunan *et al.*, 2004).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Not demonstrated unequivocally

2.2.6. Vectors

Sea birds: TSV has been demonstrated to remain infectious for up to 48 hours (after ingestion of TSV-infected shrimp carcasses) in the faeces passed by wild or captive sea gulls (*Larus atricilla*) and chickens (*Gallus gallus*, used as a laboratory surrogate for all shrimp-eating birds) thus suggesting that the virus can retain infectivity when passed through the gastrointestinal system of any bird species. These findings implicate birds as being an important mechanical vector for the transmission of the virus within affected farms or farming regions (Garza *et al.*, 1997; Vanpatten *et al.*, 2004).

Aquatic insects: the water boatman (*Trichocorixa reticulata* [Corixidae], an aquatic insect that feeds on shrimp carcasses in shrimp farm ponds) have been demonstrated to transport TSV within their intestinal contents, but are not directly infected by the virus (Brock, 1997; Lightner, 1996a; 1996b; reviewed in Dhar *et al.*, 2004).

2.3. Disease pattern

Infection with TSV is best known as a disease of nursery- or grow-out-phase *P. vannamei* that occurs within ~14–40 days of stocking PLs into grow-out ponds or tanks, hence, shrimp with TSV infection are typically small (~0.05 g to <5 g) juveniles. Larger shrimp may also be affected, especially if they are not exposed to the virus until they are larger juveniles or adults (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Lightner, 1996a, 1996b; Lotz, 1997).

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

At the farm level, outbreaks of infection with TSV involving stocks of *P. vannamei* (the principal host species for infection with TSV) not selected for resistance, typical cumulative mortalities range from 40 to >90% in cultured populations of PL, juvenile, and subadult life stages. TSV-resistant lines of *P. vannamei* are available which show survival rates of up to 100% in laboratory challenge with all four TSV genotypes (Lightner *et al.*, 2009).

In regions where the virus is enzootic in farmed stocks, the prevalence of infection with TSV has been found in various surveys to range from 0 to 100% (Brock, 1997; Jimenez *et al.*, 2000).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Only acute-phase clinical infection with TSV can be presumptively diagnosed from clinical signs. See Section 4.2 for a description of gross clinical signs presented by shrimp with acute-phase clinical infection with TSV.

Only shrimp with acute-phase clinical infection with TSV present behavioural changes. Typically, severely affected shrimp apparently become hypoxic and move to the pond edges or pond surface where dissolved oxygen levels are higher. Such shrimp may attract seabirds in large numbers. In many disease outbreaks, it is the large numbers of seabirds attracted to the moribund shrimp that first indicates the presence of a serious disease outbreak (which is often either infection with TSV or white spot syndrome virus) to the farm manager.

2.3.3. Gross pathology

Infection with TSV has three distinct phases, acute, transition, and chronic, which are grossly distinguishable (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1995). Gross signs presented by juvenile, subadult and adult shrimp in the transition phase of infection with TSV are unique and provide a suspicion of infection.

Acute phase: gross signs displayed by moribund *P. vannamei* with acute-phase infection with TSV include expansion of the red chromatophores giving the affected shrimp a general, overall pale reddish colouration and making the tail fan and pleopods distinctly red; hence 'red tail' disease was one of the names given by farmers when the disease first appeared in Ecuador (Lightner *et al.*, 1995). In such shrimp, close inspection of the cuticular epithelium in thin appendages (such as the edges of the uropods or pleopods) with a ×10 hand lens reveals signs of focal epithelial necrosis. Shrimp showing these gross signs of acute infection with TSV typically have soft shells, an empty gut and are often in the late D stages of the moult cycle. Acutely affected shrimp usually die during ecdysis.

Transition (recovery) phase: although only present for a few days during outbreaks of infection with TSV, the gross signs presented by shrimp in the transition phase can provide a suspicion of infection with TSV. During the transition phase (which may be occurring while many shrimp in the affected populations are still in the acute phase and daily mortalities are high), fair to moderate numbers of shrimp in affected ponds show random, multifocal, irregularly shaped melanised cuticular lesions. These melanised spots are haemocyte accumulations indicating the sites of resolving TSV lesions in the cuticular epithelium. Such shrimp may or may not have soft cuticles and red-chromatophore expansion, and may be behaving and feeding normally (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a).

Chronic phase: after successfully moulting, shrimp in the transition phase move into the chronic phase of infection with TSV in which persistently infected shrimp show no obvious signs of disease (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b; Lightner *et al.*, 1995). However, *P. vannamei* that are chronically infected with TSV may be less resistant to normal environmental stressors (i.e. sudden salinity reductions) than uninfected shrimp.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Not applicable.

2.3.5. Environmental factors

Outbreaks of infection with TSV are more frequent when salinities are below 30 ppt (Jimenez *et al.*, 2000).

2.3.6. Geographical distribution

TSV is now widely distributed in the shrimp-farming regions of the Americas, South-East Asia and the Middle East (Brock, 1997; Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a, 1996b; Lightner *et al.*, 2012; Lotz *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Tang & Lightner, 2005; Tu *et al.*, 1999; Wertheim *et al.*, 2009; Vergel *et al.*, 2019; Yu & Song, 2000).

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

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No effective vaccines for TSV are available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No scientifically confirmed reports of effective chemotherapy treatments.

2.4.3. Immunostimulation

No scientifically confirmed reports of effective immunostimulation treatments.

2.4.4. Breeding resistant strains

After TSV emerged in Ecuador in 1992–1994, *P. stylirostris* were found that possessed resistance to infection with TSV (genotype 1, MAb 1A1 Type A). Following on from this discovery and due to the disease occurrence in Mexico in 1994 where it caused crop failures of *P. vannamei*, selected lines of TSV-resistant *P. stylirostris* became the dominant shrimp farmed in western Mexico from 1995. However, in 1998–1999, a new 'strain' of TSV (Type B; Fegan & Clifford, 2001; Lightner, 1999; 2005; Zarain-Herzberg & Ascencio, 2001) emerged and caused massive epizootics in *P. stylirostris*. The emergence of this new 'strain' of TSV was soon followed in late 1999 by the introduction of white spot syndrome virus (WSSV) into shrimp farms in western Mexico, to which *P. stylirostris* had no resistance, effectively ending any interest in the culture of *P. stylirostris* in Mexico.

TSV-resistant domesticated stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* have been developed. Some domesticated lines of TSV-resistant *P. vannamei* (that are also TSV-free) are in widespread use by the shrimp-farming industries of the Americas and South-East Asia (Clifford, 1998; White *et al.*, 2002). After the appearance of infection with TSV in Central America, improved TSV resistance was reported in wild caught *P. vannamei* PLs used to stock shrimp farms in the region. Currently all genetic lines of *P. vannamei* shrimp that are being cultured in Asia and the Americas contain varying levels of tolerance/resistance to TSV.

2.4.5. Inactivation methods

No information available.

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

It is possible that TSV might be transmitted vertically (transovarian transmission), despite the lack of published reports documenting this route of transmission. Disinfection of eggs and larvae (Chen *et al.*, 1992) is good management practice and it is recommended for its potential to reduce TSV contamination of spawned eggs and larvae produced from them.

2.4.7. General husbandry

Some husbandry and disease control and management practices have been used successfully to reduce the risks of infection with TSV occurring during farm grow-out. These include the application of PCR assays for pre-screening of wild or pond-reared broodstock or their spawned eggs/nauplii and discarding those that test positive for the virus (Fegan & Clifford, 2001), fallowing and restocking of entire culture regions with TSV-free stocks (Dixon & Dorado, 1997), and the development of specific pathogen-free (SPF) shrimp stocks of *P. vannamei* and *P. stylirostris* (Lightner, 1996b; 2005; Wyban 1992). The adoption of the latter technology (SPF stocks) has proven to be among the most successful husbandry practice for the prevention and control of infection with TSV.

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

Suitable specimens for testing for infection with TSV include PL, juveniles and adults. While TSV may infect all life stages, infection severity, and hence virus load, may be below detection limits in spawned eggs and in the larval stages, so these life stages may not be suitable samples for TSV detection ~~or certification of freedom from infection with TSV.~~

3.2. Selection of organs or tissues

TSV infects tissues of ectodermal and mesodermal origin. The principal target tissue in the acute phase of infection with TSV is the cuticular epithelium. In chronic infections the lymphoid organ (LO) is the principal target tissue.

Haemolymph or excised pleopods may be collected and used when non-lethal testing of valuable broodstock is necessary.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

TSV is a systemic virus, and it does not replicate in enteric tissues (e.g. the hepatopancreas, the midgut, or its caeca). Hence, enteric tissues are inappropriate samples for detection of infection with TSV.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph or pleopods can be collected without killing the animals and used as non-lethal sampling of genetically valuable broodstock.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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~~ bioassay

The success of ~~pathogen isolation~~ bioassay depends strongly on the quality of samples (which is influenced 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 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 animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be preserved in ethanol it may be frozen.~~

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. 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 Chapter 2.2.0. *General information (diseases of crustaceans)*.

3.5.4. Samples for other tests

Haemolymph could be used for PCR-based detection of TSV.

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 animals should be processed and tested individually.

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, 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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	+	+	+	NA				
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP												
IFAT												
ELISA												
Other antigen detection methods												
Other method												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP Pathway (chapter 1.1.2); NA = not available; PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification; IFAT = indirect fluorescent antibody test; ELISA = 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.

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

4.1. Wet mounts

Direct microscopy of simple unstained wet mounts from excised pieces of the gills, appendage tips, etc., examined by phase- or reduced-light microscopy may be used to demonstrate (and make a tentative diagnosis of acute-phase infection with TSV) focal lesions of acute-phase infection with TSV in cuticular epithelial cells. Preparations presenting acute-phase infection with TSV will contain numerous spherical structures (see the histopathological methods in Section 4.2.3 above), which are pyknotic and karyorrhectic nuclei and cytoplasmic remnants of necrotic cells.

4.2. Histopathology and cytopathology

Histopathology is a useful method to detect infection with TSV in the acute and chronic phases of infection (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). In chronic infections with TSV, the only lesion typically presented by infected shrimp is the presence of an enlarged LO with multiple LO spheroids (LOS) (Hasson *et al.*, 1999b), which cannot be distinguished from LOS induced by chronic infections of other RNA viruses (Lightner, 1996a). When histological lesions are observed and infection with TSV is suspected, a molecular test (ISH with TSV-specific probes, or reverse-transcription [RT] PCR) must be used for confirmation of infection with TSV (see Section 6).

4.2.1. Acute phase of Taura syndrome

The acute phase of the disease is characterised by multifocal areas of necrosis in the cuticular epithelium of the general body surface, appendages, gills, hindgut, and foregut (the oesophagus, anterior and posterior chambers of the stomach). Cells of the subcuticular connective tissues and adjacent striated muscle fibres basal to affected cuticular epithelium are occasionally affected. In some severe cases of acute-phase infection with TSV, the antennal gland tubule epithelium is also destroyed. Prominent in the multifocal cuticular lesions are conspicuous foci of affected cells that display an increased eosinophilia of the cytoplasm and pyknotic or karyorrhectic nuclei. Cytoplasmic remnants of necrotic cells are often extremely abundant in these infections with TSV acute-phase lesions and these are generally presented as spherical bodies (1–20 µm in diameter) that range in staining from eosinophilic to pale basophilic. These structures, along with pyknotic and karyorrhectic nuclei, give acute-phase TS lesions a characteristic ‘peppered’ or ‘buckshot-riddled’ appearance, which is considered to be pathognomonic for the infection when there is no concurrent necrosis of the parenchymal cells of the LO tubules. The absence of necrosis of the LO in acute-phase infection with TSV distinguishes it from acute-phase infection with yellowhead virus genotype 1 in which similar patterns of necrosis to those induced by infection with TSV may occur in the cuticular epithelium and gills (Lightner, 1996a).

In TSV-infected tissues, pyknotic or karyorrhectic nuclei give a positive (for DNA) Feulgen reaction, which distinguishes them from the less basophilic to eosinophilic cytoplasmic inclusions that do not contain DNA. The absence of haemocytic infiltration or other signs of a significant host-inflammatory response distinguishes the acute phase of infection with TSV from the transitional phase of the disease (Brock, 1997; Brock *et al.*, 1995; Hasson *et al.*, 1995; 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; Lightner *et al.*, 1995).

4.2.2. Transition (recovery) phase of infection with Taura syndrome virus

In the transitional phase of infection with TSV, typical acute-phase cuticular lesions decline in abundance and severity and are replaced by conspicuous infiltration and accumulation of haemocytes at the sites of necrosis. The masses of haemocytes may become melanised giving rise to the irregular black spots that characterise the transition phase of the disease. In H&E sections, such lesions may show erosion of the cuticle, surface colonisation and invasion of the affected cuticle and exposed surface haemocytes by *Vibrio* spp. (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). Sections of the LO during the transition phase of infection with TSV may appear normal with H&E staining. However, when sections of the LO are assayed for TSV by ISH with a specific cDNA probe (or by ISH with MAb 1A1 for TSV type A, genotype 1), large quantities of TSV are shown accumulating in the more peripheral parenchymal cells of the LO tubules (Hasson *et al.*, 1999b; Srisuvan *et al.*, 2005).

4.2.3. Chronic phase of infection with Taura syndrome virus

Shrimp in the chronic phase of infection with TSV display no gross signs of infection, and histologically the only sign of infection is the presence of numerous prominent LOS, which may remain associated with the main body of the paired LO, or which may detach and become ectopic LOS bodies that lodge in constricted areas of the haemocoel (i.e. the heart, gills, in the subcuticular connective tissues, etc.). Such LOS are spherical accumulations of LO cells and haemocytes and may be distinguished from normal LO tissues by their spherical nature and the lack of the central vessel that is typical of

normal LO tubules. When assayed by ISH with a cDNA probe for TSV (or with MAb 1A1 using ISH) some cells in the LOS give positive reactions to the virus, while no other target tissues react (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; 1996b).

4.3. Cell culture for virus isolation

TSV has not been grown *in vitro*, as no crustacean cell lines exist (Lightner, 1996a; Pantoja *et al.*, 2004). Although one publication incorrectly reported that TSV infected human and monkey cell lines (Audelo del Valle *et al.*, 2003), two other laboratories that repeated the study both found that TSV does not infect or replicate in primate or human cell lines that are known to have susceptibility to human picornaviruses (Luo *et al.*, 2004; Pantoja *et al.*, 2004).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

4.4.1. Real-time reverse-transcription (RT)-PCR

Real-time RT-PCR methods have been developed for the detection of TSV. These methods have the advantage of speed, specificity and sensitivity. The sensitivity of real time RT-PCR is approximately equal to 100 copies of the target sequence from the TSV genome (Dhar *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004).

The real-time RT-PCR method described below for TSV follows the method used in Tang *et al.*, 2004.

Primer and probe sequences, real time RT-PCR

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Tang <i>et al.</i> , 2004); GenBank Accession No.: AF4277675			
TSV/ORF-1 Nt 1024 to 1051	Fwd: TSV1004: TTG-GGC-ACC-AAA-CGA-CAT-T- Rev: TSV1075 GGG-AGC-TTA-AAC-TGG-ACA-CAC-TGT	300 nM of each primer	Reverse transcription at 50°C/30 min 40 cycles of 95°C/3 sec and 60°C/30 sec
	Probe: TSV-P1 FAM-CAG-CAC-TGA-CGC-ACA-ATA-TTC-GAG-CAT-C-TAMRA,	100 nM of probe	

4.4.2. Conventional RT-PCR

Tissue samples (haemolymph, pleopods, whole small shrimp etc) may be assayed for TSV using RT-PCR. The RT-PCR method outlined below for TSV follows the method used in Nunan *et al.* (1998).

Primer and probe sequences, conventional RT-PCR

Pathogen / target gene	Primer / probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Nunan <i>et al.</i> , 1998); <u>product amplicon size: 231 bp</u>			
TSV/ORF 2	Fwd: 9992: AAG-TAG-ACA-GCC-GCG-CTT	Primers/620 nM each	Reverse transcription 60°C/30 min

	Rev:9195R: TCA-ATG-AGA-GCT-TGG-TCC		40 cycles: 94°C/45 sec, 60°C/45 sec
--	---------------------------------------	--	--

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None currently available.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation (ISH)

4.6.1. DNA probes for ISH applications with non-radioactive cDNA probes

Non-radioactive, DIG-labelled cDNA probes for detection of TSV may be produced in the laboratory. The ISH method provides greater diagnostic sensitivity than do more traditional methods for TSV detection and diagnosis that employ classic histological methods (Hasson *et al.*, 1999a; Lightner, 1996a; 1999; Lightner & Redman 1998; Mari *et al.*, 1998). The ISH assay of routine histological sections of acute- and transition-phase lesions in the cuticular epithelium, other tissues, and of LOS in transition and chronic phase with a specific DIG-labelled cDNA probe to TSV, provides a definitive diagnosis of infection with TSV (Hasson *et al.*, 1999a; 1999b; Lightner, 1996a; 1996b). Pathognomonic TSV-positive lesions display prominent blue to blue-black areas in the cytoplasm of affected cells when reacted with the cDNA probes. Not reacting to the probe are the prominent karyorrhectic nuclear fragments and pyknotic nuclei that contribute to the pathognomonic 'buckshot riddled' appearance of TS lesions (Lightner, 1996a; Mari *et al.*, 1998). (See Chapter 2.2.4 *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.)

False-negative ISH results may occur with Davidson's fixed tissues if tissues are left in fixative for more than 24–48 hours. The low pH of Davidson's fixative causes acid hydrolysis of the TSV single-stranded RNA genome, resulting in false-negative probe results. This hydrolysis can be prevented by avoiding fixation times over 24 hours (Hasson *et al.*, 1997; Lightner, 1996a; Lightner & Redman 1998).

4.7. Immunohistochemistry

Not suitable.

4.8. Bioassay

Confirmation of infection with TSV may be accomplished by bioassay of TSV-suspect animals with SPF juvenile *P. vannamei* serving as the indicator of the virus (Garza *et al.*, 1997; Hasson *et al.*, 1999b; 1995; Lightner, 1996a; Lotz, 1997; Overstreet *et al.*, 1997). Oral or injection protocols may be used. The oral method is relatively simple to perform and is accomplished by feeding chopped carcasses of suspect shrimp to SPF juvenile *P. vannamei* in small tanks (White *et al.*, 2002). The use of a negative control tank of indicator shrimp, which receive only SPF (TSV-free) tissue and normal shrimp feed is required. When the carcass feeding (*per os*) protocol is used to bioassay for TSV, TSV-positive indicator shrimp (by gross signs and histopathology) are typically apparent within 3–4 days of initial exposure, and significant mortalities occur by 3–8 days after initial exposure. The negative control shrimp must remain negative (for at least 10–15 days) for gross or histological signs of disease and unusual mortalities (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a; White *et al.*, 2002).

With the injection bioassay protocol, a variety of sample types may be tested for TSV. Whole shrimp are used if they were collected during an outbreak of infection with TSV. Heads only should be used if shrimp display gross transition-phase lesions (multifocal melanised spots on the cuticle) or no clinical signs of infection (chronic phase) as the virus, if present, will be concentrated in the LO (Hasson *et al.*, 1999b; Lightner, 1996a). For non-lethal testing of broodstock, haemolymph samples may be taken and used to expose the indicator shrimp by IM injection (Lightner, 1996a).

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Not recommended.

4.10. Other methods

4.10.1. Dot-blot immunoassay method

- i) For the dot-blot immunoassay method, 1 µl of test antigen (purified virus, infected shrimp haemolymph or SPF shrimp haemolymph) is dotted on to the surface of MA-HA-N45 assay plates (Millipore).¹
- ii) After air drying, the wells are blocked for 1 hour at room temperature with 200 µl of a buffer containing phosphate-buffered saline and 0.05% Tween 20 (PBST) mixed with 10% normal goat serum (Life Technologies) and 2% Hammersten casein (Amersham Life Sciences).
- iii) The wells are washed three times with PBST and then reacted with 100 µl primary antibody (MAb or mouse polyclonal antibodies) for 30 minutes at room temperature.
- iv) Alkaline-phosphatase-labelled goat anti-mouse IgG, γ chain specific, secondary antibody (Zymed) diluted 1/1000 in PBST plus 10% normal goat serum is used for detection (30 minutes at room temperature).
- v) After washing three times with PBST, once with PBS and once with distilled water, the reactions are visualised by development for 15 minutes at room temperature with nitroblue tetrazolium and bromo-chloro-indoyl phosphate (Roche Diagnostics in 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl buffer containing 50 mM MgCl₂, pH 9.5).
- vi) Reactions are stopped with distilled water.
- vii) The reactions are graded using a scale from 0 to +4, with the highest intensity reaction being equivalent to the reaction generated using the MAb against the reference control consisting of semi-purified TSV. A negative reaction is one in which no coloured spot is visible in the well.

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

Real-time RT-PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with TSV in apparently healthy populations as described in Section 4.1.1.

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. ~~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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case.~~ If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status...²

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

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

¹ Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by WOA. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.

² For example transboundary commodities.

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

- ~~ii) Histopathological changes consistent with the presence of the pathogen or the disease~~
- i) A positive result by real-time RT-PCR
- ii) A positive result by conventional RT-PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

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

- i) A positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by sequencing of the amplicon
- ~~ii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by real time RT-PCR~~
- ~~iii) A positive result by *in situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing~~

6.2. Clinically affected animals

No clinical signs are 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 TSV 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) Histopathological changes consistent with TSV infection
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Positive result by conventional RT-PCR
- v) Positive result of a bioassay

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) A positive result by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR followed by sequencing of the amplicon
- ii) A positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by real-time RT-PCR
- iii) A positive result by *in-situ* hybridisation and a positive result by conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with TSV are provided in Tables 6.3.1 and 6.3.2. ~~(none-no data are currently available for either).~~ This information can be used for the design of surveys for infection with TSV, 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 surveillance 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, DSp = 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, DSp = diagnostic specificity.

7. References

- AUDELO DEL VALLE J., CLEMENT-MELLADO O., MAGANA-HERNANDEZ A., FLISSER A., MONTIEL-AGUIRRE F. & BRISENO-GARCIA B. (2003). Infection of cultured human and monkey cell lines with extract of penaeid shrimp infected with Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **9**, 265–266.
- BONAMI J.R., HASSON K.W., MARI J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1997). Taura syndrome of marine penaeid shrimp: characterization of the viral agent. *J. Gen. Virol.*, **78**, 313–319.
- BROCK J.A. (1997). Special topic review: Taura syndrome, a disease important to shrimp farms in the Americas. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 415–418.
- BROCK J.A., GOSE R., LIGHTNER D.V. & HASSON K.W. (1995). An overview on Taura syndrome, an important disease of farmed *Penaeus vannamei*. In: *Swimming through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming, Aquaculture '95*, Browdy C.L. & Hopkins J.S., eds. San Diego, California, 1–4 February 1995. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 84–94.
- CHEN S.N., CHANG P.S. & KOU G.H. (1992). Infection route and eradication of *Penaeus monodon* baculovirus (MBV) in larval giant tiger prawns, *Penaeus monodon*. In: *Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 177–184.
- CLIFFORD H.C. (1998). Management of ponds stocked with blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. In: *Proceedings of the First Latin American Shrimp Farming Congress*, D.E. Jory, ed. Panama City, Panama, 1–11.
- DHAR A.K., COWLEY J.A., HASSON K.W. & WALKER P.J. (2004). Taura syndrome virus and yellow head virus of penaeid shrimp. *Adv. Virus Res.*, **64**, 353–421.
- DIXON H. & DORADO J. (1997). Managing Taura syndrome in Belize: a case study. *Aquaculture Magazine*, May/June, 30–42.
- FEGAN D.F. & CLIFFORD H.C. III. (2001). Health management for viral diseases in shrimp farms. In: *The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture. Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 168–198.
- GARZA J.R., HASSON K.W., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L. & LIGHTNER D.V. (1997). Demonstration of infectious taura syndrome virus in the feces of sea gulls collected during an epizootic in Texas. *J. Aquat. Anim. Health*, **9**, 156–159.
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.

-
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MARI J. & BONAMI J.R., POULOS B.T., MOHNEY L.L., REDMAN R.M. & BROCK J.R. (1999a). The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histology and *in situ* hybridization using TSV-specific cDNA probes. *Aquaculture*, **171**, 13–26.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., MOHNEY L.L., REDMAN R.M., POULOS B.T. & WHITE B.M. (1999b). Taura syndrome virus (TSV) lesion development and the disease cycle in the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 81–93.
- HASSON K.W., LIGHTNER D.V., POULOS B.T., REDMAN R.M., WHITE B.L., BROCK J.A. & BONAMI J.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei*: demonstration of a viral etiology. *Dis. Aquat. Org.*, **23**, 115–126.
- INTRIAGO P., JIMENEZ R., MACHUCA M., BARNIOL R., KRAUSS E. & SALVADOR X. (1997). Experiments on toxicosis as the cause of Taura Syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) in Ecuador. *In: Diseases in Asian Aquaculture III*, Flegel T.W. & MacRae I.H., eds. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, 365–379.
- JIMENEZ R. (1992). Síndrome de Taura (Resumen). *In: Acuicultura del Ecuador*. Cámara Nacional de Acuicultura, Guayaquil, Ecuador, 1–16.
- JIMENEZ R., BARNIOL R., DE BARNIOL L. & MACHUCA M. (2000). Periodic occurrence of epithelial viral necrosis outbreaks in *Penaeus vannamei* in Ecuador. *Dis. Aquat. Org.*, **42**, 91–99.
- LIGHTNER D.V. (ED.) (1996a). A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, 304 pp.
- LIGHTNER D.V. (1996b). Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. sci. tech. Office int. Epiz.*, **15**, 579–601.
- LIGHTNER D.V. (1999). The penaeid shrimp viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: current status in the Americas, available diagnostic methods and management strategies. *J. Appl. Aquac.*, **9**, 27–52.
- 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. (1998). Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, **164**, 201–220.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., ARCE S. & MOSS S.M. (2009). Specific pathogen-free shrimp stocks in shrimp farming facilities as a novel method for disease control in crustaceans. *In: Shellfish Safety and Quality*, Shumway S. & Rodrick G., eds. Woodhead Publishers, London, UK. pp. 384–424.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., HASSON K.W. & PANTOJA C.R. (1995). Taura syndrome in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda): gross signs, histopathology and ultrastructure. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 53–59.
- LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., PANTOJA C.R., TANG K.F.J., NOBLE B.L., SCHOFIELD P., MOHNEY L.L., NUNAN L.M. & NAVARRO S.A. (2012). Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. *J. Invertebr. Pathol.*, **110**, 174–183.
- LOTZ J.M. (1997). Effect of host size on virulence of Taura virus to the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae). *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 45–51.
- LOTZ J.M., ANTON, L.S. & SOTO M.A. (2005). Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Dis. Aquat. Org.*, **65**, 75–78.
- LUO P., HU C.Q., REN C.H. & SUN Z.F. (2004). Taura syndrome virus and mammalian cell lines. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2260–2261.
- MARI J., BONAMI J.R. & LIGHTNER D.V. (1998). Taura syndrome of penaeid shrimp: cloning of viral genome fragments and development of specific gene probes. *Dis. Aquat. Org.*, **33**, 11–17.
- NAVARRO S.A., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2009). An improved Taura syndrome virus (TSV) RT-PCR using newly designed primers. *Aquaculture*, **293**, 290–292.
-

-
- NIELSEN L., SANG-OU M., CHEEVADHANARAK S. & FLEGEL T.W. (2005). Taura syndrome virus (TSV) in Thailand and its relationship to TSV in China and the Americas. *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 101–106.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) used for the detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in experimentally infected shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **34**, 87–91.
- NUNAN L.M., TANG-NELSON K. & LIGHTNER D.V. (2004). Real-time RT-PCR determination of viral copy number in *Penaeus vannamei* experimentally infected with Taura syndrome virus. *Aquaculture*, **229**, 1–10.
- OVERSTREET R.M., LIGHTNER D.V., HASSON K.W., MCLWAIN S. & LOTZ J. (1997). Susceptibility to TSV of some penaeid shrimp native to the Gulf of Mexico and southeast Atlantic Ocean. *J. Invertebr. Pathol.*, **69**, 165–176.
- PANTOJA C.R., NAVARRO S.A., NARANJO J., LIGHTNER D.V. & GERBA C.P. (2004). Nonsusceptibility of primate cells to Taura syndrome virus. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 2106–2112.
- POULOS B.T., KIBLER R., BRADLEY-DUNLOP D., MOHNEY L.L. & LIGHTNER D.V. (1999). Production and use of antibodies for the detection of Taura syndrome virus in penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 99–106.
- ROBLES-SIKISAKA R., HASSON K.W., GARCIA D.K., BROVONT K., CLEVELAND K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2002). Genetic variation and immunohistochemical differences among geographical isolates of Taura syndrome virus of penaeid shrimp. *J. Gen. Virol.*, **83**, 3123–3130.
- ROBLES-SIKISAKA R., GARCIA D.K., KLIMPEL K.R. & DHAR A.K. (2001). Nucleotide sequence of 3'-end of the genome of Taura syndrome virus of shrimp suggests that it is related to insect picornaviruses. *Arch. Virol.*, **146**, 941–952.
- SRISUVAN T., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Experimental infection of *Penaeus monodon* with Taura syndrome virus (TSV). *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 1–8.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2005). Phylogenetic analysis of Taura syndrome virus isolates collected between 1993 and 2004 and virulence comparison between two isolates representing different genetic variants. *Virus Res.*, **112**, 69–76.
- TANG K.F.J., WANG J. & LIGHTNER D.V. (2004). Quantitation of Taura syndrome virus by real-time RT-PCR with a TaqMan assay. *J. Virol. Methods*, **115**, 109–114.
- TU C., HUANG H.T., CHUANG S.H., HSU J.P., KUO S.T., LI N.J., HUS T.L., LI M.C. & LIN S.Y. (1999). Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 159–161.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Seabirds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- VERGEL J.C.V., CABAWATAN L.D.P., MADRONA V.A.C., ROSARIO A.F.T., STA. ANA J.B.M., TARE M.V.R. & MANINGAS M.B.B. (2019). Detection of Taura Syndrome Virus (TSV) in *Litopenaeus vannamei* in the Philippines. *Philipp. J. Fish.*, **26**, 8–14.
- WERTHEIM J.O., TANG K.F.J., NAVARRO S.A. & LIGHTNER D.V. (2009). A quick fuse and the emergence of Taura syndrome virus. *Virology*, **390**, 324–329.
- WHITE B.L., SCHOFIELD P.J., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (2002). A laboratory challenge method for estimating Taura Syndrome virus resistance in selected lines of Pacific White Shrimp *Penaeus vannamei*. *J. World Aquac. Soc.*, **33**, 341–348.
- WYBAN J.A. (1992). Selective breeding of specific pathogen-free (SPF) shrimp for high health and increased growth. *In: Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*, Fulks W. & Main K.L., eds. The Oceanic Institute, Honolulu, Hawaii, USA, 257–268.
- YU C.I. & SONG Y.L. (2000). Outbreaks of Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. *Fish Pathol.*, **5**, 21–24.
-

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

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with Taura syndrome virus
(please consult the WOA Web site for the most up-to-date list:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).
Please contact WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with Taura syndrome virus

NB: FIRST ADOPTED IN 2006. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.8.

INFECTION WITH WHITE SPOT SYNDROME VIRUS

1. Scope

Infection with white spot syndrome virus means infection with the pathogenic agent white spot syndrome virus (WSSV), Genus *Whispovirus*, Family *Nimaviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

WSSV was assigned by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) as the only member of the genus *Whispovirus* within the *Nimaviridae* family. Virions of WSSV are ovoid or ellipsoid to bacilliform in shape, have a regular symmetry, and measure 80–120 nm in diameter and 250–380 nm in length. A flagella-like extension (appendage) may be observed at one end of the virion. WSSV has been divided into three groups: isolates originating from Thailand (WSSV-TH-96-II), isolates originating from India (WSSV-IN-07-I), and another Indian isolate (WSSV-IN-06-I). Most strains of WSSV were speculated to have originated from the Indian Ocean and then spread across the world (Zeng, 2021). Today, although various geographical isolates with genotypic variability have been identified, they are all classified as a single species (WSSV) within the genus *Whispovirus* (Lo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Viable WSSV was found in frozen commodity shrimp imported to Australia from Southeast Asia (McColl *et al.*, 2004). The virulence of WSSV was retained for 14 months at –80°C in a filtered tissue homogenate prepared from moribund shrimp with hepatopancreas and abdomen removed (Momoyama *et al.*, 1998). The virus originally collected from the haemolymph of moribund shrimp could maintain its virulence for at least 16 months at –80°C (Wu *et al.*, 2002). However, WSSV might be inactivated by multiple freeze-thaw cycles due to damage the viral envelopes or nucleocapsids (Durand *et al.*, 2000; Hasson *et al.*, 2006).

2.1.3. Survival and stability outside the host

The agent is viable for at least 30 days at 30°C in seawater under laboratory conditions (Momoyama *et al.*, 1998); and is viable in ponds for at least 3–4 days (Nakano *et al.*, 1998). Laboratory emulations of drainable and non-drainable ponds suggest that the virus is no longer infective after 21 days of sun-drying or after 40 days in waterlogged pond sediment (Satheesh Kumar *et al.*, 2013).

WSSV with an initial viral load of 1000 virions ml⁻¹ was found to be viable for a period of 12 days in seawater of 27 ppt salinity, pH of 7.5 at 29–33°C. In shrimp pond sediment (with initial viral load of 211,500 copies g⁻¹), the virus was viable and infective up to 19 days despite sun-drying. In the case of non-drainable conditions, WSSV (753,600 copies g⁻¹) remained infective for a period of 35 days (Satheesh Kumar *et al.*, 2013).

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Of all the species that have been tested to date, no decapod (order Decapoda) crustacean from marine, brackish or freshwater sources has been reported to be refractory to infection with WSSV (Flegel, 1997; Lightner, 1996; Lo & Kou, 1998; Maeda *et al.*, 2000; Stentiford *et al.*, 2009).

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with WSSV in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

All life stages are potentially susceptible, from eggs to broodstock (Lightner, 1996; Venegas *et al.*, 1999). WSSV genetic material has been detected in reproductive organs (Lo *et al.*, 1997), but susceptibility of the gametes to WSSV infection has not been determined definitively.

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

The best life stages of crustaceans for detection of WSSV are late postlarvae (PL) stages, juveniles and adults. Probability of detection can be increased by exposure to stressful conditions (e.g. eye-stalk ablation, spawning, moulting, changes in salinity, temperature or pH, and during plankton blooms).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The major target tissues of WSSV are of ectodermal and mesodermal embryonic origin, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues (Momoyama *et al.*, 1994; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Although WSSV infects the underlying connective tissue in the crustacean hepatopancreas and midgut, the tubular epithelial cells of these two organs are of endodermal origin, and they do not become infected.

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Wild decapods known to be reservoirs of infection with WSSV include *Mysis* sp. (Huang *et al.*, 1995), *Acetes* sp., *Alpheus* sp., *Callinassa* sp., *Exopalaemon* sp., *Helice* sp., *Hemigrapsus* sp., *Macrophthalmus* sp., *Macrophthel* sp., *Metaplex* sp., *Orithyia* sp., *Palaemonoidea* sp., *Scylla* sp., *Sesarma* sp., and *Stomatopoda* sp. (Desrina *et al.*, 2022; He & Zhou, 1996; Lei *et al.*, 2002). These species can express the disease under suitable environmental conditions. However, non-decapodal crustaceans, such as copepods (Huang *et al.*, 1995), rotifers (Yan *et al.*, 2004), *Balanus* sp. (Lei *et al.*, 2002), *Artemia* (Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010) and *Tachypleidue* sp. (He & Zhou, 1996) may be apparently healthy carrier animals. Other marine molluscs, polychaete worms (Vijayan *et al.*, 2005), as well as non-crustacean aquatic arthropods such as sea slaters (*Isopoda*), and Euphydradae insect larvae can mechanically carry the virus without evidence of infection (Lo & Kou, 1998).

2.2.6. Vectors

The harpacticoid copepod *Nitocra* sp. (Zhang *et al.*, 2008), microalgae (Liu *et al.*, 2007), and the polychaete, *Dendronereis* spp. (Peters) (Desrina *et al.*, 2013; Haryadi *et al.*, 2015) are vectors for WSSV.

2.3. Disease pattern

Infection with WSSV sometimes causes clinical disease (Tsai *et al.*, 1999), depending on factors that are poorly understood but related to species tolerance and environmental triggers. With an appropriate infection dose to allow sufficient time before mortality, animals susceptible to disease show large numbers of virions circulating in the haemolymph (Lo *et al.*, 1997), but this may also occur for tolerant species that show no mortality. Thus, high viral loads *per se* do not cause disease or mortality for all susceptible species.

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

All penaeid shrimp species are highly susceptible to infection with WSSV, often resulting in high mortality. Crabs, crayfish, freshwater prawns, spiny lobsters and clawed lobsters are susceptible to infection with WSSV, but morbidity and mortality as a consequence of infection are highly variable (Lo & Kou, 1998). High level infections with WSSV are known in some decapods in the absence of clinical disease.

Prevalence of infection with WSSV is highly variable, from <1% in infected wild populations to up to 100% in captive populations (Lo & Kou, 1998).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

White spots embedded within the exoskeleton are the most commonly observed clinical sign. In most shrimp, these spots range from barely visible to 3 mm in diameter, and they sometimes coalesce into larger plates. However, it should be noted that environmental stress factors, such as high alkalinity, or bacterial disease can also cause white spots on the carapace of shrimp, and that moribund shrimp with infection with WSSV may have few, if any, white spots. Therefore, the appearance of white spots is not a reliable diagnostic sign of infection with WSSV infection. High degrees of colour variation with a predominance of reddish or pinkish discoloured shrimp are seen in diseased populations.

WSSV infections can be subclinical or manifest as clinical disease. The penaeid shrimp in aquaculture will generally show clinical signs associated with high morbidity and mortality. Some animals may die without showing any clinical signs. Non-penaeid species (e.g. crab, lobster) generally have subclinical infections under natural conditions.

The affected animals can show lethargy, decreased or absent feed consumption and abnormal swimming behaviour – slow swimming, swimming on side, swimming near water surface and gathering around edges of rearing units (Corbel *et al.*, 2001; Sahul Hameed *et al.*, 1998; 2001). A very high mortality rate in the shrimp population can be expected within a few days of the onset of behavioural signs.

2.3.3 Gross pathology

In addition to the clinical and behavioural signs in Section 2.3.2. above, the following gross pathology has been reported in clinically affected penaeid shrimp: loosened attachment of the carapace with underlying cuticular epithelium (Sanchez-Paz, 2010), so that the carapace can be easily removed (Zhan *et al.*, 1998); empty gastro-intestinal tract due to anorexia (Escobedo-Bonilla, 2008); delayed clotting of haemolymph (Heidarieh *et al.*, 2013); excessive fouling of gills (Wu *et al.*, 2013) and exoskeleton.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Infection with WSSV can be transmitted horizontally by consumption of infected tissue (e.g. cannibalism, predation, fomites, etc.), by water-borne routes, and by other routes of transmission (e.g. via sea birds, anthropogenic movements, feeding, rotifer, copepods, etc) (Haryadi *et al.*, 2015; Vanpatten *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006; 2008). Transmission of WSSV can occur from apparently healthy animals in the absence of disease. Dead and moribund animals can be a source of disease transmission (Lo & Kou, 1998). Microalgae could serve as a potential horizontal transmission pathway for WSSV (Liu *et al.*, 2007).

True vertical transmission (intra-ovum) of WSSV to the progeny has not been demonstrated.

In-vitro studies with primary cell cultures and *in-vivo* studies with postlarvae show that the replication cycle is approximately 20 hours at 25°C (Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000).

2.3.5. Environmental factors

Disease outbreaks may be induced by stressors, such as rapid changes in salinity. Water temperature has a profound effect on disease expression, with average water temperatures of between 18 and 30°C being conducive to WSSV outbreaks (Song *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 2001). Under experimental challenge condition, WSSV-induced mortality in shrimp is reduced when the temperature increases above 32°C (Vidal *et al.*, 2001).

2.3.6. Geographical distribution

Infection with WSSV has been identified from crustaceans in Asia, the Mediterranean (Stentiford & Lightner, 2011), the Middle East, Oceania (Moody *et al.*, 2022) and the Americas. Zones and compartments free from infection with WSSV are known within these regions (Lo *et al.*, 2012).

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

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No consistently effective vaccination methods have been developed for infection with WSSV.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No published or validated methods.

2.4.3. Immunostimulation

Several reports have shown that beta-glucan, vitamin C, seaweed extracts (fucoidan) and other immunostimulants may improve resistance to infection with WSSV (Chang *et al.*, 2003; Chotigeat *et al.*, 2004).

2.4.4. Breeding resistant strains

Progress in breeding *P. vannamei* for resistance to infections with WSSV has been reported (Cuellar-Anjel *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012).

2.4.5. Inactivation methods

Method	Treatment	Reference
Heat	55°C/90 min 70°C/5 min	Chang <i>et al.</i> , 1998
	50°C/60 min 60°C/1 min 70°C/0.2 min	Nakano <i>et al.</i> , 1998
pH	pH 3/60 min pH 12/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
UV	$9.30 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Ozone	$0.5 \mu\text{g ml}^{-1}/10 \text{ min}$	Chang <i>et al.</i> , 1998
Chlorine	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998; Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006
Iodophore	100 ppm/10 min	Chang <i>et al.</i> , 1998

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

For transovum transmission, disinfection of egg is likely to be effective (Lo & Kou, 1998), but this has not yet been confirmed in formal scientific trials.

2.4.7. General husbandry

Management practices in endemic areas principally involve the exclusion of WSSV from production populations or avoiding risk factors for development of clinical disease. Examples include avoiding stocking in the cold season, use of specific pathogen-free (SPF) or polymerase chain reaction (PCR)-negative seed stocks, use of biosecure water and culture systems (Withyachumnarnkul, 1999). Polyculture of shrimp and fish has been proposed to reduce WSSV transmission in infected populations (Wang *et al.*, 2021).

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 or exhibit behavioural changes (Sections 2.3) should be selected for detection of WSSV.

3.2. Selection of organs or tissues

Tissue tropism analysis from both experimentally infected shrimp and wild-captured brooders shows that tissues originating from the ectoderm and mesoderm, especially the cuticular epithelium and subcuticular connective tissues, as well as other target tissues (e.g. antennal gland, haematopoietic organ, etc.), are the main target tissues for infection with WSSV. Samples from the pleopods, gills, haemolymph, stomach or abdominal muscle are recommended for submission (Lo *et al.*, 1997).

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Although WSSV infects the underlying connective tissue in the shrimp hepatopancreas and midgut, the columnar epithelial cells of these two organs are of endodermal embryonic origin (Lo *et al.*, 1997) and are not appropriate tissues for detection. The compound eye may contain a PCR inhibitor (Lo *et al.*, 1997) and is therefore not suitable for PCR-based diagnosis.

3.4. Non-lethal sampling

Gill, haemolymph or pleopod are suitable tissues for non-lethal sampling and screening by PCR.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 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 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 histological techniques can be found in Section B.5.5. 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 Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

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 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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				
Cell culture												
Real-time PCR	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4	+++	+++	+++	4
Conventional PCR	++	++	++	2	++	++	++	2				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	2
<i>In-situ</i> hybridisation					+	+	+	1	+	+	+	1
Bioassay					+	+	+	1				
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1	+	+	+	1
Ab-ELISA					+	+	+	1				
Ag-ELISA					+	+	+	1				
Other antigen detection methods					+	+	+	1				
Other methods												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAHP 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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.

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

4.1. Wet mounts

Demonstration of hypertrophied nuclei in squash preparations of the gills and/or cuticular epithelium, which may be stained or unstained.

T-E staining

A T-E staining solution may be prepared from Trypan blue 0.6%, Eosin Y 0.2%, NaCl 0.5%, phenol 0.5%, and glycerol 20% (Huang & Yu, 1995) and used as follows:

- i) Place a piece of diseased tissue (e.g. a piece of gill or stomach epithelium without the cuticle) on a slide and mince with a scalpel.
- ii) Add 1–2 drops of the T-E staining solution to the minced tissue, mix and allow to stain for 3–5 minutes.
- iii) Lay a cover glass over the stained tissue and cover with several pieces of absorbent paper. Use a thumb to squash the mince into a single layer of cells.

If the sample was taken from a heavily infected shrimp, hypertrophied nuclei and intranuclear eosinophilic or vacuolation-like inclusion bodies can be observed using light microscopy (400–1000× magnification).

4.2. Histopathology and cytopathology

Smears

Demonstration of aggregates of WSSV virions in unstained smear preparations of haemolymph by dark-field microscopy.

NOTE: This is the simplest of the microscopic techniques and is recommended for people with limited expertise in diagnosing infection with WSSV. The aggregates appear as small reflective spots of 0.5 µm in diameter (Momoyama *et al.*, 1995).

Fixed sections

Histological changes commonly reported in susceptible species include: Hypertrophied nuclei with marginated chromatin material in virus-infected cells; eosinophilic to pale basophilic (with haematoxylin & eosin stain) stained intranuclear viral inclusions within hypertrophied nuclei and multifocal necrosis associated with pyknotic and karyorrhectic nuclei in affected tissues of ectodermal and mesodermal origin. The infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus, another DNA virus, produces similar inclusions that need to be differentiated from those of WSSV.

4.3. Cell culture for isolation

WSSV can be isolated from primary cultures of lymphoid or ovary cells. However, it is NOT recommended to use cell culture as a routine isolation method because of: 1) the high risk of contamination, and, 2) the composition of the medium varies depending on the tissue type, host species and experimental purpose; that is, to date there is no standard or recognised medium that can be recommended. As primary cell culture is so difficult to initiate and maintain for virus isolation purposes, bioassay should be the primary means for virus propagation.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

~~Numerous~~ Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and ~~should~~ can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

4.4.1. Real-time PCR

The real-time PCR methods described by Durand & Lightner (2002) and Sritunyalucksana *et al.* (2006) are described here as modified and validated by Moody *et al.*, (2022).

Pathogen/Target	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Durand & Lightner, 2002 ¹ ; GenBank Accession No.: NC_003225			
WSSV/ ORF-X Capsid protein	Fwd WSS1011F: TGG-TCC-CGT-CCT-CAT-CTC-AG Rev WSS1079R: GCT-GCC-TTG-CCG-GAA-ATT-A Probe: <u>6FAM-AGC-CAT-GAA-GAA-TGC-CGT-CTA-TCA-CAC-A-TAMRA</u>	900 nM 900 nM 250 nM	45 cycles of: <u>95°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u> <u>50°C/2 min.</u> <u>95°C/10 min.</u> <u>then 45 cycles of:</u> <u>94°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u>
Method 2: Sritunyalucksana, 2006 ¹ ; GenBank Accession No.: AF440570			
WSSV/ ORF-X Capsid protein	Fwd CSIRO WSSV-F: CCG ₂ ACG ₂ CCA ₂ AGG ₂ GAA ₂ CT Rev CSIRO WSSV-R: TTC ₂ AGA ₂ TTC ₂ GTT ₂ ACC ₂ GTT ₂ TCC ₂ A Probe: 6FAM-CGC ₂ TTC ₂ AGC ₂ CAT ₂ GCC ₂ AGC ₂ CG-TAMRA	900 nM 900 nM 250 nM	45 cycles of: <u>95°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u> <u>50°C/2 min.</u> <u>95°C/10 min.</u> <u>then 45 cycles of:</u> <u>94°C/15 sec and</u> <u>60°C/1 min</u>

¹Method described here as modified and validated by Moody *et al.*, 2022

4.4.2. Conventional PCR

Pathogen/Target	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Lo <i>et al.</i> , 1996a; GenBank Accession No.: AF440570 ; amplicon size: 1447/941 bp			
WSSV (nested PCR)	<u>Outer-Primary</u> Fwd <u>146F1</u> : ACT-ACT-AAC-TTC-AGC-CTA-TCTAG Rev 146R1: TAA-TGC-GGG-TGT-AAT-GTT-CTT-ACG-A <u>Inner-Nested</u> Fwd 146F2: GTA-ACT-GCC-CCT-TCC-ATC-TCC-A Rev 146R2: TAC-GGC-AGC-TGC-TGC-ACC-TTG	100 pmol 100 pmol 100 pmol 100 pmol	39 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min 39 cycles of 94°C/1 min, 55°C/1 min, 72°C/2 min

Commercial PCR kits are available. Please consult the WOAHA Register for kits that have been certified by WOAHA (<https://www.woaha.org/en/what-we-offer/veterinary-products/#ui-id-5>).

4.4.3. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method

The protocol described here is from Kono *et al.* (2004). The LAMP method is sensitive and rapid, and it amplifies the target nucleic acids under isothermal conditions, therefore needing no sophisticated machine for thermal cycling.

DNA extraction

DNA extraction could be performed according to the protocol described in Section 4.4.2 *Conventional PCR* or by other suitable methods or by commercial kits.

LAMP reaction

-
- i) Add DNA to a tube to set up a 25 µl reaction mixture (20 mM Tris/HCl, pH 8.8, 10 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20, 0.8M Betaine, 1.4 mM of each dNTP, 40 pmol of WSSV-FIP and -BIP primers, 5 pmol of WSSV-F3 and -B3 primers).
 - ii) The primer sequences are WSSV-FIP: 5'-GGG-TCG-TCG-AAT-GTT-GCC-CAT-TTT-GCC-TAC- GCA-CCA-ATC-TGT-G-3', WSSV-BIP: 5'-AAA-GGA-CAA-TCC-CTC-TCC-TGC-GTT-TTA-GAA-CGG-AAG-AAA-CTG-CC-TT-3', WSSV-F3: ACG-GAC-GGA-GGA-CCC-AAA-TCG-A-3', WSSV-B3: 5'-GCC-TCT-GCA-ACA-TCC-TTT-CC-3'.
 - iii) Heat the mixture at 50°C for 5 minutes and at 95°C for 5 minutes, then chill on ice, and add 1 µl (8 U) of *Bst* DNA polymerase.
 - iv) Incubate the mixture at 65°C for 60 minutes, and then terminate the reaction at 80°C for 10 minutes.
 - v) To visualise, electrophorese 2 µl LAMP reaction products on 2% agarose gels containing ethidium bromide at a concentration of 0.5 µg ml⁻¹. This reaction produces WSSV-specific LAMP products with multiple bands of various sizes from approximately 200 bp to the loading well.

Reliable LAMP commercial kits may be an alternative for WSSV diagnosis.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

Use of WSSV-specific DNA probes with histological sections is useful to demonstrate the presence of WSSV nucleic acid in infected cells (Nunan & Lightner, 1997). See Chapter 2.2.0 Section 5.5.4 for general comments on *in-situ* hybridisation.

4.7. Immunohistochemistry

See Section 4.9.

4.8. Bioassay

If SPF shrimp are available, the bioassay method based on Nunan *et al.* (1998) and Durand *et al.* (2000), is suitable for WSSV diagnosis.

4.9. Antigen detection methods

Both polyclonal and monoclonal antibodies raised against either the virus or a recombinant viral structural protein have been used in various immunological assays including western blot analysis, immunodot assay, indirect fluorescent antibody test (IFAT), immunohistochemistry (IHC) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect WSSV (Huang *et al.*, 1995; Poulos *et al.*, 2001; Sithigorngul *et al.*, 2006; Yoganandhan *et al.*, 2004).

4.10. Other methods

Lateral flow tests are commercially available but their performance needs to be evaluated before they can be recommended.

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

Real-time PCR is the recommended test for surveillance to demonstrate freedom of infection with WSSV in apparently healthy populations as described in Section 4.4.1.

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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.~~

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 WSSV 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
- iii) Positive result by LAMP method

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

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

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR method followed by amplicon sequencing
- ~~iii) Positive results by *in situ* hybridisation and detection of WSSV by real time PCR~~
- ~~iv) Positive results by *in situ* hybridisation and detection of WSSV by conventional PCR followed by amplicon sequencing~~

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 WSSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

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

¹ For example transboundary commodities.

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

- i) Positive results by real-time PCR and conventional PCR followed by amplicon sequencing
- ii) Positive results by LAMP and conventional PCR method followed by amplicon sequencing
- iii) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by real-time PCR
- iv) Positive results by *in-situ* hybridisation and detection of WSSV by conventional PCR followed by amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with WSSV are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2. This information can be used for the design of surveys for infection with WSSV, 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 (Durand & Lightner, 2002)	Diagnosis	Clinically diseased shrimp from farms	Gill, pleopod	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	Real-time PCR	Moody <i>et al.</i> , 2022
Real-time PCR (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006)	Diagnosis	Clinically diseased shrimp from farms	Gill, pleopod	<i>Penaeus monodon</i>	100% (n=71)	100% (n=71)	Real-time PCR	Moody <i>et al.</i> , 2022

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

*The nested PCR (Lo *et al.*, 1996a) is linked to false positives for WSSV when they are used to test species of *Cherax quadricarinatus* (Claydon *et al.*, 2004).

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
Real-time PCR (Durand & Lightner, 2002)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	76.8% (n=1591)	99.7% (n=1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022
Real-time PCR (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	82.9% (n=1591)	99.7% (n=1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022

Two real-time PCR methods in parallel (Sritunyalucksana <i>et al.</i> , 2006 and Durand & Lightner, 2002)	Surveillance in apparently healthy animals	Wild populations of crustaceans	Gill, pleopod	<i>Penaeus merguensis</i> , <i>P. esculentus</i> , <i>P. plebejus</i> , <i>Metapenaeus endeavouri</i> , <i>M. bennettiae</i>	98.3% (<i>n</i> =1591)	99.4% (<i>n</i> =1591)	Bayesian latent class analysis	Moody <i>et al.</i> , 2022
---	--	---------------------------------	---------------	--	----------------------------	----------------------------	--------------------------------	----------------------------

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

7. References

- BALASUBRAMANIAN G., SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., SARATHI M. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Studies on the inactivation of white spot syndrome virus of shrimp by physical and chemical treatments, and seaweed extracts tested in marine and freshwater animal models. *J. Fish Dis.*, **29**, 569–572.
- CHANG C.-F., SU M.-S., CHEN H.-Y. & LIAO I.C. (2003). Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.*, **15**, 297–310.
- CHANG P.S., CHEN H.C. & WANG Y.C. (1998). Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crab and lobsters by *in situ* hybridization. *Aquaculture*, **164**, 233–242.
- CHANG P.S., LO C.F., WANG Y.C. & KOU G.H. (1996). Identification of white spot syndrome associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 131–139.
- CHANG Y., CHEN T., LIU W., HWANG J. & LO C. (2011). Assessment of the roles of copepod *Apocyclops royi* and bivalve mollusk *Meretrix lusoria* in white spot syndrome virus transmission. *Mar. Biotechnol.*, **13**, 909–917.
- CHEN I.T., AOKI T., HUANG Y.T., HIRONO I., CHEN T.C., HUANG J.Y., CHANG G.D., LO C.F., WANG H.C. (2011). White spot syndrome virus induces metabolic changes resembling the Warburg effect in shrimp hemocytes in the early stage of infection. *J. Virol.*, **85**, 12919–12928.
- CHEN W.Y., ZHANG H., GU L., LI F. & YANG F. (2012). Effects of high salinity, high temperature and pH on capsid structure of white spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.*, **101**, 167–171.
- CHOTIGEAT W., TONGSUPA S., SUPAMATAYA K. & PHONGDARA A. (2004). Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*, **233**, 23–30.
- CLAYDON K., CULLEN B. & OWENS L. (2004). OIE white spot syndrome virus PCR gives false-positive results in *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 265–268.
- CORBEL V., ZUPRIZAL Z., SHI C., HUANG, SUMARTONO, ARCIER J.-M. & BONAMI J.-R. (2001). Experimental infection of European crustaceans with white spot syndrome virus (WSSV). *J. Fish Dis.*, **24**, 377–382.
- CUELLAR-ANJEL J., WHITE-NOBLE B., SCHOFIELD P., CHAMORRO R. & LIGHTNER D.V. (2012). Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*, **368–369**, 36–39.
- DESRINA, PRAYITNO S.B, VERDEGEM M.C.J, VERRETH J.A.J. & VLAK J.M. (2022). White spot syndrome virus host range and impact on transmission. *Rev. Aquacult.*, 1–18.
- DESRINA, VERRETH J.A.J., PRAYITNO S.B., ROMBOUT J.H.W.M., VLAK J.M. & VERDEGEM M.C.J. (2013). Replication of white spot syndrome virus (WSSV) in the polychaete *Dendronereis* spp. *J. Invertebr. Pathol.*, **114**, 7–10.
- DURAND S.V. & LIGHTNER D.V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *J. Fish Dis.*, **25**, 381–389.
- DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 128–135.

-
- EAST I.J. (2008). Addressing the problems of using the polymerase chain reaction technique as a stand-alone test for detecting pathogens in aquatic animals. *Sci. Tech. Rev.*, **27**, 829–837.
- ESCOBEDO-BONILLA C. M., ALDAY-SANZ V., WILLE M., SORGELOOS P., PENSART M.B. & NAUWYNCK H.J. (2008). A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.*, **31**, 1–18.
- FLEGEL T.W. (1997). Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 433–442.
- HASSON K.W., FAN Y., REISINGER T., VENUTI J. & VARNER P.W. (2006). White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas fresh water systems through imported, frozen bait-shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 91–100.
- HARYADI D., VERRETH J.A.J., VERDEGEM M.C.J. & VLAK J.M. (2015). Transmission of white spot syndrome virus (WSSV) from *Dendronereis* spp. (Peters) (Nereididae) to penaeid shrimp. *J. Fish Dis.*, **38**, 419–428.
- HE J. & ZHOU H. (1996). Infection route and host species of white spot syndrome baculovirus. *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni*, **38**, 65–69.
- HEIDARIEH M., SOLTANI M., MOTAMEDI SEDEH F. & SHEIKHZADEH N. (2013). Low water temperature retards white spot syndrome virus replication in *Astacus leptodactylus* Crayfish. *Acta Sci. Vet.*, **41**, 1–6.
- HUANG J. & YU J. (1995). A new staining method for on-site observation of viral inclusion bodies of penaeid shrimp. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 31–39.
- HUANG J., YU J., WANG X.-H., SONG X.-L., MA C.-S., ZHAO F.-Z. & YANG C.-H. (1995). Survey on the pathogen and route of transmission of baculoviral hypodermal and hematopoietic necrosis in shrimp by ELISA of monoclonal antibody. (*Chinese J.*). *Mar. Fish. Res.*, **16**, 40–50.
- HUANG Y., YIN Z., WENG S., HE J. & LI S. (2012). Selective breeding and preliminary commercial performance of *Penaeus vannamei* for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, **364–365**, 111–117.
- KONO T., SAVAN R., SAKAI M., & ITAMI T. (2004). Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods*, **115**, 59–65.
- LEI Z.-W., HUANG J., SHI C.-Y., ZHANG L.-J. & YU K.-K. (2002). Investigation into the hosts of white spot syndrome virus (WSSV). *Oceanol. Limnol. Sin.*, **33**, 250–258.
- LI Q., ZHANG J.H., CHEN Y.J. & YANG F. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) infectivity for *Artemia* at different developmental stages. *Dis. Aquat. Org.*, **57**, 261–264.
- LIGHTNER D.V. (1996). A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- LIU B., YU Z.M., SONG X.X. & GUAN Y.Q. (2007). Studies on the transmission of WSSV (white spot syndrome virus) in juvenile *Marsupenaeus japonicus* via marine microalgae. *J. Invertebr. Pathol.*, **95**, 87–92.
- LO C.F., AOKI T., BONAMI J.R., FLEGEL T.W., LEU J.H., LIGHTNER D.V., STENTIFORD G., SÖDERHÄLL K., WALKER P.W. WANG H.C., XUN X., YANG F. & VLAK J.M. (2012). *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., & Lefkowitz E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, CA. USA, pp 229–234.
- LO C.F., HO C.H., CHEN C.H., LIU K.F., CHIU Y.L., YEH P.Y., PENG S.E., HSU H.C., LIU H.C., CHANG C.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1997). Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Dis. Aquat. Org.*, **30**, 53–72.
- LO C.F., HO C.H., PENG S.E., CHEN C.H., HSU H.C., CHIU Y.L., CHANG C.F., LIU K.F., SU M.S., WANG C.H. & KOU G.H. (1996b). White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. *Dis. Aquat. Org.*, **27**, 215–225.
-

-
- LO C.F. & KOU G.H. (1998). Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: a review. *Fish Pathol.*, **33**, 365–371.
- LO C.F., LEU J.H., HO C.H., CHEN C.H., PENG S.E., CHEN Y.T., CHOU C.M., YEH P.Y., HUANG C.J., CHOU H.Y., WANG C.H. & KOU G.H. (1996a). Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, **25**, 133–141.
- MAEDA M., ITAMI T., MIZUKI E., TANAKA R., YOSHIZU Y., DOI K., YASUNAGA-AOKI C., TAKAHASHI Y. & KAWARABATA T. (2000). Red swamp crawfish (*Procambarus clarkii*): an alternative experimental host in the study of white spot syndrome virus. *Acta Virol.*, **44**, 371–374.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of White Spot Syndrome virus and Yellow head virus in prawns imported into Australia. *Australian Vet. J.*, **82**, 69–74.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., INOUE K., KIMURA T. & NAKANO H. (1995). Diagnostic techniques of the rod-shaped nuclear virus infection in the kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **30**, 263–269.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H., KOUBE H., INOUE K. & OSEKO N. (1994). Mass mortalities of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, in Japan in 1993: Histopathological study. *Fish Pathol.*, **29**, 141–148.
- MOMOYAMA K., HIRAOKA M., NAKANO H. & SAMESHIMA M. (1998). Cryopreservation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) and its survival in sea water at different temperatures. *Fish Pathol.*, **33**, 95–96.
- MOODY N.J.G., MOHR P.G., WILLIAMS L.M., CUMMINS D.M., HOAD J., SLATER J., VALDETER S.T., COLLING A., SINGANALLUR N.B., GARDNER I.A., GUDKOV N. & CRANE M.St.J. (2022). Performance characteristics of two real-time, TaqMan polymerase chain reaction assays for the detection of WSSV in clinically diseased and apparently health prawns. *Dis. Aquat. Org.*, <https://www.int-res.com/prepress/d03687.html>.
- NAKANO H., HIRAOKA M., SAMESHIMA M., KIMURA T. & MOMOYAMA K. (1998). Inactivation of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV), the causative agent of penaeid acute viraemia (PAV), by chemical and physical treatments. *Fish Pathol.*, **33**, 65–71.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (1997). Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **63**, 193–201.
- NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2011). Optimized PCR assay for detection of white spot syndrome virus (WSSV). *J. Virol. Methods*, **171**, 318–321.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- POULOS B.T., PANTOJA C.R., BRADLEY-DUNLOP D., AGUILAR J. & LIGHTNER D.V. (2001). Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 13–23.
- SAHUL HAMEED A.S., ANILKUMAR M., STEPHEN RAJ M.L. & JAYARAMAN K. (1998). Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. *Aquaculture*, **160**, 31–45.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SATHISH S., RASHEED M., MURUGAN V. & JAYARAMAN K. (2001). White spot syndrome virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). *Aquaculture*, **201**, 179–186.
- SANCHEZ-PAZ A. (2010). White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Vet. Res.*, **41**, 43.
- SATHEESH KUMAR S., ANANDA BHARATHI R., RAJAN J.J.S., ALAVANDI S.V., POORNIMA M., BALASUBRAMANIAN C.P. & PONNIAH A.G. (2013). Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. *Aquaculture*, **402–403**, 119–126.
- SITHIGORNGUL W., RUKPRATANPORN S., PECHARABURANIN N., LONGYANT S., CHAIVISUTHANGKURA P. & SITHIGORNGUL P. (2006). A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 101–106.
- SONG X., HUANG J., WANG C., YU J., CHEN B. & YANG C. (1996). Artificial infection of brood shrimp of *Penaeus chinensis* with hypodermal and hematopoietic necrosis baculovirus. *J. Fish. China*, **20**, 374–378.
-

-
- SRITUNYALUCKSANA K., SRISALA J., MCCOLL K., NIELSEN L. & FLEGEL T.W. (2006). Comparison of PCR methods for white spot syndrome virus (WSSV) infections in penaeid shrimp. *Aquaculture*, **255**, 95–104.
- STENTIFORD G.D., BONAMI J.R. & ALDAY-SANZ V. (2009). A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, yellowhead disease and white spot disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. *Aquaculture*, **291**, 1–17.
- STENTIFORD G.D. & LIGHTNER D.V. (2011). Cases of white spot disease (WSD) in European shrimp farms. *Aquaculture*, **319**, 302–306.
- TSAI M.F., KOU G.H., LIU H.C., LIU K.F., CHANG C.F., PENG S.E., HSU H.C., WANG C.H. & LO C.F. (1999). Long-term presence of white spot syndrome virus (WSSV) in a cultivated shrimp population without disease outbreaks. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 107–114.
- VANPATTEN K.A., NUNAN L.M. & LIGHTNER D.V. (2004). Sea birds as potential vectors of penaeid shrimp viruses and the development of a surrogate laboratory model utilizing domestic chickens. *Aquaculture*, **241**, 31–46.
- VENEGAS C.A., NONAKA L., MUSHIAKE K., SHIMIZU K., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (1999). Pathogenicity of penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV) to kuruma prawn in different developmental stages. *Fish Pathol.*, **34**, 19–23.
- VIDAL O.M., GRANJA C.B., ARANGUREN F., BROCK J.A. & SALAZAR M. (2001). A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *J. World Aquac. Soc.*, **32**, 364–372.
- VIJAYAN K.K., STALIN RAJ V., BALASUBRAMANIAN C.P., ALAVANDI S.V., THILLAI SEK HAR V. & SANTIAGO T.C. (2005). Polychaete worms – a vector for white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **63**, 107–111.
- WANG C.H., YANG H.N., TANG C.Y., LU C.H., KOU G.H. & LO C.F. (2000). Ultrastructure of white spot syndrome virus development in primary lymphoid organ cell cultures. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 91–104.
- WANG H.C., HIRONO I, MANINGAS M.B.B., SOMBOONWIWA K., STENTIFORD G. & ICTV REPORT CONSORTIUM. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Nimaviridae*. In: *Virus Taxonomy: The ICTV 10th Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature*. The ICTV website (www.ictv.global/report/nimaviridae).
- WANG M., CHEN Y., ZHAO Z., WENG S., YANG J., LIU S., LIU C., YUAN F., AI B., ZHANG H., ZHANG M., LU L., YUAN K., YU Z., MO B., LIU X., GAI C., LI Y., LU R., ZHONG Z., ZHENG L., FENG G., LI S.C. & HE J. (2021). A convenient polyculture system that controls a shrimp viral disease with a high transmission rate. *Commun Biol.*, **4**, 1276.
- WITHYACHUMNARNKUL B. (1999). Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.*, **39**, 21–27.
- WONGTEERASUPAYA C., VICKERS J.E., SRIURAIRATANA S., NASH G.L., AKARAJAMORN A., BOONSAENG V., PANYIM S., TASSANAKAJON A., WITHYACHUMNARNKUL B. & FLEGEL T.W. (1995). A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.*, **21**, 69–77.
- WU J.L., SUZUKI K., ARIMOTO M., NISHIZAWA T. & MUROGA K. (2002). Preparation of an Inoculum of White Spot Syndrome Virus for Challenge Tests in *Penaeus japonicus*. *Fish Pathol.*, **37**, 65–69.
- WU W., WU B., YE T., HUANG H., DAI C., YUAN J. & WANG W. (2013). TCTP is a critical factor in shrimp immune response to virus infection. *PLoS One*, **8**, e74460.
- YAN D.C., DONG S.L., HUANG J., YU X.M., FENG M.Y. & LIU X.Y. (2004). White spot syndrome virus (WSSV) detected by PCR in rotifers and rotifer resting eggs from shrimp pond sediments. *Dis. Aquat. Org.*, **59**, 69–73.
- YAN D.C., DONG S.L., HUANG J. & ZHANG J.S. (2007). White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish. *J. Invertebr. Pathol.*, **94**, 144–148.
- YOGANANDHAN K., SYED MUSTHAQ S., NARAYANAN R.B. & SAHUL HAMEED A.S. (2004). Production of polyclonal antiserum against recombinant VP28 protein and its application for the detection of white spot syndrome virus in crustaceans. *J. Fish Dis.*, **27**, 517–522.
- ZENG Y. (2021). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus in the world. *Aquaculture*, **537**, 736509. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736509>.
-

ZHAN W.B., WANG Y.H., FRYER J.L., YU K.K., FUKUDA H. & MENG Q.X. (1998). White Spot Syndrome Virus Infection of Cultured Shrimp in China. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**, 405–410.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L., CAO Y.C. & LI Z.J., YAN D.C. (2010). Assessment of the role of brine shrimp *Artemia* in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Vet. Res. Commun.*, **34**, 25–32.

ZHANG J.S., DONG S.L., DONG Y.W., TIAN X.L. & HOU C.Q. (2008). Bioassay evidence for the transmission of WSSV by the harpacticoid copepod *Nitocra* sp. *J. Invertebrate Pathol.*, **97**, 33–39.

ZHANG J.S., DONG S.L., TIAN X.L., DONG Y.W., LIU X.Y. & YAN D.C. (2006). Studies on the rotifer (*Brachionus urceus* Linnaeus, 1758) as a vector in white spot syndrome virus (WSSV) transmission. *Aquaculture*, **261**, 1181–1185.

*
* *

NB: There are WOA Reference Laboratories for infection with white spot syndrome virus
(please consult the WOA web site:
<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with white spot syndrome virus

NB: FIRST ADOPTED IN 1997 AS WHITE SPOT DISEASE. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2018.

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 *A. 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

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with *A. invadans* in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

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
Belontiidae	<i>Strongylura krefftii</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 machrochir</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 poechii</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

Family	Scientific name	Common name
	<i>Puntius sophore</i>	pool barb
	<i>Rohtee sp.</i>	keti-Bangladeshi
Eleotridae	<i>Oxyeleotris lineolatus</i>	sleepy cod
	<i>Oxyeleotris marmoratus</i>	marble goby
Gobiidae	<i>Glossogobius giuris</i>	bar-eyed goby
	<i>Glossogobius sp.</i>	goby
	<i>Tridentiger obscures obscures</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>	mullet
	<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
Sillaginae	<i>Sillago ciliata</i>	sand whiting
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	wels 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

Family	Scientific name	Common name
	<i>Leiopotherapon unicolor</i>	spangled perch
	<i>Scortum barcoo</i>	Barcoo Grunter
	<i>Therapon sp.</i>	therapon
Toxotidae	<i>Toxotes chatareus</i>	common archerfish
	<i>Toxotes lorentzi</i>	primitive acherfish

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 (*Catla catla*), rohu (*Labeo rohita*) and mrigal (*Cirrhinus mrigala*), revealed resistance to *A. invadans* (Pradhan et al., 2007), even though they are naturally susceptible species. Experimental infections demonstrated that goldfish (*Carassius auratus*) are susceptible (Hatai et al., 1977; 1994), but common carp (*Cyprinus carpio*) (Wada et al., 1996), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Khan et al., 1998) and European eel (*Anguilla anguilla*), (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 *A. phanomyces 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; Ibrahimi *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; Ibrahimi *et al.*, 2018). In advanced stages of the disease, the severity of the disease results in death of the fish (Hawke *et al.*, 2003; Ibrahimi *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 polyplanetism) (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; Ibrahimi *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.

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

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 (Iberahim *et al.*, 2018).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

~~Routine~~ There are no published protocols for *A. invadans* 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 (Iberahim *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.

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).

3.3. 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 *A. invadans* 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 have been evaluated and found to be suitable. The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been thoroughly evaluated, therefore, larger animals should be processed and tested individually 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.

WOAH 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 WOA Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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 <u>Clinical signs</u>	±	±	±	<u>NA</u>	+	+	+	<u>NA</u>				
<u>Squash mounts</u>					±	±	±	<u>1</u>	±	±	±	<u>1</u>
Histopathology					++	++	++	1	++	++	++	1
Cytopathology												
Cell or artificial media culture					++	++	++	1	+	+	+	1
Real-time PCR												
Conventional PCR					++	++	++	1				
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation									++	++	++	1
Bioassay												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Other antigen detection methods												
Other method												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH 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. 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 Observation for clinical signs

Using observational data of clinical signs (see Section 2.3.2 *Clinical signs, including behavioural changes*) for targeted surveillance, a 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*. 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.

4.2. 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).

4.23. 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.

4.23.1. 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.

4.23.2 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.

4.34. Cell culture for isolation

4.34.1. 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 glucose/yeast extract (GY) agar (see Table 4.1) and transferred to a fresh GY agar tube once every 1–2 weeks (Hatai & Egusa, 1979).

4.34.2. 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*.

4.34.3. 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 glucose/peptone/yeast (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 4.4.3.1), 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 4.4.3.1. Media for isolation, growth and sporulation of *Aphanomyces invadans* cultures

GP (glucose/peptone) medium	GPY (glucose/peptone/yeast) broth	GPY agar	GY agar (<u>glucose/yeast</u>)	Autoclaved pond water
3 g litre ⁻¹ glucose 1 g litre ⁻¹ peptone 0.128 g litre ⁻¹ MgSO ₄ .7H ₂ O 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	GP broth + 0.5 g litre ⁻¹ yeast extract	GPY broth + 12 g litre ⁻¹ technical agar	1% glucose, 0.25% yeast extract, 1.5% agar	Sample pond/lake water known to support oomycete growth. Filter through Whatman 541 filter paper. Combine one part pond water with two parts distilled water and autoclave. pH to 6–7.

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

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 2.5 *Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.3.0 *General information (diseases of fish)*. Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

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*. Oidtmann *et al.* (2008) demonstrated cross reactivity of the Phadee *et al.* (2004b) assay with *A. frigidophilus* when more than 10 ng of template DNA of *A. frigidophilus* was used in the PCR.

<u>Pathogen/ target gene</u>	<u>Primer/probe (5'–3')</u>	<u>Concentration</u>	<u>Cycling parameters</u>
<u>Method 1: Vandersea <i>et al.</i>, 2006; GenBank Accession No.: AF396684; Product amplicon size: 234bp</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1)</u>	<u>Fwd Ainvad-2F: TCA-TTG-TGA-GTG-AAA-CGG-TG</u> <u>Rev Ainvad-ITSR1: GCT-AAG-GTT-TCA-GTA-TGT-AG</u>	<u>0.025 nM</u> <u>0.025 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>95°C/30 sec, 56°C/45 sec, 95°C/30 sec,</u> <u>72°C/2.5 min, 95°C/30 sec</u>
<u>Method 2: Phadee <i>et al.</i>, 2004b; GenBank Accession No.: AF396683-AF396684; Product amplicon size: 550bp</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1-ITS2)</u>	<u>Fwd ITS11: GCC-GAA-GTT-TCG-CAA-GAA-AC</u> <u>Rev ITS23: CGT-ATA-GAC-ACA-AGC-ACA-CCA</u>	<u>500 nM</u> <u>500 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>94°C/30 sec, 65°C/45 sec, 72°C/1 min</u>
<u>Method 3: Oidtmann <i>et al.</i>, 2008; GenBank Accession No.: EU422990; Product amplicon size: 564</u>			
<u><i>Aphanomyces invadans</i> (ITS1-ITS2)</u>	<u>Fwd BO73: CTT-GTG-CTG-AGC-TCA-CAC-TC</u> <u>Rev BO639: ACA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC</u>	<u>600 nM</u> <u>600 nM</u>	<u>35 cycles:</u> <u>96°C/1 min, 58°C/1 min, 72°C/1 min</u>

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 µM 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 µl. 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 µM 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 µl. 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'-AGA-CCA-GAT-TAC-ACT-ATC-TC-3'). The PCR mixture contains 0.6 µM 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 µl of DNA template extracted from 25 mg of infected tissue and suspended in 100 µl buffer) in a 50 µl 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).

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

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] Igepal-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/were 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 (0.007mg 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* (as described in Section 4.1 Observation for clinical signs). 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/compartments/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. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free. There are currently no WOA Reference Laboratories designated for EUS.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status...¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. ~~Geographical~~ Hydrographical 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*²
- 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 of hyphae characteristic (direct or by microscopy) of *A. invadans*
- v) Culture and isolation of *A. invadans*-type colonies

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

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

¹ For example transboundary commodities.

² Note that surveillance of apparently healthy populations for EUS is based on examination of target populations for clinical signs of infection with *A. invadans* (see Section 5 Test[s] recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations).

- 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. and 6.3.2. (no data are currently available for either). 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 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, DSp = 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, DSp = diagnostic specificity.

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., SHARIFPOUR 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 Megasytematics 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.*, **11**, 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 species 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., PACLIBARE 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. Phylogenet. 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., KONDOH 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 WOA Reference Laboratories for infection with *Aphanomyces invadans*
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/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.

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 EHN_V 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 EHN_V 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 tandanus*), 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 EHN_V 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

None known

Rainbow trout: The high case fatality rate and low prevalence of infection with EHN_V in natural infections in rainbow trout means that the recruitment rate of carriers is likely to be very low (<2%) (Whittington *et al.*, 1994). EHN_V has been detected in growout fish but histopathological lesions consistent with infection with EHN_V indicated an active infection rather than a carrier state (Whittington *et al.*, 1999). Anti EHN_V 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: EHN_V 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

~~None demonstrated. 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). European perch from distinct geographical areas with and without a history of EHNV have been tested under experimental conditions and have demonstrated susceptibility to EHN (Becker *et al.*, 2016). 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 (Becker *et al.*, 2019; 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 and sporadic outbreaks involving small numbers of European perch (Becker *et al.*, 2019; Whittington *et al.*, 2010).

See WOAHS WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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 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 peroxydisulphate 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 i.e. European perch where these are available, otherwise rainbow trout or the other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally.
- ii) Risk-based criteria should be employed to preferentially sample epidemiological units 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 apparently healthy fish collected in such a way that all parts of the farm or affected waterbody 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

Non-lethal samples (blood, fin, gill, integument or mucous) are unsuitable for testing EHNV. Not applicable.

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 (undistilled) 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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	+++	+++	+++	2-1	+++	+++	+++	2-1	++	++	++	2-1
Immunohistochemistry					+	+	+	1				
Real-time PCR	+++	+++	+++	2-1	+++	+++	+++	2	++	++	++	2-1
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1	++	++	++	1
<u>Conventional PCR followed by amplicon sequencing</u>									+++	+++	+++	3-1
<i>In-situ</i> 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 WOAHP 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.

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-lines for virus isolation~~/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; ~~and BF-2, EPC, or CHSE 214 incubated at 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 WOAHP 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 and amplicon sequencing.~~~~

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 EHN. 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 EHN 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.

The identity of viruses in cell culture is determined by PCR and amplicon sequencing.

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 for the detection of ranaviruses (Jaramillo *et al.*, 2012; Pallister *et al.*, 2007; Stilwell *et al.*, 2018), EHN can only be detected when these methods are combined with methods that specifically detect EHN, none has been adequately validated according to OIE guidelines for primary detection of EHN. 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 EHN, identification of EHN 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 EHN 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.

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 2.5 Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis of Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish). Each diagnostic sample should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots.

Extraction of nucleic acids

Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.

4.4.1. Real-time PCR

The ranavirus real-time screening protocol in use at the WOAH Reference Laboratory is based on Pallister *et al.*, 2007. Alternative real-time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV 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) detects multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

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 EHNV 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 RANA CON R Probe RANA CON Pr Primer	5' CTC ATC GTT CTG GCC ATC A 3' 5' TCC CAT CGA GCC GTT CA 3' 5' 6FAM CAC AAC ATT ATC CGC ATC MGB 3'	Pallister <i>et al.</i> , 2007
C1096 C1097 Primer	GAC TGA CCA ACG CCA GCC TTA ACG GCG GTG GTG TAC CCA GAG TTG TCG	Jaramillo <i>et al.</i> , 2012
RanaF1 RanaR1 Probe RanaP1	CCA GCC TGG TGT ACG AAA ACA ACT GGG ATG GAG GTG GCA TA 6FAM TGG GAG TCG AGT ACT AC MGB	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

Primer and probe sequences

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Pallister <i>et al.</i> , 2007); GenBank Accession No.: DQ457105			
Ranavirus/MCP	Fwd: RANA CON: CTC-ATC-GTT-CTG-GCC-ATC-A Rev: RANA CON: TCC-CAT-CGA-GCC-GTT-CA Probe: RANA CON Pr FAM-CAC-AAC-ATT-ATC-CGC-ATC-MGB	900 nM for each primer, 250 nM for probe	45 cycles of 95°C/15 sec; 60°C/60 sec

Method 2 (Jaramillo <i>et al.</i>, 2012); GenBank Accession No.:			
Ranavirus/MCP	C1096 GAC-TGA-CCA-ACG-CCA-GCC-TTA-ACG C1097 GCG-GTG-GTG-TAC-CCA-GAG-TTG-TCG	12.5 pM for each primer	40 cycles of 95°C/30 sec; 58°C/30 sec
Method 3 (Stilwell <i>et al.</i>, 2018); GenBank Accession No.:			
Ranavirus/MCP	Fwd: RanaF1: CCA-GCC-TGG-TGT-ACG-AAA-ACA Rev: RanaR1 ACT-GGG-ATG-GAG-GTG-GCA-TA Probe: RanaP1 FAM-TGG-GAG-TCG-AGT-ACT-AC-MGB	900 nM for each primer, 250 nM for probe	40 cycles of 95°C/30 sec; 60°C/45 sec

The ranavirus real time screening protocol in use at the OIE Reference Laboratory, based on Pallister *et al.*, 2007. Alternative real time PCR assays can be used according to published protocols for detection of the major capsid protein gene sequence of EHNV 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) detects multiple ranavirus species using hydrolysis probe detection chemistry.

Details of the controls to be run with each assay are set out in Section 5.5. of Chapter 2.2.1. of Section 2.2.

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 EHNV 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 EHNV and BIV from each other and from FV3 and ECV. **Both MCP1 and MCP2 target a region within the capsid protein gene (Marsh *et al.*, 2002).**

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. 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.

Primer and probe sequences

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1 (Marsh et al., 2002): Product amplicon size MCP-1 is 321 bp and product amplicon size MCP-2 is 625 bp			
MCP-1 Gene location: 266-586	M151: AAC-CCG-GCT-TTC-GGG-CAG-CA M152: CGG-GGC-GGG-GTT-GAT-GAG-AT	250 ng of each primer	35 cycles of 50°C for 30 sec NOTE: the annealing temperature may be increased to 60 or 62°C to reduce non-specific amplification when the assay is used to test fish tissues.
MCP-2 Gene location: 842-1466	M153: ATG-ACC-GTC-GCC-CTC-ATC-AC M154: CCA-TCG-AGC-CGT-TCA-TGA-TG		

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.

The size of the PCR amplicon is should be verified, for example by agarose gel electrophoresis, and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.

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 DAKO¹. The primary affinity purified rabbit-anti-EHNV antibody (Lot No. M708) is supplied freeze-dried by the WOA 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 antibody 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.

¹ 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 <http://www.dakosytomahon.com> for links to other countries.

-
- 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

EHNH 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 WOA Reference Laboratory.

4.8. Bioassay

Not applicable.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

An antigen ELISA for detection of EHNH and an EHNH antibody detection ELISA have been ~~described~~ reported (Whittington & Steiner, 1993). Indirect ELISA for detection of antibodies induced following exposure to EHNH has been described for rainbow trout and European perch (Whittington *et al.*, 1994; 1999; Whittington & Reddacliff, 1995). 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 EHNH. Indirect ELISA for detection of antibodies induced following exposure to EHNH 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 EHNH; however, the available methods are not specific for EHNH. Any real-time PCR positive samples should be tested by conventional PCR and sequence analysis to distinguish EHNH from other 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 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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case. If a laboratory-Competent Authority does not have the capacity-capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status²

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link to an infected population. ~~Geographic-Hydrographical~~ 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) ~~EHNV-typical CPE in cell culture~~ ~~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 followed by 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.~~

6.2 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 followed by 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.~~

² For example transboundary commodities.

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. **(no data are currently available)**. 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 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>)	95%* (n = 106)	100% (n = 80)	Virus isolation in BF-2 cell culture	Stilwell <i>et al.</i> , 2018

DSe: = diagnostic sensitivity, DSp = 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, DSp = 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 (*Gadua morhua*) and turbot (*Psetta maxima*) with reference to other ranaviruses. *Archives of Virology* **155**, 1261-1271

ARIEL E., NICOLAISEN 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., GILLIGAN D., ASMUS M., TWEEDIE A. & WHITTINGTON R.J. (2019). Geographic distribution of Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in freshwater fish in south eastern Australia: lost opportunity for a notifiable pathogen to expand its geographic range. *Viruses*, **11, 315 doi:10.3390/v11040315**

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. Eight 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., TWEEDIE 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 haematopoeitic 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., TWEEDIE 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. & WALTZEK T.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 a WOA Reference Laboratory for infection with epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)
(please consult the WOA web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on infection with EHNV.

The WOA 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.

Annexe 30. Point 10.2.3. – Section 2.2.1. du chapitre 2.3.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe »

CHAPTER 2.3.9.

INFECTION WITH SPRING VIRAEMIA OF CARP VIRUS

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

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

Family	Scientific name	Common name
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Bream
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Bighead carp
	<i>Carassius auratus</i>	Goldfish
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Grass carp
	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp (all varieties and subspecies)
	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Golden shiner
	<i>Pimephales promelas</i>	Flathead minnow
	<i>Percocypris pingi</i>	Jinsha bassbarbel carp
	<i>Rutilus kutum</i>	Caspian white fish
	<i>Rutilus rutilus</i>	Roach
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Wels catfish

[...]

CHAPTER 2.4.2.

INFECTION WITH *BONAMIA EXITIOSA*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Bonamia exitiosa* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: Argentinean flat oyster (*Ostrea puelchana*), Ariake cupped oyster (*Magallana (syn. Crassostrea) ariakensis*), Australian mud oyster (*Ostrea angasi*), Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), crested oyster (*Ostrea equestris*), eastern oyster (*Crassostrea virginica*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), and Olympia oyster (*Ostrea lurida*) and Suminoe oyster (*Magallana (syn. Crassostrea) ariakensis*).

2.2. 42. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *B. exitiosa* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: dwarf oyster (*Ostrea stentina*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Pacific cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] gigas*) and Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*).

[...]

CHAPTER 2.4.3.

INFECTION WITH *BONAMIA OSTREAE*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Bonamia ostreae* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: Ariake cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), and Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), and Suminoe oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] ariakensis*).

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 *B. ostreae* according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: Argentinean flat oyster (*Ostrea puelchana*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: beadlet anemone (*Actina equina*), brittle star (*Ophiothrix fragilis*), European sea squirt (*Asciidiella aspersa*), grouped zooplankton and Pacific cupped oyster (*Magallana [syn. Crassostrea] gigas*).

[...]

CHAPTER 2.4.4.

INFECTION WITH *MARTEILIA REFRINGENS*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Oyster species: *Ostrea edulis* (Grizel *et al.*, 1974); and mussel species: *Mytilus* species including *M. edulis* (Le Roux *et al.*, 2001) and *M. galloprovincialis* (López-Flores *et al.*, 2004; Novoa *et al.*, 2005; Robledo *et al.*, 1995a; Villalba *et al.*, 1993b).

Infection with *M. refringens* was demonstrated in the oyster *Ostrea stentina*, the clam species *Solen marginatus* (López-Flores *et al.*, 2008a) and *Chamelea gallina* (López-Flores *et al.*, 2008b) and the mussel *Xenostrobus securis* (Pascual *et al.*, 2010).

Other *Ostrea* species including *O. chilensis*, *O. puelchana*, *O. angasi*, and *O. denselamellosa* were found to be infected with *Marteilia* sp. when deployed in an infected area (Berthe *et al.*, 2004; Martin, 1993). However, in these cases, the parasite identification was not done at the molecular level.

In addition, different stages, including mature stages, of parasites looking like *M. refringens*, were observed by histology in cockles (*Cerastoderma edule*), clam species (*Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Tapes rhomboides*, *T. pullastra*, *Ensis minor*, *E. siliqua*), and oysters (*Crassostrea virginica*) among other bivalve species (Berthe *et al.*, 2004; López-Flores *et al.*, 2008b). In all these cases, parasite identification is uncertain.

Lastly, the copepod *Paracartia grani* was shown to be susceptible to *M. refringens* and this species could participate in the transmission of the parasites between bivalves (see 2.3.1)

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Marteilia refringens* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code) are: blue mussel (*Mytilus edulis*), dwarf oyster (*Ostrea stentina*), European flat oyster (*Ostrea edulis*), European razor clam (*Solen marginatus*), golden mussel (*Xenostrobus securis*), Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) and striped venus clam (*Chamelea gallina*).

Additionally, a copepod species (*Paracartia grani*) has been found to meet the criteria for listing as susceptible to infection with *Marteilia refringens* and is considered an intermediate host.

2.2.2. Susceptible stages of the host Species with incomplete evidence for susceptibility

Juveniles and older life stages are known to be susceptible (Grizel, 1985).

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *M. refringens* according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), a copepod (*Paracartia latisetosa*) and Japanese flat oyster (*Ostrea denselamellosa*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*), grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*), Pacific cupped oyster (*Magallana* [syn. *Crassostrea*] *gigas*) and zooplankton (*Acartia discaudata*, *Centropages typicus*, *Euterpina acutifrons*, unidentified *Oithona* sp., *Penilia avirostris*).

[...]

SECTION 2.2.

DISEASES OF CRUSTACEANS

CHAPTER 2.2.0.

GENERAL INFORMATION

A. SAMPLING

1. Assessing the health status of the epidemiological unit

1.1. Sample material to be used for tests

Sample material and the number of samples to be collected depend on the specific disease or pathogen, the size of animals and the objective of testing (i.e. surveillance of apparently healthy animals, presumptive diagnosis of clinically affected animals or confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis of overt disease, detection of subclinical infection in apparently healthy animals or sampling for targeted surveillance to demonstrate freedom from infection with a specified pathogen). See the individual disease chapters in this *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

1.2. Specifications according to crustacean populations

For details of animals to sample for a specific listed disease, see the relevant disease chapter in the *Aquatic Manual*. The design of a surveillance system for demonstrating disease-free status for a country, zone or compartment should be in accordance with the recommendations of the WOA *Aquatic Code* Chapter 1.4. *Aquatic animal disease surveillance*.

Animals to be sampled are selected as follows:

- i) Susceptible species should be sampled proportionately or following risk-based criteria for targeted selection of lots epidemiological units or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. replacement with stocks of unknown disease status).
- ii) If more than one water source is used for production, animals from all water sources should be included in the sample.
- iii) For the study of presumptively diseased crustaceans select those animals that are moribund, discoloured, displaying abnormal behaviour, or otherwise abnormal. If weak, abnormally behaving discoloured or freshly dead (not decomposed) animals are present, such animals should be selected. If such animals are not present, animals should be selected in such a way that all epidemiological units of the farm or waterbody are proportionately represented in the sample.
- iv) When sampling is aimed at assessing disease occurrence (e.g. estimation of disease prevalence), the preferred selection method is probability sampling.

1.3. Specifications according to clinical status

In clinical disease episodes, carefully selected quality specimens with representative lesions should be obtained from live or moribund crustaceans. Collection of dead specimens during disease outbreaks should be avoided when possible, but recently dead samples may be suitable for some diagnostic assays provided they are not decomposed. When cultured or wild

crustacean stocks are presenting clinical signs of an active disease that are consistent with, or suggestive of, any one of the WOA-listed crustacean diseases, care should be taken to ensure that the samples collected are preserved appropriately for the anticipated diagnostic tests (see sample preservation section for recommended methods). In situations other than when clinical disease episodes are investigated, for the WOA-listed diseases it is highly recommended that the scheduling of sampling be planned (i.e. by farm schedule, season, etc.) so that the particular life-stage(s) are sampled at a time when the pathogen of concern is most likely to be detected. Disease-specific recommendations are provided in Section 3 *Sample selection, sample collection, transportation and handling* of the individual chapters.

~~Recently dead crustaceans may be suitable (depending on their condition) for certain diagnostic assays such as nucleic acid detection techniques.~~

1.4. Specifications according to crustacean size

See the individual disease chapters in this *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

2. General processing of samples

2.1. Macroscopic examination

See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

2.2. Virological examination

~~Virological examination of crustaceans is not routinely used for listed diseases. *Macrobrachium rosenbergii* has been isolated in insect cell lines, but it is not a recommended method.~~

2.2.1. Transportation and antibiotic treatment of samples

~~Culture systems for crustacean viruses are not available; antibiotic treatment of samples is not required. For transportation of samples see Section 3 of disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. Not applicable.~~

2.2.2. Virus isolation

~~For processing of tissues see Section 3 of disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. Not applicable.~~

2.2.3. Treatment to neutralise enzootic viruses

Not applicable.

2.3. Bacteriological examination

~~Bacteriological examination of crustaceans is not routinely used for listed diseases, but it may be used for the strains of *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*_{AHPND}) that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and for can be isolated on standard bacteriological media. *Hepatobacter penaei*, the causative agent of necrotising hepatopancreatitis (NHP) has not been cultured and, because of its very small size, bacteriological examination may be limited to Gram staining.~~ See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual* for identification methods.

2.4. Parasitic examination

Not applicable for currently listed diseases.

2.5. Fungal and other protists examination

See Chapter 2.2.2 *Infection with *Aphanomyces astaci* (Crayfish plague)*.

B. MATERIALS AND BIOLOGICAL PRODUCTS REQUIRED FOR THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CRUSTACEAN PATHOGENS

1. Crustacean viruses

1.1. Crustacean cell lines

Not applicable. There are currently no confirmed or documented crustacean cell lines.

1.2. Culture media

Not applicable.

1.3. Virus positive controls and antigen preparation

1.3.1. Virus nomenclature

In general, the virus nomenclature used in the disease-specific chapters follows the most recent taxonomy for viruses as given in the Report of the Committee on Taxonomy of Viruses (see: [ICTV \[ictvonline.org\]](http://ictv.ictvonline.org) for latest information). Also provided in the disease-specific chapters are the disease and virus names that are in common use by the shrimp/prawn farming industries, as well as the more common synonyms that have been used or are in current use.

1.3.2. Virus production for experimental purposes

As no cell lines (crustacean, arthropod, or vertebrate) are known that can be used to produce crustacean viruses, infection of known susceptible host species (which are free of infection by-with the pathogenic agent in question) is the preferred method for virus production for experimental purposes.

1.3.3. Virus preservation and storage

Infectivity of all of the WOA-listed crustacean viruses can be preserved by freezing infected whole crustaceans or infected target tissues at –20°C for short-term storage, or at –80°C or lower for long-term storage.

2. Crustacean bacteria

2.1. Culture media

See Chapter 2.2.1. *Acute hepatopancreatic necrosis disease* for details.

2.2. Storage of cultures

Lyophilisation or storage at –70°C is recommended for long-term storage of bacterial cultures.

3. Crustacean parasites

3.1. Culture media

Not applicable for currently listed diseases.

3.2. Storage of cultures

Not applicable for currently listed diseases.

4. Crustacean fungi and protists

4.1. Culture media

See chapter 2.2.2. [Infection with *Aphanomyces astaci* \(crayfish plague\)](#)

4.2. Storage of cultures

See Chapter 2.2.2.

5. Techniques

The available diagnostic methods that may be selected for diagnosis of the WOA-listed crustacean diseases or detection of their aetiological agents are based on:

- i) Gross and clinical signs.
- ii) Direct bright-field, phase-contrast or dark-field microscopy with whole stained or unstained tissue wet-mounts, tissue squashes, and impression smears; and wet-mounts of faecal strands.
- iii) Histology of fixed specimens.
- iv) Bioassays of suspect or subclinical carriers using a highly susceptible host (life stage or species) as the indicator for the presence of the pathogen.
- v) Antibody-based tests for pathogen detection using specific antisera, polyclonal antibodies (PABs) or monoclonal antibodies (MAbs).
- vi) Molecular methods (including sequencing):

DNA probes or RNA probes for *in-situ* hybridisation (ISH) assays with histological sections of fixed tissues;

Conventional and real-time PCR/RT-PCR and LAMP for direct assay with fresh tissue samples or with extracted DNA or RNA.

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 crustaceans should be processed and tested individually. However, for eggs, larvae and postlarvae pooling of larger numbers (e.g. ~150 or more eggs or larvae or 50 to 150 postlarvae depending on their size/age) may be necessary to obtain sufficient sample material to run a diagnostic assay.

5.1. Antibody-based tests

See disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

5.2. Direct microscopy

Samples for direct microscopic examination should be examined as soon as possible after collection. Use live specimens whenever possible, or use fresh, chilled, or fixed specimens when live specimens are not practical. If an adequate field laboratory is available, it should be used to process and examine samples near the site of collection.

5.3. Histological techniques

Only live or moribund specimens with clinical signs should be sampled for histology. Collect crustaceans by whatever means are available with a minimum of handling stress. Hold animals in a container appropriate for maintaining suitable water quality and supply adequate aeration to the container if the crustaceans are to be held for a short period of time before actual fixation.

5.3.1. Fixation

A general rule is that a minimum of ten volumes of fixative should be used for one volume of tissue sample (i.e. a 10 g sample of crustacean would require 100 ml of fixative).

i) Davidson's AFA (alcohol, formalin, acetic acid) fixative

Davidson's AFA fixative is recommended for most histological applications. The fixative is rapid, reduces autolytic changes in decapod crustaceans (i.e. especially in crustaceans in tropical and subtropical regions), and its acidic content decalcifies the cuticle. The formulation for Davidson's AFA is (for 1 litre):

330 ml 95% ethyl alcohol
220 ml 100% freshly made formalin (a saturated 37–39% aqueous solution of formaldehyde gas)
115 ml glacial acetic acid
335 ml tap water (for marine crustaceans, seawater may be substituted)
Store the fixative in glass or plastic bottles with secure caps at room temperature.

ii) Fixation procedures with Davidson's AFA

For larvae and postlarvae that are too small to be easily injected with fixative using a tuberculin syringe: Using a fine mesh screen or a Pasteur pipette, select and collect specimens. Immerse crustaceans selected for sampling directly in the fixative. Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

For juveniles that are too small to be injected: Select and collect specimens. Use a needle or fine-pointed forceps to incise the cuticle and immediately immerse crustaceans selected for sampling directly into the fixative. Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

For large juveniles and adults: to ensure proper fixation, kill the crustacean using a humane method, then immediately inject fixative (use 5–10% volume:weight). Fix for 12–24 hours in fixative and then transfer to 70% ethyl alcohol for storage.

The hepatopancreas (HP) should be injected first and at two or more sites, with a volume of fixative sufficient to change the HP to a white-to-orange colour (when Davidson's AFA is used); then inject fixative into adjacent regions of the cephalothorax, into the anterior abdominal region, and into the posterior abdominal region.

The fixative should be divided between the different regions, with the cephalothoracic region, specifically the HP, receiving a larger share than the abdominal region.

Immediately following injection, slit the cuticle with dissecting scissors, from the sixth abdominal segment to the base of the rostrum, being particularly careful not to cut deeply into the underlying tissue. The incision in the cephalothoracic region should be just lateral to the dorsal midline, while that in the abdominal region should be approximately mid-lateral.

For crustaceans larger than ~12 g: After injection of fixative, the body should then be transversely bisected, at least once, just posterior to the abdomen/cephalothorax junction, and (optional) again mid-abdominally.

For very large crustaceans (e.g. lobsters, crabs, adult penaeids, adult Macrobrachium rosenbergii, some species and life stages of crabs, crayfish, etc.): The organs of interest may be excised after injection of fixative. Completion of fixation of these tissue samples is then handled as outlined previously.

Following injection, incisions and bisection/trisection, or excision of key organs, immerse the specimen in the fixative (use 10:1 fixative:tissue ratio).

Allow fixation to proceed at room temperature for 24–72 hours depending on the size of crustacean being preserved. Longer fixation times in Davidson's AFA may be used to thoroughly decalcify the shell of crabs, lobsters, crayfish, etc.

Following fixation, the specimens should be transferred to 70% ethyl alcohol, where they can be stored for an indefinite period.

iii) Transport and shipment of preserved samples

As large volumes of alcohol should not be mailed or shipped, the following methods are recommended: Remove the specimens from the 70% ethyl alcohol. For larvae, postlarvae, or small juveniles, use leak-proof, screw-cap plastic vials if available; if glass vials must be used, pack to prevent breakage. For larger specimens, wrap samples with white paper towels to completely cover (do not use raw or processed cotton). Place towel-wrapped specimens in a sealable plastic bag and saturate with 70% ethyl alcohol. Insert the label and seal the bag. Place the bag within a second sealable bag.

Multiple small sealable bags can again be placed within a sturdy, crush-proof appropriately labelled container for shipment (for details see *Aquatic Code* Chapter 5.10 *Measures concerning international transport of aquatic animal pathogens and pathological material*).

5.4. Transmission or scanning electron microscopy

Electron microscopy (EM – transmission or scanning) is a valuable research tool for the study of disease in crustaceans. However, EM methods are not routinely used for diagnosis of the diseases listed by WOA. H.

5.5. Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis

Molecular techniques, including the use of nucleic acid probes for *in-situ* hybridisation, conventional PCR and real-time PCR, have been developed for the identification of many pathogens of aquatic animals. Real-time PCR methods, in general, have high sensitivity and specificity and, following adequate validation, can be used for direct detection of viral nucleic acids in samples prepared-extracted from crustacean tissue. The Molecular techniques can be used in direct surveillance of apparently healthy populations, if they have a high level of diagnostic sensitivity, as well as in the diagnosis of clinically affected animals.

When using PCR as a diagnostic method, the design of primers and probe, the use of positive and negative controls, as well as validation of the PCR method chosen are important. Real-time PCR is a powerful technique particularly for analysing relatively high numbers of samples (e.g. for surveillance) via high-throughput testing. Several nucleic acid probe and PCR protocols are included in this version of the *Aquatic Manual* as screening, diagnostic or confirmatory methods for crustaceans and can be undertaken as the standard method. Following real-time PCR-positive results, where possible, conventional PCR with sequencing of PCR products should be used for confirmation of pathogen identity.

As with all PCR protocols, optimisation may be necessary depending on the reagents, equipment and the plasticware used. PCR is prone to false-positive and false-negative results. False-positive results (negative samples giving a positive reaction) may arise from either product carryover from positive samples or, more commonly, from cross-contamination by PCR products from previous tests. False-negative results (positive samples giving a negative result) may lead to unwanted transmission of pathogens and biosecurity failure.

Each diagnostic samples should be tested in duplicate, i.e. by testing two aliquots, and Both aliquots must produce positive results for a sample to be deemed positive. In instances where a sample produces one positive and one negative result, these are deemed indeterminate and should be retested. In addition, the following controls should be run with each assay: negative extraction control (e.g. a tissue [or equivalent sample that is under test]) sample from a known uninfected animal; positive control (preferably, one that can be distinguished from the pathogen genomic sequence [e.g. an artificial plasmid], thus allowing detection of any cross-contamination leading to a false positive result); no template control (all reagents with water replacing the template); internal positive control (internal housekeeping gene). All controls should produce their expected results in order for the diagnostic test result to be valid.

To minimise the risk of contamination, aerosol-preventing barrier pipette tips should be used for all sample preparation and PCR preparation steps. Additionally, all PCRs should be prepared in a clean area that is separate from the area where the nucleic acid extraction, amplifications and gel electrophoresis are performed. Do not share equipment (e.g. laboratory coats and consumables) between areas and, where possible, restrict access between areas. Contaminating PCR products can be carried on equipment, clothes, shoes, pens/marker pens and paper (e.g. workbooks). Also, ensure all work-tops and air-flow cabinets/hoods used for the extractions and PCR set-up are regularly cleaned and decontaminated. To ensure sample integrity, always store the samples (e.g. in a freezer or refrigerator) in a location away-separate from the molecular biology laboratory and reagents

5.5.1. Sample preparation and types

Samples should be prepared to preserve the nucleic acid of the pathogen and should be handled and packaged with the greatest care to minimise the potential for cross-contamination among the samples or target degradation before the assay can be performed. Samples selected for nucleic acid-based or antibody-based diagnostic tests should be handled and packaged (in new plastic sample bags or bottles) with care to minimise the potential for cross-contamination among the sample set taken from different (wild or farmed) stocks, tanks, ponds, farms, etc. A water-resistant label, with the appropriate data filled out, should be placed within each package or container for each sample set.

Some suitable methods for preservation and transport of samples taken for molecular ~~or antibody-based~~ tests are:

- i) *Live specimens*: these may be processed in the field or shipped to the diagnostic laboratory for testing.
- ii) *Haemolymph*: this tissue is the preferred sample for certain molecular and antibody-based diagnostic tests (see disease-specific chapters). Samples may be collected by needle and syringe through cardiac puncture, from the haemocoel (i.e. the ventral sinus in penaeids), or from a severed appendage, and immediately transferred to a tube that is half full with ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol or suitable nucleic acid preservative.
- iii) *Iced or chilled specimens*: these are specimens that can be transported to the laboratory for testing within 24 hours. Pack samples in sample bags surrounded by an adequate quantity of wet ice ~~or freezer bricks~~ around the bagged samples in an insulated box and ship to the laboratory.
- iv) *Frozen ~~whole~~ specimens*: select live specimens according to the criteria listed in disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*. ~~In situations where it is not possible to get the specimens to the laboratory alive, they may be~~ quick ~~freeze-frozen~~ in the field using crushed dry-ice or ~~freeze-frozen~~ in the field laboratories using a mechanical freezer at -20°C or lower temperature. Prepare and insert the label into the container with the samples, pack samples with an adequate quantity of dry-ice in an insulated box, and ship to the laboratory.
- v) *Alcohol-preserved samples*: in regions where the storage and shipment of frozen samples is problematic, ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol may be used to preserve, store, and transport certain types of samples for molecular tests. Alcohol-preserved samples are generally not suitable for antibody-based tests. Whole crustaceans (any life stage provided the specimen is no larger than 2–3 g), excised tissues (i.e. pleopods) from large crustaceans, or haemolymph may be preserved in ~~90–95%~~ **80% analytical grade** ethanol, and then packed for shipment according to the methods described in Section 5.3.1, paragraph iii (see chapter 5.10 of the *Aquatic Code* for additional details on the international transport of such samples).
- vi) *Fixed tissues for in-situ hybridisation*: For this purpose, classic methods for preservation of the tissues are adequate. ~~Neutral-buffered formalin is usually a good choice. Fixation for over 24–48 hours should be avoided; samples should be transferred to ethanol following formalin treatment.~~

5.5.2. Preservation of RNA and DNA in tissues

For routine diagnostic testing by PCR or RT-PCR, samples must be prepared to preserve the pathogen's nucleic acid. For most purposes, preservation of samples in ~~analytical grade ethanol alcohol~~ (80–90%) is the preferred method for subsequent molecular tests. Samples preserved in this way can be stored at 4°C for 1 month, at 25°C for 1 week or indefinitely at -20°C or below. In addition, other products (e.g. nucleic acid preservatives, various lysis buffers, etc.) are commercially available for the same purpose.

5.5.3. Nucleic acid extraction

To isolate nucleic acids from tissues preserved in ethanol or nucleic acid preservative, simply remove the tissue from the fixative or preservative and treat it as though it was just harvested. Most fresh and preserved or fixed tissues can be homogenised (e.g. with a mortar and pestle or in bead-beating tubes) directly in the lysis or extraction buffer provided with commercially available DNA and RNA extraction kits. Commercial kits should be validated or undergo equivalence testing with current validated extraction procedures prior to routine use.

5.5.4. Preparation of slides for *in-situ* hybridisation

For *in-situ* hybridisation, fixed tissues that have been transferred to ~~70%~~ **80% analytical grade** ethanol are embedded in paraffin according to standard histological methods. Sections are cut at a thickness of 5 μm and placed on aminoalkylsilane-coated slides, which are then baked overnight in an oven at 40°C . The sections are de-waxed by immersing in xylene for 10 minutes. This step is repeated once and then the solvent is eliminated by immersion in two successive absolute ethanol baths for 10 minutes each. The sections are then rehydrated by immersion in an ethanol series. The protocol may require a step of membrane permeabilisation enabling access to the target DNA. For this purpose, sections are treated with proteinase K ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) in TE buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), at 37°C for 30 minutes. For *in-situ* hybridisation tests (see individual chapters for details), it is essential that both a known positive and a known negative slide be stained to eliminate false positive results due to non-specific staining/stain dropout, and false negative results due to errors in the staining protocol (Qadiri *et al.*, 2019; Valverde *et al.*, 2017). For further details see disease-specific chapters in this *Aquatic Manual*.

6. Additional information to be collected

Sample information should include the collector's name, organisation, date, time, and description of the geographical location. The geographical origin of samples may be described as the name or location of the sampling site or its geographical co-ordinates. There should also be records that provide information to allow trace-backs on the sample movement from the sample site to the storage facility or laboratory and within those facilities.

A history of the specimens should also be collected and should include species, age, weight, details of clinical signs including behavioural changes, as well as observations concerning any gross pathology which has been observed.

Information on the preservation method, storage location, and date and time of storage at each storage locker or freezer along with information on the storage temperature (continuously monitored is preferable) should be collected. This information should be tracked with a unique sample code for all samples. For laboratories, the date of receipt, storage location information, date of analysis, analysis notes, and report date should be maintained for all uniquely coded samples. These data will greatly facilitate the tracking of sample problems and provide assurance that the samples were properly handled.

5. KEY REFERENCES FOR FURTHER READING

BELL T.A. & LIGHTNER D.V. (1988). A Handbook of Normal Shrimp Histology. Special Publication No. 1, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.

BONDAD-REANTASO M.G., MCGLADDERY S.E., EAST I. & SUBASINGHE R.P. (2001). Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 402, supplement 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 240 pp.

JOHNSON P.T. (1980). Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. A Model for the Decapoda. Prager, New York, USA, 440 pp.

LIGHTNER D.V. (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., 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. Invert. Pathol.*, **110**, 174–183.

LOTZ J.M. (1997). Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in shrimp aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 405–413.

MOODY N.J.G. & CRANE M.ST.J. (2016). Validation of diagnostic tests in the OIE manual for aquatic animals. In: Proc. 3rd OIE Global Conference on Aquatic Animal Health – “Riding the Wave of the Future”, Ho Chi Minh City, Vietnam, 20–22 January 2015, pp.119–126.

QADIRI S.S.N., SOO-JIN KIM S.-J., KRISHNAN R., KIM J.-O., KOLE S., KIM W.-S. & OH M.-J. (2019). Localization and tissue tropism of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in experimentally infected juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*: An *in situ* hybridization and immunohistochemical study. *Aquaculture*, **505**, 242–252.

THITAMADEE S, PRACHUMWAT A., SRISALA J., JAROENLAK P., SALACHAN P.V., SRITUNYALUCKSANA K, FLEGEL T.W. & ITSATHITPHAISARN O. (2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. *Aquaculture*, **452**, 69–87.

VALVERDE E.J., BORREGO J.J., SARASQUETE M.C., ORTIZ-DELGADO J.B. & CASTRO D. (2017). Target organs for lymphocystis disease virus replication in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Vet. Res.*, **48**, 21. doi 10.1186/s13567-017-0428-3.

WALKER P.J. & MOHAN C.V. (2009). Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Rev. Aquaculture*, **1**, 125–154.

*
* *

NB: FIRST ADOPTED IN 2000; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2012.

CHAPTER 2.2.2.

INFECTION WITH *APHANOMYCES ASTACI* (CRAYFISH PLAGUE)

1. Scope

Infection with *Aphanomyces astaci* means infection with the pathogenic agent *A. astaci*, Phylum Oomycota. The disease is commonly known as crayfish plague.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Aphanomyces astaci is a water mould. The Oomycetida or Oomycota, are considered protists and are classified with diatoms and brown algae in a group called the Stramenopiles or Chromista.

Five groups (A–E) of *A. astaci* have been described based on random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1994; Kozubikova *et al.*, 2011). Additional geno- or haplotypes are still being detected using molecular methods (Di Domenico *et al.*, 2021). Group A (the so called *Astacus* strains) comprises strains isolated from several European crayfish species. These strains are thought to have been in Europe for a long period of time. Group B (*Pacifastacus* strains I) includes isolates from several European crayfish species and from the invasive *Pacifastacus leniusculus* in Europe as well as Lake Tahoe, USA. Imported to Europe, *P. leniusculus* probably introduced this genotype of *A. astaci* and infected the native European crayfish. Group C (*Pacifastacus* strains II) consists of a strain isolated from *P. leniusculus* from Pitt Lake, Canada. Another strain (Pc), isolated from *Procambarus clarkii* in Spain, sits in group D (*Procambarus* strains). This strain shows temperature/growth curves with higher optimum temperatures compared with groups A and B (Dieguez-Uribeondo *et al.*, 1995). *Aphanomyces astaci* strains that have been present in Europe for many years (group A strains) appear to be less pathogenic than strains introduced with crayfish imports from North America since the 1960s. North American host species spiny-cheek crayfish (*Orconectes limosus*) has been shown to be a carrier of Group E (Kozubiková *et al.*, 2011).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Aphanomyces astaci is poorly resistant against desiccation and does not survive long in decomposing hosts. Any treatment of the crayfish (freezing, cooking, drying) will affect the survival of the pathogen (Oidtmann *et al.*, 2002). Isolation from processed samples is not possible, however they may be suitable for molecular methods used for pathogen detection.

2.1.3. Survival and stability outside the host

Outside the host *Aphanomyces astaci* is found as zoospores that remain motile for up to 3 days and form cysts that can survive for 2 weeks in distilled water. As *A. astaci* can go through three cycles of encystment and zoospore emergence, the maximum life span outside of a host could be several weeks. Spores remained viable in a spore suspension in clean water kept at 2°C for 2 months (Unestam, 1966). Survival time is probably shorter in natural waters.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

The recommendations in this chapter apply to all species of crayfish in all three crayfish families (Cambaridae, Astacidae and Parastacidae).

[Note: an assessment of species that meet the criteria for listing as susceptible to infection with *A. astaci* in accordance with Chapter 1.5. has not yet been completed]

All stages of crayfish species native to Europe, including the noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender-clawed or Turkish crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor are highly susceptible (e.g. Holdich *et al.*, 2009). Australian species of crayfish are also highly susceptible. North American crayfish such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Faxonius* spp. are infected by *A. astaci*, but under normal conditions the infection does not cause clinical disease or death. All North American crayfish species investigated to date have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (reviewed by Svoboda *et al.* 2017) and it is therefore currently assumed that this is the case for any other North American species.

The only other crustacean known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

[Under study]

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

The host species susceptible to infection with *A. astaci* fall largely into two categories: those ~~highly susceptible to infection with that~~ development of clinical disease and mortalities, and those that are infected ~~without associated~~ but do not display any significant clinical disease or mortalities. All life stages are considered susceptible to infection with *A. astaci*.

Species that develop clinical disease and mortalities include the noble crayfish (*Astacus astacus*) of north-west Europe, the white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) of south-west and west Europe, the related *Austropotamobius torrentium* (mountain streams of south-west Europe) and the slender-clawed or Turkish crayfish (*Pontastacus leptodactylus*) of eastern Europe and Asia Minor (e.g. Holdich *et al.*, 2009). Australian species of freshwater crayfish are also considered vulnerable to clinical disease and mortalities.

Species that can be infected but do not normally develop clinical disease include North American crayfish species such as the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*), Louisiana swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) and *Faxonius* spp. All North American crayfish species that have been investigated have been shown to be susceptible to infection, demonstrated by the presence of the pathogen in host cuticle (reviewed by Svoboda *et al.* 2017).

Highly susceptible species: Clinical disease outbreaks caused by infection with *A. astaci* are generally known as 'crayfish plague' outbreaks. In such outbreaks, moribund and dead crayfish of a range of sizes (and therefore ages) can be found.

The only non-crayfish crustacean species known to be susceptible to infection by *A. astaci* is the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

The tissue that becomes initially infected is the exoskeleton cuticle. Soft cuticle, as is found on the ventral abdomen and around joints, is preferentially affected. In ~~the highly susceptible~~ European crayfish species, which are prone to development of clinical disease, the pathogen often manages to penetrate the basal lamina located underneath the epidermis cell layer. From there, *A. astaci* spreads throughout the body primarily by invading connective tissue and haemal sinuses; however, all tissues may be affected.

In North American crayfish species, infection is usually restricted to the cuticle. Based on PCR results, the tailfan (consisting of uropods and telson) and soft abdominal cuticle appear to be frequently infected (Oidtmann *et al.*, 2006; Vralstad *et al.*, 2011).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

North American crayfish species act mostly as reservoirs carriers of the infection without showing clinical signs. However, some strains of *A. astaci*, especially from group A, show lowered virulence, thus enabling ~~normally highly susceptible~~ European crayfish to act as reservoirs carriers as well (see review by Svoboda *et al.*, 2017).

~~Colonisation of habitats, initially by North American crayfish species carrying *A. astaci* occupied by highly susceptible is likely to result in an epizootic if crayfish species that are prone to expression of clinical disease are present by North American crayfish species carrying *A. astaci* is likely to result in an epizootic among the highly susceptible animals.~~

2.2.6. Vectors

~~Transportation of finfish may facilitate the spread of *A. astaci* through the presence of spores in the transport water or co-transport of infected crayfish specimens (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (e.g. nets, boots, clothing, traps) (Alderman *et al.*, 1987). None known.~~

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity, and prevalence

When the infection first reaches a naïve population of highly susceptible crayfish species that are prone to clinical disease, high levels of mortality are usually observed within a short space of time, ~~so that in and in~~ areas with high crayfish densities the bottoms of lakes, rivers and streams are covered with dead and dying crayfish. A band of mortality will spread quickly from the initial outbreak site downstream, whereas upstream spread is slower. Lower water temperatures are associated with ~~slower a lower rate of~~ mortalities and a greater range of clinical signs in affected animals (Alderman *et al.*, 1987). Observations from Finland suggest that at low water temperatures, noble crayfish (*Astacus astacus*) can be infected for several months without ~~the development of any~~ noticeable mortalities (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2013).

On rare occasions, single specimens of ~~the highly susceptible~~ species that are prone to clinical disease have been found after a wave of infection with *A. astaci* has gone through a river or lake. This is most likely to be due to lack of exposure of these animals during an outbreak (animals may have been present in a tributary of a river or lake or in a part of the affected river/lake that was not reached by spores, or crayfish may have stayed in burrows during the epizootic). However, low virulent strains of *A. astaci* have been described to persist in a water way, kept alive by a weak infection in the remnant population (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011). Although remnant populations of susceptible crayfish species remain in many European watersheds, the dense populations that existed 150 years ago are now heavily diminished (Souty-Grosset *et al.*, 2006; Holdich *et al.*, 2009). Populations of susceptible crayfish may re-establish, but once population density and geographical distribution is sufficient for susceptible animals to come into contact with spores, new outbreaks of infection with *A. astaci* and large-scale mortalities will occur.

In ~~the highly susceptible~~ European crayfish species, exposure to *A. astaci* spores usually leads to infection and eventually to death. Prevalence of infection within a population in the early stage of an outbreak may be low (few animals in a river population may be affected). However, the pathogen ~~is~~ amplified in affected animals and subsequently released into the water; usually leading to 100% mortality in a contiguous population. The rate of spread from initially affected animals depends on several factors, one being water temperature. Therefore, the time from first introduction of the pathogen into a population to noticeable crayfish mortalities can vary greatly and may range from a few weeks to months. Prevalence of infection will gradually increase over this time and usually reach 100%. Data from a noble crayfish population in Finland that experienced an acute mortality event due to infection with *A. astaci* in 2001 suggest that in sparse noble crayfish populations, spread of disease throughout the host population may take several years (Viljamaa-Dirks *et al.*, 2011).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Susceptible species

Gross clinical signs are variable and depend on challenge severity and water temperatures. The first sign of an epizootic may be the appearance of crayfish during daylight (crayfish are normally nocturnal), some of which may show loss of co-ordination, falling onto their backs and remaining unable to right themselves. Occasionally, the infected animals can be seen trying to scratch or pinch themselves.

Often, however, the first sign of an outbreak may be the presence of large numbers of dead crayfish in a river or lake (Alderman *et al.*, 1987).

Infection with *A. astaci* may cause mass mortality of crayfish. However, investigation of mortality event should consider other causes such as environmental pollution (e.g. insecticides such as cypermethrin have been associated with initial misdiagnoses).

North American crayfish species

Infected North American crayfish may be subclinical carriers. Controlled exposure to a highly virulent strain has resulted in mortality in juvenile stages of *Pacifastacus leniusculus* as well as behavioural alterations in adults (Thomas *et al.*, 2020).

2.3.3 Gross pathology

Susceptible Species prone to clinical disease

Depending on a range of factors, the foci of infection in crayfish may be seen by the naked eye or may not be discernible despite careful examination. Infection foci are best viewed under a low power stereo microscope and are recognisable by localised whitening of the muscle beneath the cuticle. In some cases, a brown colouration of cuticle and muscle may occur, or hyphae may be visible in infected cuticles in the form of fine brown (melanised) tracks in the cuticle. Sites for examination include the intersternal soft ventral cuticle of the abdomen and tail, the cuticle of the perianal region, the cuticle between the carapace and abdomen, the joints of the pereopods (walking legs), particularly the proximal joint, eyestalks and finally the gills.

North American crayfish species

Infected North American crayfish ~~do not usually show signs of disease~~ can sometimes show melanised spots in their soft cuticle, for example, the soft abdominal cuticle and joints. These melanisations can be caused by mechanical injuries or infections with other water moulds and are non-specific. However, populations with high levels of infection can show abnormally high levels of cuticular damage in individual animals, such as missing legs and claws due to deteriorated joints.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

~~The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, as may occur during movements of finfish, or 3) through colonisation of habitats by invasive North American crayfish species.~~

~~The main route of spread of *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms. Subsequent spread occurs through expanding populations of invasive North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Holdich *et al.*, 2009).~~

Transmission from crayfish to crayfish occurs through the release of zoospores from an infected animal and attachment of the zoospores to naïve crayfish. The life cycle of *A. astaci* is simple with vegetative hyphae invading and ramifying through host tissues, eventually producing extramatrical sporangia that release amoeboid primary spores. These initially encyst, but then release a biflagellate zoospore (secondary zoospore). Biflagellate zoospores swim in the water column and, on encountering a susceptible host, attach and germinate to produce invasive vegetative hyphae. The zoospores of *A. astaci* swim actively in the water column and have been demonstrated to show positive chemotaxis towards crayfish (Cerenius & Söderhäll, 1984). Zoospores are capable of repeated encystment and re-emergence, extending the period of their infectivity (Soderhall & Cerenius 1999). Growth and sporulation capacity is strain-and temperature-dependent (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

The main routes of spread of the pathogen are through 1) movement of infected crayfish, 2) movement of spores with contaminated water or equipment, or 3) through colonisation of non-native habitats by invasive North American crayfish species.

The main route of spread of *A. astaci* in Europe between the 1960s and 2000 was through the active stocking of North American crayfish into the wild or escapes from crayfish farms. Subsequent spread occurred through expanding populations of invasive North American crayfish, accidental co-transport of specimens, and release of North American crayfish into the wild by private individuals (Holdich *et al.*, 2009).

Transportation of finfish may facilitate the spread of *A. astaci* through the presence of spores in the transport water or co-transport of infected crayfish specimens (Alderman *et al.*, 1987; Oidtmann *et al.*, 2002). There is also circumstantial evidence of spread by contaminated equipment (e.g. nets, boots, clothing, traps) (Alderman *et al.*, 1987).

2.3.5. Environmental factors

Under laboratory conditions, the preferred temperature range at which the *A. astaci* mycelium grows varies slightly depending on the strain. In a study, which compared several *A. astaci* strains that had been isolated from a variety of crayfish species, mycelial growth was observed between 4 and 29.5°C, with the strain isolated from *Procambarus clarkii* growing better at higher temperatures compared to the other strains. Sporulation efficiency was similarly high for all strains tested between 4 and 20°C, but it was clearly reduced for the non-*P. clarkii* strains at 25°C and absent at 27°C. In contrast, sporulation still occurred in the *P. clarkii* strain at 27°C. The proportion of motile zoospores (out of all zoospores observed in a zoospore suspension) was almost 100% at temperatures ranging from 4–18°C, reduced to about 60% at 20°C and about 20% at 25°C in all but the *P. clarkii* strain. In the *P. clarkii* strain, 80% of the zoospores were still motile at 25°C, but no motile spores were found at 27°C (Dieguez-Urbeondo *et al.*, 1995).

Field observations show that outbreaks of infection with *A. astaci* occur over a wide temperature range, and at least in the temperature range 4–20°C. The rate of spread within a population depends on several factors, including water temperature. In a temperature range between 4 and 16°C, the speed of an epizootic is enhanced by higher water temperatures.

In buffered, redistilled water, sporulation occurs between pH 5 and 8, with the optimal range being pH 5–7. The optimal pH range for swimming of zoospores appears to be pH 6.0–7.5, with a maximum range between pH 4.5 and 9.0 (Unestam, 1966).

Zoospore emergence is influenced by the presence of certain salts in the water. CaCl₂ stimulates zoospore emergence from primary cysts, whereas MgCl₂ has an inhibitory effect. In general, zoospore emergence is triggered by transferring the vegetative mycelium into a medium where nutrients are absent or low in concentration (Cerenius *et al.*, 1988).

2.3.6. Geographical distribution

In Europe the reports of large mortalities of crayfish go back to 1860. The reservoir of the original infections in the 19th century was never established. *Faxonius (Orconectes)* spp. were not known to have been introduced into Europe until the 1890s, but the post-1960s extensions are largely linked to more recent introductions of North American crayfish for farming (Alderman, 1996; Holdich *et al.* 2009). *Pacifastacus leniusculus* and *Procambarus clarkii* are now widely naturalised in many parts of Europe.

In recent years, crayfish plague has been reported in Asia and also in North- and South America (see e.g. references in Di Domenico *et al.* 2021). The distribution of *A. astaci* in North America is likely to be much wider than reported.

~~Any geographical area where North American crayfish species were introduced must be considered as potentially infected if not proven otherwise. Lack of clinical disease in these carrier species may hamper the reliability in reporting the infection. For the highly susceptible species, See WOAHA WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level. However, even high mortalities can go unnoticed in wild populations.~~

2.4. Biosecurity and disease control strategies

2.4.1. Vaccination

No vaccines are available.

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No treatments are currently known that can successfully treat the highly susceptible crayfish species, once infected.

2.4.3. Immunostimulation

No immunostimulants are currently known that can successfully protect the highly susceptible crayfish species against infection and consequent disease due to *A. astaci* infection.

2.4.4. Breeding resistant strains

A few studies suggest that there might be differences in resistance between populations of highly susceptible species crayfish species that are prone to clinical disease (reviewed by Martin-Torrijos *et al.*, 2017; Svoboda *et al.*, 2017). ~~The fact that North American crayfish generally do not develop clinical disease suggests that selection for resistance may be possible and laboratory studies using attenuated strains of *A. astaci* might be successful. However, there are currently no published data from such studies.~~

2.4.5. Inactivation methods

Aphanomyces astaci, both in culture and in infected crayfish, is inactivated by a short exposure to temperatures of 60°C or to temperatures of –20°C (or below) for 48 hours (or more) (Oidtmann *et al.*, 2002). Sodium hypochlorite at 100 ppm, free chlorine and iodophors at 100 ppm available iodine, are effective for disinfection of contaminated equipment. Equipment must be cleaned prior to disinfection since organic matter decreases the effectiveness of disinfectants (Alderman & Polglase, 1985). Thorough drying of equipment (>24 hours) is also effective as *A. astaci* is not resistant to desiccation (Rennerfelt, 1936).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

No information available.

2.4.7. General husbandry

If a ~~crayfish farm for highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease is being planned, it should be carefully investigated whether North American crayfish species are in the vicinity of the planned site or present upstream. If North American crayfish are present, there is a high likelihood that susceptible farmed crayfish will eventually become infected.

In an endemic area where ~~the highly susceptible species~~ prone to expression of clinical disease are being farmed, the following biosecurity recommendations should be followed to avoid an introduction of *A. astaci* onto the site:

1. General biosecurity should be in place (e.g. controlled access to premises; disinfection of boots when entering the site; investigation of mortalities if they occur; introduction of live animals (crayfish, finfish) only from sources known to be free from infection with *A. astaci*).
2. Movements of potentially infected live or dead crayfish, potentially contaminated water, equipment or any other item that might carry the pathogen from an infected to an uninfected site holding susceptible species should be prevented.
3. If transfers of finfish or crayfish are being planned, these should not come from streams or other waters that harbour potentially infected crayfish (either susceptible crayfish populations that are going through a current outbreak of infection with *A. astaci* or North American ~~earlier~~ crayfish species).
4. North American crayfish should not be brought onto the site.
5. Finfish obtained from unknown freshwater sources or from sources, where North American crayfish may be present or a current outbreak of infection with *A. astaci* may be taking place, must not be used as bait or feed for crayfish, unless they have been subject to a temperature treatment to kill *A. astaci* (see Section 2.4.5. *Inactivation methods*).
6. Any equipment that is brought onto site should be disinfected.

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

For a suspected outbreak of infection with *A. astaci* in a population of ~~highly susceptible~~ crayfish species that are prone to clinical disease, sampled crayfish should ideally consist of: a) live crayfish showing signs of disease, and b) live, apparently healthy crayfish. Freshly dead crayfish may also be suitable, although this will depend on their condition.

Live crayfish should be transported using insulated containers equipped with small holes to allow aeration. The temperature in the container should not exceed 16°C.

Crayfish should be transported in a moist atmosphere, for example using moistened wood shavings/wood wool, newspaper, or grass/hay. Unless transport water is sufficiently oxygenated, live crayfish should not be transported in water, as they may suffocate.

The time between sampling of live animals and delivery to the investigating laboratory should not exceed 24 hours.

Should only dead animals be found at the site of a suspected outbreak, freshly dead animals should be selected for diagnosis. Dead animals can either be: a) transported chilled (if they appear to have died only very recently), or, b) placed in non-methylated ethanol (minimum concentration 70%; see 3.5. *Preservation of samples for submission*), or c) placed in freezer at –20°C to avoid further decay and transported frozen.

When testing any population outside an acute mortality event for the presence of crayfish plague, as many individuals as possible should be inspected visually for signs of cuticular damage. Crayfish that have melanized spots or missing limbs should be selected in the first place for further analysis.

3.2. Selection of organs or tissues

In highly susceptible species that are prone to clinical disease, the tissue recommended for sampling is the soft abdominal cuticle, which can be found on the ventral side of the abdomen. Any other soft part of the exoskeleton can be included as well. If any melanised spots or whitened areas are detected, these should be included in the sampling. From diseased animals, samples should be aseptically collected from the soft abdominal cuticle. For identification of carriers, samples should be aseptically collected from soft abdominal cuticle, and telson and uropods, separately.

In the North American crayfish species, sampling of soft abdominal cuticle, uropods and telson are recommended. Any other soft part of the exoskeleton can be included as well. If any melanized spots are detected, these should be included in the sampling.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Autolysed material is not suitable for analysis.

3.4. Non-lethal sampling

A non-destructive sampling method that detects *A. astaci* DNA in the microbial biofilm associated with the cuticle of individual crayfish through vigorous scrubbing has been described (Pavic *et al.*, 2020), and could be considered in case of testing vulnerable populations.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

3.5. Preservation of samples for submission

The use of non-preserved crayfish is preferred, as described above. If transport of recently dead or moribund crayfish cannot be arranged, crayfish may be frozen or fixed in ethanol (minimum 70%). However, fixation may reduce test sensitivity. The crayfish:ethanol ratio should ideally be 1:10 (1 part crayfish, 10 parts ethanol).

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

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). Isolation is best attempted from crayfish with clinical signs delivered alive (see Section 3.1.). Fresh specimens should be kept chilled and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection.

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.5.5. of Chapter 2.2.0 General information (diseases of crustaceans).

3.5.3. Samples for histopathology

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

3.5.4. Samples for other tests

Sensitive molecular methods can be used to detect *A. astaci* DNA directly from water samples (Strand *et al.* 2011, 2012). These methods require validation for diagnostic use.

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 animals should be processed and tested individually. Small life stages such as PL, can be pooled to obtain the minimum amount of material for 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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						+	+	NA				
Real-time PCR	++	++	++	1	++	++	++	1	++	++	++	1
Conventional PCR	+	+	+	1	++	++	++	1				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation												
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 WOAHP 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

Small pieces of soft cuticle excised from the regions mentioned above (Section 2.3.3 *Gross pathology*) and examined under a compound microscope using low-to-medium power will confirm the presence of aseptate fungal-like hyphae 7–9 µm wide. The hyphae can usually be found pervading the whole thickness of the cuticle, forming a three-dimensional network of hyphae in heavily affected areas of the cuticle. The presence of host haemocytes and possibly some melanisation closely associated with and encapsulating the hyphae give good presumptive evidence that the hyphae represent a pathogen rather than a secondary opportunist invader. In some cases, examination of the surface of such mounted cuticles will demonstrate the presence of characteristic *A. astaci* sporangia with clusters of encysted primary spores (see Section 4.3 *Culture for isolation*).

4.2. Histopathology

Unless the selection of tissue for fixation has been well chosen, *A. astaci* hyphae can be difficult to find in stained preparations. A histological staining technique, such as the Grocott silver stain counterstained with conventional haematoxylin and eosin, can be used. However, such material does not prove that any hyphae observed are those of *A. astaci*, especially when the material comes from animals already dead by sampling.

See also Section 4.1 *Wet mounts*.

4.3. Culture for isolation

Isolation is not recommended as a routine diagnostic method (Alderman & Polglase, 1986; Cerenius *et al.*, 1987; Viljamaa-Dirks, 2006). Test sensitivity and specificity of the cultivation method can be very variable depending on the experience of the examiner, but in general will be lower than the PCR. Isolation of *A. astaci* by culture from apparently healthy crayfish is challenging and molecular methods are recommended. A detailed description of this test is available from the Reference Laboratory¹.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate. Shrimp tissues may be used as negative controls.

Live crayfish can be killed using chloroform, electric current or by mechanical destroying the nerve cords. If live or moribund animals are not available, only recently dead animals should be used for DNA extraction. The soft abdominal cuticle is the preferred sample tissue for DNA extraction. Any superficial contamination should first be removed by thoroughly wiping the soft abdominal cuticle with wet (using autoclaved H₂O) clean disposable swabs. The soft abdominal cuticle is then excised and 30–50 mg ground using a pestle and mortar.

Several PCR assays have been developed with varying levels of sensitivity and specificity. Two assays are described here. Both assays target the ITS (internal transcribed spacer) region of the nuclear ribosomal gene cluster within the *A. astaci* genome.

Extraction of nucleic acids

~~Numerous Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and should can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances using optical density or running a gel.~~

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.

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling conditions
--------------------------	----------------------	---------------	--------------------

¹ <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>

Method 1*: Vralstad <i>et al.</i> , 2009, Strand, 2013; GenBank Accession No.: AM947024			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> & <i>A. fennicus</i> /ITS	Fwd: AAG-GCT-TGT-GCT-GGG-ATG-TT Rev: CTT-CTT-GCG-AAA-CCT-TCT-GCT-A Probe: 6-FAM-TTC-GGG-ACG-ACC-C-MGBNFQ	500 nM <u>500 nM</u> 200 nM	50 cycles of: 95°C/15 sec and 60°C/30 sec
Alternative method 2: Strand <i>et al.</i> to be published; GenBank Accession No.: AM947024			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> /ITS	Fwd: TAT-CCA-CGT-GAA-TGT-ATT-CTT-TAT Rev: GCT-AAG-TTT-ATC-AGT-ATG-TTA-TTT-A Probe: FAM-AAG-AAC-ATC-CCA-GCA-C-MGBNFQ	500 nM <u>500 nM</u> 200 nM	50 cycles of: 95°C/15 sec and 60°C/30 sec

*These ITS-based methods have been found to give positive results for the species *Aphanomyces fennicus* (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2019).

The absolute limit of detection of method 1 was reported as approximately 5 PCR forming units (= target template copies), which is equivalent to less than one *A. astaci* genome (Vralstad *et al.*, 2009). Another study reported consistent detection down to 50 fg DNA using this assay (Tuffs & Oidtmann, 2011).

Analytical test specificity has been investigated (Tuffs & Oidtmann, 2011; Vralstad *et al.*, 2009) and no cross-reaction was observed in these studies. However, a novel species, *Aphanomyces fennicus*, isolated from noble crayfish was reported in 2019 (Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019) that gave a positive reaction in this test at the same level as *A. astaci*. Due to this problem in specificity, the assay has been modified according to the alternative method 2 (Strand *et al.*, manuscript in preparation):

Owing to the repeated discovery of new *Aphanomyces* strains, sequencing is required to determine the species of *Aphanomyces*. In the case of the real-time PCR assay, this requires separate amplification of a PCR product using primers ITS-1 and ITS-4 (see Section 4.5 *Amplicon sequencing*).

4.4.2. Conventional PCR

Pathogen/ target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling conditions
Method 1*: Oidtmann <i>et al.</i> , 2006; GenBank Accession No.: AY310499; Product amplicon size: 569 bp			
<i>Aphanomyces astaceus-astaci</i> & <i>A. fennicus</i> /ITS	Fwd: GCT-TGT-GCT-GAG-GAT-GTT-CT Rev: CTA-TCC-GAC-TCC-GCA-TTC-TG-	500 nM <u>500 n</u>	40 cycles of: 1 min/96°C, 1 min/59°C and 1 min/72°C

*This ITS-based method has been found to give positive results for the species *Aphanomyces fennicus* (Viljamaa-Dirks & Heinikainen 2019).

Confirmation of the identity of the PCR product by sequencing is required as a novel species, *A. fennicus*, isolated from noble crayfish was reported in 2019 (Viljamaa-Dirks & Heinikainen, 2019) that gave a positive reaction in this assay.

The assay consistently detects down to 500 fg of genomic target DNA or the equivalent amount of ten zoospores submitted to the PCR reaction (Tuffs & Oidtmann, 2011).

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Several genotype-specific molecular methods have been developed that, instead of requiring a pure growth as sample material like the RAPD-PCR assay, can be used to analyse crayfish tissue directly (Di Domenico *et al.*, 2021; Grandjean *et al.*, 2014; Makkonen *et al.*, 2018; Minardi *et al.*, 2018; 2019). Detection of a known genotype group combined with a positive result by a recommended conventional or real-time PCR can be used as a confirmative test in geographical areas where crayfish plague is known to be present. However, the current knowledge of the genotype variation is mostly limited

to a few original host species and new genotypes or subtypes are expected to be found. Thus, the suitability of these methods is limited for initial excluding diagnosis or as confirmative tests in geographical areas not known to be infected.

PCR targeting mitochondrial DNA with *A. astaci* genotype specific primers have been shown to detect the known genotypes of *A. astaci*, but these assays may also provide positive results for some other oomycete genera (Casabella-Herrero *et al.*, 2021).

4.5. Amplicon sequencing

~~and purified by excision from this gel. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed and compared in comparison with published reference sequences.~~

4.6. *In-situ* hybridisation

Not available.

4.7. Immunohistochemistry

Not available

4.8. Bioassay

No longer used for diagnostic purposes (see Cerenius *et al.*, 1988).

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Not available.

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

The recommended method for surveillance is real-time PCR, the modified assay by Strand *et al.* (manuscript in preparation).

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 WOA Reference Laboratory for confirmation, whether or not clinical signs are associated with the case.~~ If a laboratory Competent Authority does not have the capacity capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status.²

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.

² For example transboundary commodities.

6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* shall be suspected if at least the following criterion is met:

- iii) Positive result by real-time PCR
- iv) Positive result by conventional PCR

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR and positive result by conventional PCR followed by amplicon sequencing

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 *Aphanomyces astaci* 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) Visual observation of hyphae indicative of *A. astaci* in wet mounts
- iii) Observation of hyphae indicative of *A. astaci* in stained histological sections
- iv) Culture and isolation of the pathogen
- v) Positive result by real-time PCR
- vi) Positive result by conventional PCR

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *Aphanomyces astaci* is confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time PCR and positive result by conventional PCR and amplicon sequencing

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *Aphanomyces astaci* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (~~none~~ no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with *Aphanomyces astaci*, 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 (<i>n</i>)	DSp (<i>n</i>)	Reference test	Citation

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study.

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, n = number of samples used in the study.

7. References

- ALDERMAN D.J. (1996). Geographical spread of bacterial and fungal diseases of crustaceans. *Rev sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 603–632.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1985). Disinfection for crayfish plague. *Aquacult. Fish. Manage.*, **16**, 203–205.
- ALDERMAN D.J. & POLGLASE J.L. (1986). *Aphanomyces astaci*: isolation and culture. *J. Fish Dis.*, **9**, 367–379.
- ALDERMAN D.J., POLGLASE J.L. & FRAYLING M. (1987). *Aphanomyces astaci* pathogenicity under laboratory and field conditions. *J. Fish Dis.*, **10**, 385–393.
- CASABELLA-HERRERO G., MARTÍNEZ-RÍOS M., VILJAMAA-DIRKS S., MARTÍN-TORRIJOS L. & DIÉGUEZ-URIBEONDO J. (2021). *Aphanomyces astaci* mtDNA: insights into the pathogen's differentiation and its genetic diversity from other closely related oomycetes. *Fungal Biol.*, **125**, 316–325. doi: 10.1016/j.funbio.2020.11.010. Epub 2020 Dec 2.
- CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1984). Chemotaxis in *Aphanomyces astaci*, an arthropodparasitic fungus. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**, 278–281.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K. & FULLER M.S. (1987). *Aphanomyces astaci* and *Aphanomyces* spp. In: Zoosporic fungi in teaching and research, Fuller M.S. & Jaworski A., eds. South-Eastern Publishing Corp., Athens, Georgia, USA. pp 64–65.
- CERENIUS L., SÖDERHÄLL K., PERSSON M. & AJAXON R. (1988). The crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* – diagnosis, isolation and pathobiology. *Freshwater Crayfish*, **7**, 131–144.
- DI DOMENICO M., CURINI V., CAPRIOLI R., GIANANTE C., MRUGAŁA A., MOJŽIŠOVÁ M., CAMMA C. & PETRUSEK A. (2021). Real-Time PCR assays for rapid identification of common *Aphanomyces astaci* genotypes. *Front. Ecol. Evol.*, **9**, art 597585 doi:10.3389/fevo.2021.597585.
- DIEGUEZ-URIBEONDO J., HUANG T.-S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1995). Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycol. Res.*, **99**, 574–578.
- GRANDJEAN F., VRÅLSTAD T., DIÉGUEZ-URIBEONDO J., JELIĆ M., MANGOMBI J., DELAUNAY C., FILIPOVÁ L., REZINCIUC S., KOZUBÍKOVÁ-BALCAROVA E., GYONNET D., VILJAMAA-DIRKS S. & PETRUSEK A. (2014). Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Vet. Microbiol.*, **170**, 317–324.
- HOLDICH D.M., REYNOLDS J.D., SOUTY-GROSSET C. & SIBLEY P.J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowl. Manag. Aquat. Ec.*, **394–395**, 1–46.
- HUANG T.S., CERENIUS L. & SÖDERHÄLL K. (1994). Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture*, **126**, 1–10.
- KOZUBÍKOVÁ E., VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S. & PETRUSEK A. (2011). Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci*. *J. Invertebr. Pathol.*, **108**, 214–216.
- MAKKONEN J., JUSSILA J., PANTELEIT J., KELLER N.S., SCHRIMPF A., THEISSINGER K., KORTET R., MARTÍN-TORRIJOS L., SANDOVAL-SIERRA J.V., DIÉGUEZ-URIBEONDO J. & KOKKO H. (2018). MtDNA allows the sensitive detection and haplotyping of the crayfish plague disease agent *Aphanomyces astaci* showing clues about its origin and migration. *Parasitology*, **145**, 1210–1218. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000227>.
- MARTIN-TORRIJOS L., CAMPOS LACH M., POU ROVIRA Q. & DIÉGUEZ-URIBEONDO J. (2017). Resistance to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* (Oomycota) in the endangered freshwater crayfish species, *Austropotamobius pallipes*. *PLoS ONE*, **12** (7), e0181226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181226>

-
- MINARDI D., STUDHOLME D.J., OIDTMANN B., PRETTO T. & VAN DER GIEZEN M. (2019). Improved method for genotyping the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on mitochondrial DNA. *Parasitology*, 146, 1022–1029, doi:[10.1017/S0031182019000283](https://doi.org/10.1017/S0031182019000283)
- MINARDI D., STUDHOLME D.J., VAN DER GIEZEN M., PRETTO T. & OIDTMANN B. (2018). New genotyping method for the causative agent of crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) based on whole genome data. *J. Invertebr. Pathol.*, 156, 6–13.
- OIDTMANN B., GEIGER S., STEINBAUER P., CULAS A. & HOFFMANN R.W. (2006). Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Dis. Aquat. Org.*, 72, 53–64.
- OIDTMANN B., HEITZ E., ROGERS D. & HOFFMANN R.W. (2002). Transmission of crayfish plague. *Dis. Aquat. Org.*, 52, 159–167.
- PAVIC D., ČANKOVIĆ M., PETRIĆ I., MAKKONEN J., HUDINA S., MAGUIRE I., VLADUŠIĆA T., ŠVER L., HRAŠĆANA R., ORLIĆ K., DRAGIČEVIĆ P. & BIELEN A. (2020) Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *J. Invertebr. Pathol.*, 169, 107274. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107274>
- RENNERFELT E. (1936). Untersuchungen über die Entwicklung und Biologie des Krebspestpilzes *Aphanomyces astaci* Schikora. Report of the Institute of Freshwater Research (Drottningholm, Sweden), 10, 1–21.
- SOUTY-GROSSET C., HOLDICH D.M., NOEL P.Y., REYNOLDS J.D. & HAFNER P. (eds) (2006). Atlas of Crayfish in Europe. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris (Patrimoines naturels, 64), 188 p.
- STRAND D.A., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H., EDVARDSEN B., KLAVENESS D., JUSSILA J. & VRÅLSTAD T. (2011). Detection and quantification of the crayfish plague agent in natural waters: direct monitoring approach for aquatic environments. *Dis. Aquat. Org.*, 95, 9–17.
- STRAND D.A., JUSSILA J., VILJAMAA-DIRKS S., KOKKO H., MAKKONEN J., HOLST-JENSEN A., VILJUGREIN H. & VRÅLSTAD T. (2012). Monitoring the spore dynamics of *Aphanomyces astaci* in the ambient water of latent carrier crayfish. *Vet. Microbiol.*, 160, 99–107.
- STRAND D.A. (2013) Environmental DNA monitoring of the alien crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in freshwater systems – Sporulation dynamics, alternative hosts and improved management tools. *Dissertation book, University of Oslo Faculty of Mathematics and Natural Sciences Department of Biosciences, Oslo*, ISSN 1501-7710, 73 p.
- SVOBODA J., MRUGALA A., KOZUBÍKOVÁ-BALCAROVÁ E. & PETRUSEK A. (2017). Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *J. Fish Dis.*, 40, 127–140. <https://doi.org/10.1111/jfd.12472>
- SODERHALL K. & CERENIUS L. (1999) The crayfish plague fungus: history and recent advances. *Freshwater Crayfish*, 12, 11–34.
- THOMAS J.R., ROBINSON C.V., MRUGALA A., ELLISON A.R., MATTHEWS E., GRIFFITHS S.W., CONSUEGRA S. & CABLE J. (2020). Crayfish plague affects juvenile survival and adult behaviour of invasive signal crayfish. *Parasitology*, 1–9, <https://doi.org/10.1017/S0031182020000165>
- TUFFS S & OIDTMANN B (2011). A comparative study of molecular diagnostic methods designed to detect the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, 153, 345–353.
- UNESTAM T. (1966). Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci*. II. Factors affecting zoospores and zoospore production. *Physiol. Plant.*, 19, 1110–1119.
- ~~UNESTAM T. & SODERHALL K. (1977). Specialisation in crayfish defence and fungal aggressiveness upon crayfish plague infection. *Freshwater Crayfish*, 3, 321–331.~~
- VILJAMAA-DIRKS S. (2006). Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshwater Crayfish*, 15, 376–382.
- VILJAMAA-DIRKS S. & HEINIKAINEN S. (2019) A tentative new species *Aphanomyces fennicus* sp. nov. interferes with molecular diagnostic methods for crayfish plague. *J. Fish Dis.*, 42, 413–422. <https://doi.org/10.1111/jfd.12955>
- VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., NIEMINEN M., VENNERSTRÖM P. & PELKONEN S. (2011). Persistent infection by crayfish plague *Aphanomyces astaci* in a noble crayfish population – a case report. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, 31, 182–188.

VILJAMAA-DIRKS S., HEINIKAINEN S., TORSSONEN H., PURSIAINEN M., MATTILA J. & PELKONEN S. (2013). Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland. *Dis. Aquat. Org.*, **103**, 199–208.

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

VRALSTAD T., KNUITSEN A.K., TENGS T. & HOLST-JENSEN A. (2009). A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Vet. Microbiol.*, **137**, 146–155.

~~WHITE T.J., BRUNS T., LEE S. & TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., eds. Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315–322.~~

*
* *

NB: There is a WOAHP Reference Laboratory for infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague)
(please consult the WOAHP web site for the most up-to-date list:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOAHP Reference Laboratories for any further information on
infection with *Aphanomyces astaci* (crayfish plague)

NB: FIRST ADOPTED IN 1995; MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.6.

INFECTION WITH
MACROBRACHIUM ROSENBERGII NODAVIRUS (WHITE TAIL
DISEASE)

1. Scope

Infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus means infection with the pathogenic agent *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (*MrNV*) in the Family *Nodaviridae*. The disease is commonly known as white tail disease (WTD).

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Two viruses are associated with WTD, namely *MrNV* (primary) and extra small virus (XSV) (associate) (Qian *et al.*, 2003; Romestand & Bonami, 2003). *MrNV* is a necessary cause of WTD in prawns, however, the role of XSV in pathogenicity remains unclear.

MrNV belongs in the family *Nodaviridae* (Bonami *et al.*, 2005). While the physico-chemical properties of *MrNV* are consistent with those of other members of the *Nodaviridae*, it differs structurally and genetically from other nodaviruses within the two recognised genera, *Alphanodavirus* and *Betanodavirus* (Ho *et al.*, 2017, 2018; Naveenkumar *et al.*, 2013). Consequently, a third genus, *Gammanodavirus*, has been proposed for nodaviruses that infect crustaceans, including *MrNV* and *Penaeus vannamei* nodavirus (*PvNV*) (Naveenkumar *et al.*, 2013).

XSV is the first sequenced satellite virus in aquatic animals and it is also the first record of a satellite-nodavirus association (Bonami *et al.*, 2005). XSV has been classified by the ICTV as *Macrobrachium* satellite virus 1 of the family *Sarothroviridae*.

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

Both viral pathogens (*MrNV* and XSV) are stable in processed or stored samples stored at –20 or –80°C. Storing the samples at –80°C is recommended for long-time storage and maintenance of pathogen virulence (Sahul Hameed & Bonami, 2012). The infected samples should be processed at low temperature to maintain the stability of the viruses. Viral inoculum prepared from infected prawn stored at –20°C caused 100% mortality in postlarvae (PL) of *M. rosenbergii* by immersion challenge (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a). Ravi & Sahul Hameed (2016) found that *MrNV* in tissue suspensions was inactivated after exposure to 50°C for at least 5 min.

2.1.3. Survival and stability outside the host

Survival outside the host is not known.

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *MrNV* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*).

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 MrNV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: white leg shrimp (*Penaeus vannamei*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results (but not active infection) have been reported in the following species:

Family	Scientific name	Common name
Aeshnidae	<i>Aeshna</i> sp.	dragonfly
Artemiidae	<i>Artemia</i> sp.	brine shrimps
Belostomatidae	<i>Belostoma</i> sp.	giant water bug
Dytiscidae	<i>Cybister</i> sp.	beetle
Notonectidae	<i>Notonecta</i> sp.	backswimmer
Palaemonidae	<i>Macrobrachium rude</i>	hairy river prawn
	<i>Macrobrachium malcolmsonii</i>	monsoon river prawn
Parastacidae	<i>Cherax quadricarinatus</i>	red claw crayfish
Penaeidae	<i>Penaeus japonicus</i>	kuruma prawn
	<i>Penaeus indicus</i>	Indian white prawn
	<i>Penaeus monodon</i>	giant tiger prawn

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

Experimental pathogenicity studies revealed that larvae, PL and early juveniles of *M. rosenbergii* are susceptible to MrNV/XSV, whereas adults are resistant (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

No mortality was observed either in naturally or experimentally (MrNV/XSV) infected subadult and adult prawns. Experimental studies confirmed vertical transmission from infected broodstock to PL (Sudhakaran *et al.*, 2007a).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

MrNV and XSV have been demonstrated in gill tissue, head muscle, heart, abdominal muscle, ovaries, pleopods and tail muscle, but not the hepatopancreas or eyestalk (Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sri Widada *et al.*, 2003).

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

One study has indicated the possibility that marine shrimp act as a reservoir for MrNV and XSV and that these viruses maintain virulence in the shrimp tissue system (Sudhakaran *et al.*, 2006).

2.2.6. Vectors

Aquatic insects such as giant water bug (*Belostoma* sp.), dragonfly (*Aeshna* sp.), beetle (*Cybister* sp.) and backswimmer (*Notonecta* sp.) may act as mechanical carriers for MrNV/XSV and are a potential transmission risk to cultivated *Macrobrachium rosenbergii* (Sudhakaran *et al.*, 2008). It is recommended to remove these insects from freshwater prawn culture systems, especially at larval-rearing centres. Sudhakaran *et al.* (2008) demonstrated RT-PCR positives from insects, and infected C6/36 insect cell line with tissue homogenates from the insects. Viral replication was confirmed through EM and RT-PCR, but transmission from insects to naïve shrimp was not demonstrated.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Larvae, PL and juveniles of *M. rosenbergii* are susceptible to infection with MrNV, which often causes high mortalities in these life stages. Mortality may reach a maximum in about 5 or 6 days after the appearance of the first clinical signs. Very few PL with infection with MrNV survive beyond 15 days in an outbreak, but PL that survive may grow to market size.

Adults are resistant to infection with *MrNV*, but act as carriers (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a). Prevalence is variable from 10% to 100% in hatchery, nursery and grow-out systems (Arcier *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; 2004b).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Infected PL become opaque and develop a whitish appearance, particularly in the abdominal region. The whitish discoloration appears first in the second or third abdominal segment and gradually diffuses both anteriorly and posteriorly. In severe cases, degeneration of telson and uropods may occur. Floating exuviae (moult) in the tanks appear abnormal and resemble 'mica flakes' (Arcier *et al.*, 1999). The infected PL show progressive weakening of their feeding and swimming ability (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

2.3.3. Gross pathology

Infection with *MrNV* is indicated by the whitish coloration of abdominal muscle.

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission is vertical by trans-ovum and horizontal by the waterborne route (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2007a).

2.3.5. Environmental factors

Not available.

2.3.6. Geographical distribution

The disease was first reported in the French West Indies (Arcier *et al.*, 1999), later in Asia-Pacific (Murwantoko *et al.*, 2016; Owens *et al.*, 2009; Qian *et al.*, 2003; Saedi *et al.*, 2012; Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Wang *et al.*, 2008; Yoganandhan *et al.*, 2006).

See WOA-H-WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/home>) for recent information on distribution at the country level.

2.4. Biosecurity and disease control strategies

Preventive measures, such as screening of broodstock and PL, and good management practices may help to prevent infection with *MrNV* in culture systems. As the life cycle of *M. rosenbergii* is completed under controlled conditions, specific pathogen-free (SPF) broodstock and PL can be produced (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

2.4.1. Vaccination

Not available

2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No known chemotherapeutic agents reported to treat *MrNV*-infected prawn.

2.4.3. Immunostimulation

The immunomodulatory effect of recombinant capsid protein and recombinant RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) protein of *MrNV* has been studied and the protection of viral challenged post-larvae from *MrNV* infection has been demonstrated (Farook *et al.*, 2014; NaveenKumar *et al.*, 2021).

2.4.4. Breeding resistant strains

None reported

2.4.5. Inactivation methods

A viral suspension treated with heat at 65°C for 2 hours destroyed infectivity of *MrNV* and *XSV* in challenge experiments (Qian *et al.*, 2003). The viral inoculum exposed to UV irradiation for a period of 5 minutes and more was totally inactivated and failed to cause mortality in PL of prawn (Ravi & Sahul Hameed, 2016).

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Routine disinfection procedures followed for crustacean viral disease control are suggested.

2.4.7. General husbandry

MrNV is transmitted both horizontally and vertically in culture systems (Qian *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a; Sudhakaran *et al.*, 2007a). Good husbandry practices, such as proper disinfection of tanks and water may help to prevent infection. It is recommended to remove insects from freshwater prawn culture systems, especially at larval-rearing centres. Specific pathogen-free (SPF) broodstock and PL can be obtained from disease free populations or by RT-PCR screening and selection of negative broodstock (Romestand & Bonami, 2003; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005).

3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

3.1. Selection of populations and individual specimens

PLs are most suitable for detection of *MrNV*. PL showing clinical signs of disease can be sampled preferentially. Adults and juveniles can be sampled for *MrNV* however prevalence in these lifestages may be lower (see Section 2.3.1).

3.2. Selection of organs or tissues

The tissues most affected in moribund PLs/early juveniles are striated muscles of the abdomen, cephalothorax and tail. The whole PL body is preferred for detection of *MrNV* (Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Sri Widada *et al.*, 2003; Yoganandhan *et al.*, 2005). All organs of adult *M. rosenbergii* except eyestalks and the hepatopancreas, are best for screening the viruses by RT-PCR.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Eyestalks and the hepatopancreas of adult prawns are not suitable (Sri Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

3.4. Non-lethal sampling

Pleopods (swimming legs) are a convenient source of RNA for non-destructive screening of *MrNV* in adult prawn (Sahul Hameed *et al.*, 2004a).

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

3.5. Preservation of samples for submission

Infected larvae or PL with prominent signs of whitish muscle in the abdominal region are collected from disease outbreak areas. Samples are washed in sterile saline, transferred to sterile tubes, and transported to the laboratory. For general guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0.

3.5.1. Samples for pathogen isolation

Moribund or frozen PL samples can be used for isolation of viral pathogens using cell lines (C6/36 mosquito cell line (Sudhakaran *et al.*, 2007b).

3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Infected samples stored at -80°C or samples preserved in 80% (v/v) analytical/reagent-grade (undenatured) ethanol should be used for RT-PCR for detection of *MrNV* (Sri Widada *et al.*, 2003; Sahul Hameed *et al.*, 2004b; Yoganandhan *et al.*, 2005).

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

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

Tissue samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation should be fixed immediately after collection in neutral-buffered formalin or modified Davidson's fixative (Sri Widada *et al.*, 2003). 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 5.3. of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans).

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 animals 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 identifying infection 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 life stage.

Ratings against purposes of use. For each recommended assay a qualitative rating against 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, cost, timeliness, and sample throughput. For a specific purpose of use, assays are rated as:

+++ =	Most suitable methods – desirable performance and operational characteristics;
++ =	Suitable method(s) acceptable performance and operational characteristics under most circumstances;
+ =	Less suitable methods – performance or operational characteristics may significantly limit application;
Shaded boxes =	Not appropriate for this purpose.

Level of validation. 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.

WOAH 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). These issues should be communicated to the WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	J. Surveillance of apparently healthy animals				K. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				L. 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						++	++					
Cell culture												
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1	+++	+++	+++	1
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	+++	+++	+++	2				
Conventional RT-PCR followed by amplicon sequencing									+++	+++	+++	2
<i>In-situ</i> hybridisation						++	++	1		++	++	1
Bioassay												
LAMP	++	++	++	1	++	++	++	1				
Ab-ELISA												
Ag-ELISA					++	++	++	1				
Lateral flow assay					++	++	++	2				
Other methods ³												

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the WOAH 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

None to date

4.2. Histopathology and cytopathology

The most affected tissue in infected PL is striated muscle of the cephalothorax, abdomen and tail. Histological features include the presence of acute Zenker's necrosis of striated muscles, characterised by severe hyaline degeneration, necrosis and muscular lysis. Moderate oedema and abnormal open spaces among the affected muscle cells are also observed, as is the presence of large oval or irregular basophilic cytoplasmic inclusion bodies in infected muscles (Arcier *et al.*, 1999; Hsieh *et al.*, 2006).

4.3. Cell culture for isolation

MrNV has been isolated in insect cell lines, but is not a recommended method (Sudhakaran *et al.*, 2007b) (Hernandez-Herrera *et al.*, 2007).

4.4. Nucleic acid amplification

PCR methods for MrNV and XSV are included in this section for completeness. However, the case definitions in Section 6 are based on detection methods for MrNV only.

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5. *Use of molecular techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances.

4.4.1. Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR assay can be performed using the SYBR Green dye based on the method described by Hernandez-Herrera *et al.* (2007) or the TaqMan assay described by Zhang *et al.* (2006).

Pathogen / target gene	Primer/probe (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: Hernandez-Herrera <i>et al.</i> (2007); GenBank Accession No.: AY222839			
MrNV/RNA1	Fwd: AGG-ATC-CAC-TAA-GAA-CGT-GG Rev: CAC-GGT-CAC-AAT-CCT-TGC-G	500 nM 500 nM	40 cycles of: 95°C/15 sec, 60°C/5 sec and 72°C/10 sec
Method 2: Zhang <i>et al.</i> (2006); GenBank Accession No.: AY231436			
MrNV/RNA1	Fwd: CAA-CTC-GGT-ATG-GAA-CTC-AAG-GT Rev: AGG-AAA-TAC-ACG-AGC-AAG-AAA-AGT-C Probe: FAM-ACC-CTT-CGA-CCC-CAG-CAA-TGG-TG-TAMARA	1000 nM 1000 nM 400 nM	50 cycles of: 94°C/30 sec and 58°C/30 sec
Method 3: Zhang <i>et al.</i> (2006); GenBank Accession No.: DQ174318			
XSV	Fwd: AGC-CAC-ACT-CTC-GCA-TCT-GA Rev: CTC-CAG-CAA-AGT-GCG-ATA-CG Probe: FAM-CAT-GCC-CCA-TGA-TCC-TCG-CA-TAMARA	1000 nM 1000 nM 400 nM	50 cycles of: 94°C/30 sec and 58°C/30 sec

4.4.2. Conventional RT-PCR

The protocol for the conventional RT-PCR for detection of *MrNV*/*XSV* developed by Sri Widada *et al.* (2003), Sahul Hameed *et al.* (2004a; 2004b) and Sudhakaran *et al.* (2007a) is recommended. *MrNV* and *XSV* can be detected by conventional RT-PCR separately using a specific set of primers or these two viruses can be detected simultaneously using a single-tube one-step multiplex RT-PCR (Yoganandhan *et al.*, 2005). Conventional Real-time RT-PCR is recommended in situations where high sensitivity is required.

Pathogen / target gene	Primer (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Method 1: One step RT-PCR (Sri Widada <i>et al.</i> , 2003; Sahul Hameed <i>et al.</i> , 2004a, b; Sudhakaran <i>et al.</i> , 2007a) GenBank Accession No.: AY222840 (<i>MrNV</i>) and AY247793 (<i>XSV</i>)			
<i>MrNV</i>	Fwd: GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG Rev: AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40sec and 68°C/60 sec
<i>XSV</i>	Fwd: CGC-GGA-TCC-GAT-GAA-TAA-GCG-CAT-TAA-TAA Rev: CCG-GAA-TTC-CGT-TAC-TGT-TCG-GAG-TCC-CAA	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec
Method 2: nested RT-PCR using above-mentioned primers as external primers (Sudhakaran <i>et al.</i> , 2007a)			
<i>MrNV</i>	Internal primers: Fwd: GAT-GAC-CCC-AAC-GTT-ATC-CT Rev: GTG-TAG-TCA-CTT-GCA-AGA-GG	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/60 sec, 55°C/60 sec and 72°C/60 sec
<i>XSV</i>	Internal primers: Fwd: ACA-TTG-GCG-GTT-GGG-TCA-TA Rev: GTG-CCT-GTT-GCT-GAA-ATA-CC-3	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/60 sec, 55°C/60 sec and 72°C/60 sec
Method 3: Multiplex RT-PCR (Yoganandhan <i>et al.</i> , 2005) GenBank Accession No.: AY222840 (<i>MrNV</i>) and AY247793 (<i>XSV</i>)			
<i>MrNV</i>	Fwd: GAT-ACA-GAT-CCA-CTA-GAT-GAC-C Rev: GAC-GAT-AGC-TCT-GAT-AAT-CC	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec
<i>XSV</i>	Fwd: GGA-GAA-CCA-TGA-GAT-CAC-G Rev: CTG-CTC-ATT-ACT-GTT-CGG-AGT-C	0.02 nM 0.02 nM	30 cycles of: 94°C/40 sec, 55°C/40 sec and 68°C/60 sec

4.4.3. Other nucleic acid amplification methods: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

Haridas *et al.* (2010) have applied loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *MrNV* and *XSV* in the freshwater prawn. A set of four primers, two outer primers and two inner primers, have been designed separately for detection of *MrNV* and *XSV*.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

The presence of *MrNV* in infected cells can be demonstrated in histological sections using a DIG-labelled DNA *in-situ* hybridisation probe specific for *MrNV* (Sri Widada *et al.*, 2003).

4.7. Immunohistochemistry

None developed.

4.8. Bioassay

Not used for diagnostic purposes.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

4.9.1. ELISA

Antibody-based diagnostic methods for *MrNV* include the ELISA described by Romestand & Bonami (2003) or the triple-antibody sandwich (TAS) ELISA based on a monoclonal antibody (Qian *et al.*, 2006).

4.9.2. Lateral flow assay (LFA)

An antibody-based lateral flow assay (LFA) has been developed for the early detection of *MrNV* in the PL stage (Jamalpure *et al.*, 2021).

4.10. Other methods

None

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

Real-time RT-PCR is recommended for targeted surveillance to declare freedom from infection with *MrNV*.

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. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOAHP Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 *MrNV* shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR
- ii) Positive result by conventional RT-PCR
- iii) Positive result by LAMP

¹ For example transboundary commodities.

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *MrNV* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR result and positive conventional RT-PCR and sequence analysis

6.2 Clinically affected animals

6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

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

- i) Clinical signs consistent with infection by *MrNV*
- ii) Histopathology consistent with infection by *MrNV*
- iii) Positive result by real-time RT-PCR
- iv) Positive conventional RT-PCR
- v) Positive result by *in situ* hybridisation
- vi) Positive result by LAMP
- vii) Positive result by Ag ELISA
- viii) Positive result by lateral flow assay

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *MrNV* is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- iv) Positive result for real time RT-PCR and positive result by conventional RT-PCR with sequence analysis
- v) Positive result by ISH followed by positive result by conventional RT-PCR with sequence analysis
- vi) Positive result by ISH followed by positive result by real-time RT-PCR

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *MrNV* are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with *MrNV*, 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 (<i>n</i>)	DSp (<i>n</i>)	Reference test	Citation
RT-PCR	Diagnosis	Clinically affected PL from hatchery and nursery	Whole post-larvae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	100 (<i>n</i> =20)	100 (<i>n</i> =20)	Western blot or ELISA	Sri Widada <i>et al.</i> (2003); Sahul Hameed <i>et al.</i> (2011)
Lateral flow immun assay	Surveillance	PL from prawn hatcheries	Whole post-larvae	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	100 (<i>n</i> =80)	90 (<i>n</i> =80)	RT-PCR	Jamalpure <i>et al.</i> (2021)

DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity, *n* = number of samples used in the study, RT-PCR: = reverse transcription 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, DSp = diagnostic specificity, n = number of samples used in the study,
RT-PCR: = reverse transcription polymerase chain reaction.

7. References

- ARCIER J.-M., HERMAN F., LIGHTNER D.V., REDMAN R.M., MARI J. & BONAMI J.-R. (1999). A viral disease associated with mortalities in hatchery-reared postlarvae of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **38**, 177–181.
- BONAMI J.R., SHI Z., QIAN D. & SRI WIDADA J. (2005). White tail disease of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus. *J. Fish Dis.*, **28**, 23–31.
- FAROOK M.A., SUNDAR RAJ N., MADAN N., VIMAL S., ABDUL MAJEED S., TAJU G., RAJKUMAR T., SANTHOSHKUMAR S., SIVAKUMAR S. & SAHUL HAMEED A.S. (2014). Immunomodulatory effect of recombinant *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid protein (r-MCP) against white tail disease of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture*, **433**, 395–403.
- HARIDAS D.V., PILLAI D., MANOJKUMAR B., NAIR C.M. & SHERIEF P.M. (2010). Optimisation of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Virol. Methods*, **167**, 61–67.
- HERNANDEZ-HERRERA R.I., CHAPPE-BONNICHON V., ROCH P., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2007). Partial susceptibility of the SSN-1 fish cell line to a crustacean virus: a defective replication study. *J. Fish Dis.*, **30**, 673–679.
- HO K.L., GABRIELSEN M., BEH P.L., KUEH C.L., THONG Q.X. & STREETLEY J. (2018). Structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus: a new genus within the nodaviridae? *PLOS Biology*, **16**, e3000038.
- HO K.L., KUEH C.L., BEH P.L., TAN W.S. & BHELLA D. (2017). Cryo-Electron microscopy structure of the *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus capsid at 7 angstroms resolution. *Scientific Reports*, **7**, 2083.
- HSIEH C.-Y., WU Z.-B., TUNG M.-C., TU C., LO S.-P., CHANG T.-C., CHANG C.-D., CHEN S.-C., HSIEH Y.-C. & TSAI S.-S. (2006). *In situ* hybridization and RT-PCR detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **29**, 665–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00762.x>
- JAMALPURE S., VIMAL S., NAFEEZ AHMED A., SAHUL HAMEED A.S., PAKNIKAR K.M. & JYTIKA M.R. (2021). On-site detection of nodavirus in post larval (PL) stage of the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: A test to nip the problem in the bud. *Aquaculture*, **534**, 736292; <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736292>
- MURWANTOKO M., ARIF B., ROOSMANTO R & MASASHI K. (2016). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in a giant freshwater prawn hatchery in Indonesia. *Springer Plus*, **5**, 1729.
- NAVEENKUMAR S., SHEKAR M., KARUNASAGAR I. & KARUNAS I. (2013). Genetic analysis of RNA1 and RNA2 of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) isolated from India. *Virus Res.*, **173**, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.003>
- NAVEEN KUMAR S., PRAVEEN R., INDRANI K. & KARUNASAGAR I. (2021). Recombinant viral proteins delivered orally through inactivated bacterial cells induce protection in *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) against White Tail Disease. *J. Fish Dis.*, **44**, 601–612.
- OWENS L., LA FAUCE K., JUNTUNEN K., HAYAKIKOSOL O. & ZENG C. (2009). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus disease (white tail disease) in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 175–180.
- QIAN D., LIU W., JIANXIANG W. & YU L. (2006). Preparation of monoclonal antibody against *Macrobrachium rosenbergii* Nodavirus and application of TAS-ELISA for virus diagnosis in post-larvae hatcheries in east China during 2000–2004. *Aquaculture*, **261**, 1144–1150.

-
- QIAN D., SHI Z., ZHANG S., CAO Z., LIU W. LI L., XIE Y., CAMBOURNAC I. & BONAMI J.R. (2003). Extra small virus-like particles (XSV) and nodavirus associated with whitish muscle disease in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish Dis.*, **26**, 521–527.
- RAVI N. & SAHUL HAMEED A.S. (2016). Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Aquaculture Res.*, **47**, 1231–1237.
- ROMESTAND B. & BONAMI J.R. (2003). A sandwich enzyme linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *J. Fish Dis.*, **26**, 71–75.
- SAEDI T. A., HASSAN M., WEN S. T., KHATIJAH Y., HASSAN M.D., KUA B.C., SOON G.T. & SUBHA B. (2012). Detection and phylogenetic profiling of nodavirus associated with white tail disease in Malaysian *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Mol. Biol. Rep.*, **39**, 5785–5790.
- SAHUL HAMEED A.S. & BONAMI J.R. (2012). White Tail Disease of Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Indian J. Virol.*, **23**, 134–140.
- SAHUL HAMEED A.S., RAVI M., FAROOK M.A., TAJU G., HERNANDEZ-HERRERA R.I. & BONAMI J.R. (2011). Screening the post-larvae of *Macrobrachium rosenbergii* for early detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) by RT-PCR and immunological techniques. *Aquaculture*, **317**, 42–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.04.022>
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004a). Experimental transmission and tissue tropism of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and its associated small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **62**, 191–196.
- SAHUL HAMEED A.S., YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J. & BONAMI J.R. (2004b). Studies on the occurrence of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus-like particles associated with white tail disease of *M. rosenbergii* in India by RT-PCR detection. *Aquaculture*, **238**, 127–133.
- SRI WIDADA J., DURAND S., CAMBOURNAC I., QIAN D., SHI Z., DEJONGHE E., RICHARD V. & BONAMI J.R. (2003). Genome-based detection methods of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus, a pathogen of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: dot-blot, *in situ* hybridization and RT-PCR. *J. Fish Dis.*, **26**, 583–590.
- SRI WIDADA J., RICHARD V., SHI Z., QIAN D. & BONAMI J.R. (2004). Dot-Blot hybridization and RT-PCR detection of extra small virus (XSV) associated with white tail disease of prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 83–87.
- SUDHAKARAN R., HARIBABU P., KUMAR S.R., SARATHI M., AHMED V.P., BABU V.S., VENKATESAN C. & HAMEED A.S. (2008). Natural aquatic insect carriers of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV). *Dis. Aquat. Org.*, **79**, 141–145. doi: 10.3354/dao01886.
- SUDHAKARAN R., ISHAQ AHMED V.P., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2007a). Experimental vertical transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) from brooders to progeny in *Macrobrachium rosenbergii* and *Artemia*. *J. Fish Dis.*, **30**, 27–35.
- SUDHAKARAN R., PARAMESWARAN V. & SAHUL HAMEED A.S. (2007b). *In vitro* replication of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus (XSV) in C6/36 mosquito cell line. *J. Virol. Methods*, **146**, 112–118.
- SUDHAKARAN R., SYED MUSTHAQ S., HARIBABU P., MUKHERJEE S.C., GOPAL C. & SAHUL HAMEED A.S. (2006). Experimental transmission of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) and extra small virus (XSV) in three species of marine shrimp (*Penaeus indicus*, *Penaeus japonicus* and *Penaeus monodon*). *Aquaculture*, **257**, 136–141.
- WANG C.S., CHANG J.S., WEN C.M., SHIH H.H., & CHEN S.N. (2008). *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus infection in *M. rosenbergii* (de Man) with white tail disease cultured in Taiwan. *J. Fish Dis.*, **31**, 415–422.
- YOGANANDHAN K., LEARTVIBHAS M., SRIWONGPUK S. & LIMSUWAN C. (2006). White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand. *Dis. Aquatic. Org.*, **69**, 255–258.
- YOGANANDHAN K., SRI WIDADA J., BONAMI J.R. & SAHUL HAMEED A.S. (2005). Simultaneous detection of *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus and extra small virus by a single tube, one-step multiplex RT-PCR assay. *J. Fish Dis.*, **28**, 65–69.

ZHANG H., WANG J., YUAN J., LI L., ZHANG J., BONAMI J.-R. & SHI Z. (2006). Quantitative relationship of two viruses (MrNV and XSV) in white tail disease of *Macrobrachium rosenbergii*. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 11–17.

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease) (please consult the WOA web site: <https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>) any further information on infection with *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (white tail disease)

NB: FIRST ADOPTED IN 2009. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2017.

CHAPTER 2.2.9
INFECTION WITH
YELLOW HEAD VIRUS GENOTYPE 1

1. Scope

Infection with yellow head virus genotype 1 means infection with the pathogenic agent yellow head virus genotype 1 (YHV1) of the Genus *Okavirus* and Family *Roniviridae*.

2. Disease information

2.1. Agent factors

2.1.1. Aetiological agent

Yellow head virus genotype 1 (YHV1; species *Yellow head virus*) is one of eight known genotypes in the yellow head complex of viruses and is the only known genotype that causes yellow head disease. YHV1 forms enveloped, rod-shaped particles 40–50 nm × 150–180 nm (Chantanachookin *et al.*, 1993; Wongteerasupaya *et al.*, 1995). Envelopes are studded with prominent peplomers projecting approximately 11 nm from the surface. Nucleocapsids appear as rods (diameter 20–30 nm) and possess a helical symmetry with a periodicity of 5–7 nm. Virions comprise three structural proteins (nucleoprotein p20 and envelope glycoproteins gp64 and gp116) and a ~26 kb positive-sense single-stranded RNA genome. The nucleotide sequence of the ORF1b region of the viral genome has been used to determine the phylogenetic relationships of YHV1 and other yellow head virus genotypes (Dong *et al.*, 2017; Mohr *et al.*, 2015; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a).

YHV1, yellow head virus genotype 2 (YHV2; species *Gill-associated virus*) and yellow head virus genotype 8 (YHV8; species *Okavirus 1*) have been formally classified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (Walker *et al.*, 2021). Four other genotypes in the complex (YHV3–YHV6) occur commonly in healthy *Penaeus monodon* in East Africa, Asia and Australia and are rarely or never associated with disease (Walker *et al.*, 2001; Wijegoonawardane *et al.*, 2008a). Of the remaining two yellow head virus genotypes, YHV7 was detected in diseased *P. monodon* in Australia (Mohr *et al.*, 2015) and YHV8 was detected in *P. chinensis* suspected of suffering from acute hepatopancreatic necrosis disease (Liu *et al.*, 2014). There is evidence of genetic recombination between genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2009).

2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

YHV1, identified by either transmission electron microscopy (TEM) (Nunan *et al.*, 1998), or molecular methods (Durand *et al.*, 2000; McColl *et al.*, 2004), has been detected in frozen commodity prawns with infectivity demonstrated by bioassay.

2.1.3. Survival and stability outside the host

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

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 YHV1 according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: blue shrimp (*Penaeus stylirostris*), dagger blade grass shrimp (*Palaemonetes pugio*), giant tiger prawn (*Penaeus monodon*), jinga shrimp (*Metapenaeus affinis*) 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 infection with YHV1 according to Chapter 1.5 of the *Aquatic Code* are: banana prawn (*Penaeus merguensis*), carpenter prawn (*Palaemon serrifer*), kuruma prawn (*Penaeus japonicus*), northern brown shrimp (*Penaeus aztecus*), northern pink shrimp (*Penaeus duorarum*), northern white shrimp (*Penaeus setiferus*), Pacific blue prawn (*Palaemon styliiferus*), red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*), Sunda river prawn (*Macrobrachium sintangense*) and yellow shrimp (*Metapenaeus brevicornis*).

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: acorn barnacle (*Chelonibia patula*), blue crab (*Callinectes sapidus*), cyclopoid copepod (*Ergasilus manicatus*), gooseneck barnacle (*Octolasmis muelleri*), Gulf killifish (*Fundulus grandis*) and paste shrimp (*Acetes* sp.).

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

Penaeus monodon are susceptible to YHV1 infection beyond PL15 (Khongpradit *et al.*, 1995). Lightner *et al.* (1998) YHV1 challenge caused disease in juveniles of *Penaeus aztecus*, *P. duorarum*, *P. setiferus*, and *P. vannamei* but postlarvae appeared resistant (Lightner *et al.* 1998). YHV1 infections are usually detected only when disease is evident, however infections have been detected in healthy wild populations of *P. stylirostris* (Castro-Longoria *et al.*, 2008). Natural YHV1 infections have been detected in *P. japonicus*, *P. merguensis*, *P. setiferus*, *M. ensis*, and *P. styliiferus* (Cowley *et al.*, 2002; Flegel *et al.*, 1995a; 1995b).

2.2.4. Distribution of the pathogen in the host

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

2.2.5. Aquatic animal reservoirs of infection

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

2.2.6. Vectors

There are no known vectors of YHV1.

2.3. Disease pattern

2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In farmed *P. monodon*, YHV disease can cause up to 100% mortality within 3–5 days of the first appearance of clinical signs (Chantanachookin *et al.*, 1993). Mortalities can be induced by experimental exposure of *P. monodon* to YHV1 (Oanh *et al.*, 2011).

2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Shrimp from late postlarvae (PL) stages onwards can be infected experimentally with YHV1. In cultured shrimp, infection can result in mass mortality occurring, usually in early to late juvenile stages. Moribund shrimp may exhibit a bleached overall appearance and a yellowish discoloration of the cephalothorax. However, these disease features are not particularly distinctive, and gross signs are not reliable even for preliminary diagnosis of YHV1.

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

2.3.3 Gross pathology

The yellow hepatopancreas of diseased shrimp may be exceptionally soft when compared with the brown hepatopancreas of a healthy shrimp (Chantanachookin *et al.*, 1993).

2.3.4. Modes of transmission and life cycle

YHV1 can be transmitted horizontally by ingestion of infected tissue, immersion in membrane-filtered tissue extracts, or by cohabitation with infected shrimp (Walker & Sittidilokratna, 2008). YHV1 replicates in the cytoplasm of infected cells in which long filamentous pre-nucleocapsids are abundant and virions bud into cytoplasmic vesicles in densely packed paracrystalline arrays for egress at the cytoplasmic membrane (Chantanachookin *et al.*, 1993).

2.3.5. Environmental factors

Elevated virus infection levels accompanied by disease can be precipitated by physiological stress induced by sudden changes in pH or dissolved oxygen levels, or other environmental factors (Flegel *et al.*, 1997).

2.3.6. Geographical distribution

YHV1 has been reported in South-East Asia (Walker *et al.*, 2001). YHV1 has also been detected in *P. stylirostris* and *P. vannamei* in the Americas (Castro-Longoria *et al.*, 2008; Sanchez-Barajas *et al.*, 2009).

See WAHIS (<https://wahis.woah.org/#/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 effective commercial anti-viral product is yet available.

2.4.3. Immunostimulation

A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of YHV1 and white spot syndrome virus demonstrated inhibition of the two viruses when administered to shrimp by injection (Chaimongkon *et al.*, 2020)

2.4.4. Breeding resistant strains

Not reported.

2.4.5. Inactivation methods

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

2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Not reported.

2.4.7. General husbandry

The focus is to exclude YHV1 from entering production systems; for example, by using specific pathogen-free (SPF) stock, batch testing stock and biosecurity measures to reduce entry into culture systems.

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

For diagnosis during a disease outbreak, moribund shrimp collected from pond edges are the preferred source of material for examination. Apparently healthy shrimp should also be collected from the same ponds. For surveillance in populations of apparently healthy shrimp, life stages from PL stage 15 onwards can provide tissue sources useful for testing.

3.2. Selection of organs or tissues

In moribund shrimp suspected to be infected with YHV1, pleopods, gill and lymphoid organ are the most suitable sample tissues. For screening or surveillance of juvenile or adult shrimp that appear grossly normal, pleopods or gills are preferred.

3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Not determined.

3.4. Non-lethal sampling

Haemolymph can be used for non-lethal sampling.

If non-lethal tissue sample types differ from recommended tissues (see Section 3.2.), or from the tissue samples used in validation studies, the effect on diagnostic performance should be considered.

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 bioassay

The success of bioassay 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.

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 (absolute) 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 can be frozen at –20°C or below for 1 month or less; for long-term storage, –80°C is recommended.

Standard sample collection, preservation and processing methods for molecular techniques can be found in Section B.5.5. 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 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, however, larger specimens should be processed and tested individually. Small life stages can be pooled to obtain the minimum amount of material for 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.

WOAH 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 WOAH Reference Laboratories so that advice can be provided to diagnostic laboratories and the standards amended if necessary.

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

Method	D. Surveillance of apparently healthy animals				E. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				F. 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				
Cell culture												
Real-time RT-PCR												
Conventional RT-PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional PCR followed by amplicon sequencing									++	+++	+++	1
<i>In-situ</i> hybridisation						++	++	1				
Bioassay					+	+	+	1				
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 WOAH 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; IFAT = indirect fluorescent antibody test.

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

Fix the cephalothorax tissues of moribund shrimp suspected to be affected by YHV1 in Davidson's fixative, prepare tissue sections and stain with Meyer's haematoxylin and eosin (H&E) using standard histological procedures (Lightner, 1996). Examine tissues of ectodermal and mesodermal origin by light microscopy for the presence of moderate to large numbers of deeply basophilic, evenly stained, spherical, cytoplasmic inclusions approximately 2 µm in diameter or smaller (Chantanachookin *et al.*, 1993). Tissues of the lymphoid organ, stomach subcuticulum and gills are particularly informative.

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

4.3. Cell culture for isolation

Although primary shrimp cell culture methods are available, they are not recommended to isolate and identify YHV1 as a routine diagnostic method. No continuous cell lines suitable for YHV1 culture are available.

4.4. Nucleic acid amplification

PCR assays should always be run with the controls specified in Section 5.5 *Use of molecular and antibody-based techniques for confirmatory testing and diagnosis* of Chapter 2.2.0 *General information* (diseases of crustaceans). Each sample should be tested in duplicate.

Extraction of nucleic acids

Different kits and procedures can be used for nucleic acid extraction. The quality and concentration of the extracted nucleic acid is important and can be checked using a suitable method as appropriate to the circumstances.

4.4.1. Real-time PCR

Not available.

4.4.2. Conventional RT-PCR

Three RT-PCR protocols are described. For all conventional RT-PCR protocols, assignment to YHV genotype 1 can be achieved by nucleotide sequence analysis of the RT-PCR amplicon. Reference sequences for YHV1 include:

Protocol 1 is a 1-step RT-PCR that can be used to detect YHV1 in affected shrimp. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Wongteerasupaya *et al.* (1997). This protocol will detect YHV1 but not GAV or any of the other genotypes currently recognised.

Protocol 2 is a more sensitive multiplex nested RT-PCR that can be used to differentiate YHV1 from GAV. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Cowley *et al.* (2004). The first stage of the multiplex nested RT-PCR (primary RT-PCR) was designed to detect YHV1 and GAV but has been reported to also detect YHV7 (Mohr *et al.*, 2015). Both the primary RT-PCR and the nested PCR detected the novel YHV genotype from China (People's Rep. of) (Liu *et al.*, 2014). In the second PCR step, a 277 bp product indicates detection of YHV and a 406 bp product indicates detection of GAV. The presence of both 406 bp and 277 bp products indicates a dual infection with GAV and YHV1. The nested PCR can be run as two separate assays specific for YHV1 or GAV by omitting either the G6 or Y3 primer, respectively. **NOTE:** Due to reported problems with primer specificity for some emerging strains, all PCR products generated using protocol 2 should be sequenced to confirm the virus genotype.

Protocol 3 is a multiplex nested RT-PCR protocol that can be used for screening shrimp for any of the seven genotypes of the yellow head complex of viruses. The protocol is as described by Mohr *et al.* (2015) and adapted from Wijegoonawardane *et al.* (2008b). Two primers were designed to each site, one accommodating sequence variations

amongst YHV1 isolates and the other variations amongst isolates of the other genotypes (Wijegoonawardane *et al.*, 2008b). It is not known whether this assay will detect the YHV genotype recently detected in China (People's Rep. of) (Liu *et al.*, 2014).

Primer sequences

Pathogen / target gene	Primer (5'–3')	Concentration	Cycling parameters
Protocol 1 (Wongteerasupaya <i>et al.</i> , 1997; GenBank Accession No.: ??; amplicon size: 135 bp)			
YHV1 / ORF1b	10F: CCG-CTA-ATT-TCA-AAA-ACT-ACG 144R: AAG-GTG-TTA-TGT-CGA-GGA-AGT	180 nM 180 nM	40 cycles of 94°C for 30sec, 58°C for 45 sec, 68°C for 45 sec,
Protocol 2 (Cowley <i>et al.</i> , 2004; GenBank Accession No.: ??)			
YHV1 and GAV / ORF1b	<p>Primary (Amplicon size: 794 bp)</p> <p>GY1: 5GAC-ATC-ACT-CCA-GAC-AAC-ATC-TG GY4: GTG-AAG-TCC-ATG-TGT-GTG-AGA-CG</p> <p>Nested for detection of YHV1 (Amplicon size: 277 bp)</p> <p>GY2: CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA Y3: ACG-CTC-TGT-GAC-AAG-CAT-GAA-GTT</p> <p>Nested for detection of GAV (Amplicon size: 406 bp)</p> <p>GY2: CAT-CTG-TCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA G6: GTA-GTA-GAG-ACG-AGT-GAC-ACC-TAT</p>	180 nM 180 nM 360 nM 360 nM 360 nM 360 nM	35 cycles of 95°C for 30 sec, 66°C for 30 sec, and 68 C for 45 sec
Protocol 3 (Wijegoonawardane <i>et al.</i> , 2008b; GenBank Accession No.: ??)			
YHV1 to YHV7 / ORF1b	<p>Primary (amplicon size: 359 bp)</p> <p>YC-F1ab pool: ATC-GTC-GTC-AGC-TAC-CGC-AAT-ACT-GC ATC-GTC-GTC-AGY-TAY-CGT-AAC-ACC-GC</p> <p>YC-R1ab pool: TCT-TCR-CGT-GTG-AAC-ACY-TTC-TTR-GC TCT-GCG-TGG-GTG-AAC-ACC-TTC-TTG-GC</p> <p>Nested (amplicon size: 147 bp)</p> <p>YC-F2ab pool: CGC-TTC-CAA-TGT-ATC-TGY-ATG-CAC-CA CGC-TTY-CAR-TGT-ATC-TGC-ATG-CAC-CA</p> <p>YC-R2ab pool: RTC-DGT-GTA-CAT-GTT-TGA-GAG-TTT-GTT GTC-AGT-GTA-CAT-ATT-GGA-GAG-TTT-RTT</p> <p>Mixed base codes: R(AG), Y(CT), M(AC), K(GT), S(GC), W(AT), H(ACT), B(GCT), V(AGC), D(AGT), N(AGCT).</p>	180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM 180 nM	35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 68°C for 45 sec, 35 cycles of 94°C for 45 sec, 60°C for 45 sec, 72°C for 45 sec;

The primer contains a mismatch for GAV but is specific for YHV1. The mismatch can cause false-positives with GAV in the nested PCR of protocol 2 where GAV generates an amplicon of very similar size to the expected size of the YHV1 amplicon. For GAV, the 7th base from left (T) is substituted for C so that the primer sequence for GAV should be 5'-CAT-CTG-CCC-AGA-AGG-CGT-CTA-TGA-3', according to the sequence data of the GAV genome (database accession numbers: NC_010306.1 and AF227196.2).

The 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 available.

4.5. Amplicon sequencing

The size of the PCR amplicon should be verified, for example by agarose gel electrophoresis. Both DNA strands of the PCR product must be sequenced and analysed in comparison with reference sequences.

4.6. *In-situ* hybridisation

The protocol of Tang *et al.* (2002) is suitable for detecting YHV1 or GAV (Tang & Lightner, 1999). To preserve viral RNA accessibility, fix tissues sampled from live shrimp in neutral-buffered, modified Davidson's fixative without acetic acid (RF-fixative) (Hasson *et al.*, 1997). To achieve good tissue preservation whilst also preserving RNA accessibility, normal Davidson's fixative can be used as long as the fixation time is limited to 24 hours (maximum of 48 hours). Detailed methods can be found in Tang *et al.* (2002) YHV-infected cells give a blue to purple-black colour against the brown counter stain. Positive controls of YHV-infected tissue and negative controls of uninfected shrimp tissue should be included. The digoxigenin-labelled DNA probe can be prepared by PCR labelling using the following primers:

YHV1051F: 5'-ACA-TCT-GTC-CAG-AAG-GCG-TC-3'

YHV1051R: 5'-GGG-GGT-GTA-GAG-GGA-GAG-AG-3'

4.7. Immunohistochemistry

Not applicable.

4.8. Bioassay

The bioassay procedure is based on that described by Spann *et al.* (1997), but similar procedures have been described by several other authors (e.g. Lu *et al.*, 1994). The bioassay should be conducted in susceptible shrimp that have been determined to be free from YHV complex viruses.

Suspect YHV1-infected samples should be maintained at 4°C or on ice. If necessary, the whole shrimp or the retained cephalothorax may be snap-frozen and stored at -80°C or in liquid nitrogen until required. Viral inoculum should be prepared as described by Spann *et al.* (1997).

Juvenile shrimp of a known susceptible species are injected with viral inoculum. Negative controls (buffer injected) and positive controls (known YHV1 positive material) treatment groups are required. Shrimp should be maintained separately to prevent cross-contamination between treatments. Observe the shrimp and record mortalities for at least 21 days or until the test and positive control groups reach 100% mortality.

4.9. Antibody- or antigen-based detection methods (ELISA, etc.)

None has been successfully developed.

4.10. Other methods

None at present.

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

Nested RT-PCR (Protocol 3) is recommended for demonstrating freedom from YHV1 in an apparently healthy populations. Sequencing of any amplified PCR products is required to determine the YHV genotype. Two-step PCR negative results are required for YHV1.

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. If a Competent Authority does not have the capability to undertake the necessary diagnostic tests it should seek advice from the appropriate WOA Reference Laboratory, and if necessary, refer samples to that laboratory for confirmatory testing of samples from the index case in a country, zone or compartment considered free.

6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status¹

Apparently healthy populations may fall under suspicion, and therefore be sampled, if there is an epidemiological link(s) to an infected population. Hydrographical 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 YHV1 shall be suspected if the following criterion is met:

- i) Positive result by a recommended RT-PCR detection test

6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with YHV1 is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) A positive result by conventional RT-PCR and identification of YHV1 by sequence analysis of the amplicon

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 YHV1 shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs consistent with YHV1 infection
- ii) Histopathology consistent with YHV1 infection
- iii) Positive result by conventional RT-PCR
- iv) Positive result by ISH
- v) Positive result by bioassay

6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with YHV1 is considered to be confirmed if the following criterion is met:

- i) A positive result from each of two RT-PCR methods targeting non-overlapping parts of the genome followed by sequence analysis of the amplicons to identify YHV1

6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with YHV1 are provided in Tables 6.3.1. and 6.3.2 (no data are currently available for either). This information can be used for the design of surveys for infection with YHV1, 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

¹ For example transboundary commodities.

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

7. References

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

CHAIMONGKON D., ASSAVALAPSAKUL W., PANYIM S. & ATTASART P. (2020). A multi-target dsRNA for simultaneous inhibition of yellow head virus and white spot syndrome virus in shrimp. *J. Biotechnol.*, **321**, 48–56. doi: 10.1016/j.jbiotec.2020.06.022. Epub 2020 Jun 29. PMID: 32615142.

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

COWLEY J.A., CADOGAN L.C., WONGTEERASUPAYA C., HODGSON R.A.J., BOONSAENG V. & WALKER P.J. (2004). Multiplex RT-nested PCR differentiation of gill-associated virus (Australia) from yellow head virus (Thailand) of *Penaeus monodon*. *J. Virol. Methods*, **117**, 49–59. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.11.018.

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

DONG X., LIU S., ZHU L., WAN X., LIU Q., QIU L., ZOU P., ZHANG Q. & HUANG J. (2017) Complete genome sequence of an isolate of a novel genotype of yellow head virus from *Fenneropenaeus chinensis* indigenous in China. *Arch Virol* **162**, 1149-1152.

DURAND S.V., TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (2000). Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of white spot syndrome virus and yellow head virus. *J. Aquatic Anim. Health*, **12**, 128–135.

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

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

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

-
- HASSON K.W., HASSON J., AUBERT H., REDMAN R.M. & LIGHTNER D.V. (1997). A new RNA-friendly fixative for the preservation of penaeid shrimp samples for virological assay using cDNA probes. *J. Virol. Methods*, **66**, 227–236.
- KHONGPRADIT R., KASORNCHANDRA J. & BOONYARATALIN S. (1995). Susceptibility of the postlarval stages of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to yellow-head baculovirus (YBV). *In: Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M., Subasinghe R.P. & Arthur J.R., eds. Asian Fisheries Society, Manila, the Philippines, p. 6.
- LIGHTNER D.V. (Ed.) (1996). Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA.
- LIGHTNER D.V., HASSON K. W., WHITE B. L & REMAN R. M. (1998) Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus *J. Aquatic Anim. Health*, **10**, 271-281
- LIU Q., HUANG J., YANG H.-L., YANG B., WANG H.-L., WANG Q.-T., LIU F. & ZHANG Q.-L. (2014) Detection of a new genotype of yellow-head virus in farmed shrimp suspicious of EMS/AHPNS infection. *Oceanol. Limnol. Sin.*, **45**, 703–709.
- LONGYANT S., SATTAMAN S., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & SITHIGORNGUL P. (2006). Experimental infection of some penaeid shrimps and crabs by yellow head virus (YHV). *Aquaculture*, **257**, 83–91.
- LONGYANT S., SITHIGORNGUL P., CHAVISUTHANGKURA P., RUKPRATANPORN S., SITHIGORNGUL W. & MENASVETA P. (2005). Differences in the susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. *Dis. Aquat. Org.*, **64**, 5–12.
- LU Y., TAPAY L.M., BROCK J.A. & LOH P.C. (1994). Infection of the yellow head baculo-like virus (YBV) in two species of penaeid shrimp *Penaeus stylirostris* (Stimpson) and *Penaeus vannamei* (Boone). *J. Fish Dis.*, **17**, 649–656.
- MCCOLL K.A., SLATER J., JEYASEKARAN G., HYATT A.D. & CRANE M.St.J. (2004). Detection of white spot syndrome virus and yellowhead virus in prawns imported into Australia. *Aust. Vet. J.*, **82**, 69–74.
- MOHR P.G., MOODY N.J.G, HOAD J., WILLIAMS L.M., BOWATER R.O., CUMMINS D.M., COWLEY J.A. & CRANE M.St.J. (2015). New yellow head virus genotype (YHV7) in giant tiger shrimp *Penaeus monodon* indigenous to northern Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **115**, 263–268.
- MOODY N. ET AL (IN PREPARATION). Development of a real-time and conventional PCR assays for the detection of yellow head virus genotype 1.
- NUNAN L.M., POULOS B.T. & LIGHTNER D.V. (1998). The detection of white spot syndrome virus (WSSV) and yellow head virus (YHV) in imported commodity shrimp. *Aquaculture*, **160**, 19–30.
- OANH D.T., VAN HULTEN M.C., COWLEY J.A. & WALKER P.J. (2011). Pathogenicity of gill-associated virus and Mourilyan virus during mixed infections of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Gen. Virol.*, **92**, 893–901.
- SANCHEZ-BARAJAS M., LINAN-CABELLO M.A. & MENA-HERRERA A. (2009). Detection of yellow-head disease in intensive freshwater production systems of *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.*, **17**, 101–112.
- SPANN K.M., COWLEY J.A., WALKER P.J. & LESTER R.J.G. (1997). A yellow-head-like virus from *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis. Aquat. Org.*, **31**, 169–179.
- TANG K.F.J. & LIGHTNER D.V. (1999). A yellow head virus gene probe: nucleotide sequence and application for *in situ* hybridization. *Dis. Aquat. Org.*, **35**, 165–173.
- TANG K.F.J., SPANN K.M., OWENS L. & LIGHTNER D.V. (2002). *In situ* detection of Australian gill-associated virus with a yellow head virus gene probe. *Aquaculture*, **205**, 1–5.
- WALKER P.J., COWLEY J.A. SPANN K.M., HODGSON R.A.J. HALL M.R & WITHYACHUMNARNKUL B. (2001). Yellow head complex viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific Region. *In: The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001*, Browdy C.L. & Jory D.E., eds. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA, 292–302.
-

Walker P.J. & Sittidilokratna N. (2008). Yellow Head Virus. *In: Encyclopedia of Virology*, third edition. Academic Press, 476–483.
<https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00779-2>

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

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

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

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

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

*
* *

NB: There is a WOA Reference Laboratory for infection with yellow head virus genotype 1
(please consult the WOA web site:

<https://www.woah.org/en/what-we-offer/expertise-network/reference-laboratories/#ui-id-3>).

Please contact the WOA Reference Laboratories for any further information on
infection with yellow head virus genotype 1

NB: FIRST ADOPTED IN 1995 AS YELLOWHEAD DISEASE. MOST RECENT UPDATES ADOPTED IN 2019.

CHAPTER 2.4.5.

INFECTION WITH *PERKINSUS MARINUS*

[...]

2.2. Host factors

2.2.1. Susceptible host species

~~Eastern oyster, *Crassostrea virginica*; Pacific oyster, *C. gigas*; suminoe oyster, *C. ariakensis*; mangrove oyster, *C. rhizophorae*; Cortez oyster, *C. corteziensis* (Andrews 1996; Calvo *et al.*, 1999; Calvo *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2004; Cáceres Martínez *et al.*, 2008); softshell clam, *Mya arenaria*; Baltic macoma, *Macoma balthica* (Dungan *et al.*, 2007).~~

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *Perkinsus marinus* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: American cupped oyster (*Crassostrea virginica*), Ariake cupped oyster (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *ariakensis*), Cortez oyster (*Crassostrea corteziensis*) and palmate oyster (*Saccostrea palmula*).

2.2.2. ~~Susceptible stages of the host~~ Species with incomplete evidence for susceptibility

~~All stages after settlement are susceptible.~~

Species for which there is incomplete evidence to fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *P. marinus* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: Gasar cupped oyster (*Crassostrea tulipa*), mangrove cupped oyster (*Crassostrea rhizophorae*), and Pacific cupped oyster (*Magallana* [Syn. *Crassostrea*] *gigas*).

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have been reported in the following species, but no active infection has been demonstrated: Columbia black oyster (*Crassostrea columbiensis*), soft shell clam (*Mya arenaria*), and stone oyster (*Striostrea prismatica*).

[...]

Procédure de l'OMSA pour l'enregistrement des kits de diagnostic Résumé des études de validation

Nom du kit de diagnostic : Innocreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit (Kit de test rapide Innocreate Bioscience WSSV RP)

Fabricant : Innocreate Bioscience Co., Ltd.

Procédure / Numéro d'approbation : 082132

Date d'enregistrement : mai 2023

Maladie : infection par le virus du syndrome des points blancs chez les crevettes

Agent pathogène : Whispovirus, virus du syndrome des points blancs

Type d'épreuve : Test immunochromatographique à flux latéral

Objectif du test :

Le kit de test rapide WSSV RP d'Innocreate Bioscience est un kit de détection qualitative de l'infection par le virus du syndrome des points blancs chez les crevettes. Le dispositif d'immunodosage à flux latéral est conçu pour les objectifs suivants :

4. effectuer un diagnostic de confirmation des cas cliniques sur le terrain (qui comprend la confirmation des suspicions de cas et d'une épreuve de dépistage positive) ;
5. estimer la prévalence de l'infection, de manière à faciliter l'analyse des risques dans les élevages de crevettes de systèmes de production afin d'aider aux pratiques de gestion (le kit ne doit pas être utilisé pour estimer la prévalence chez les reproducteurs ou les crevettes post-larvaires dans le cadre d'une analyse des risques avant le transfert vers d'autres élevages ou un déplacement transfrontalier).
6. être utilisé en conjonction avec d'autres tests ou procédures de diagnostic comme aide au diagnostic ou pour d'autres évaluations cliniques ou épidémiologiques.

Espèces et échantillons : 2 ou 3 petits fragments de branchie de crevette.

3. Informations relatives au kit

Veuillez-vous référer à la notice du kit qui est disponible sur la page web du registre de l'OMSA ou contacter le fabricant sur le site web ou à l'adresse suivante :

Site web : <https://www.innocreatebio.com/>

Courriel : info@innocreatebio.com

4. Résumé des études de validation

Spécificité analytique

Conclusion :

Des crevettes infectées par le *Vibrio parahaemolyticus* responsable de la maladie de nécrose hépatopancréatique aiguë, le virus de la nécrose hypodermique et hématopoiétique infectieuse, Infection à *Enterocytozoon hepatopenaei*, le baculovirus Monodon, le virus de la tête jaune et le virus du syndrome de Taura ont été testées. Les résultats de tous les échantillons infectés ont été négatifs.

Sensibilité analytique

Conclusion :

Une dilution en série de la protéine cible recombinante du virus du syndrome des points blancs avec des tissus homogénéisés de crevettes a été utilisée afin d'évaluer la limite de détection. Ladite limite a été estimée à 0,4 ng / test.

Répétabilité

Conclusion :

La répétabilité intra-série a été évaluée en utilisant six échantillons en quatre exemplaires, présentant différents niveaux d'infection, qui ont été testés par le même opérateur lors de cinq jours différents. La répétabilité inter-séries a été évaluée en procédant à une analyse des six échantillons, effectuée par trois opérateurs différents utilisant trois lots différents de kits, sur cinq jours. Les résultats des épreuves intra et inter-séries se sont révélés reproductibles avec des valeurs du coefficient kappa de 1,0.

Caractéristiques diagnostiques

Détermination du seuil et estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD) :

Détermination du seuil :

Le kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience est un test immunochromatographique conçu pour la détection qualitative de l'infection par le virus du syndrome des points blancs chez les crevettes. Une bande rose violet doit être observée à la fois au niveau de la ligne de test (T) et de la ligne de contrôle (C) pour révéler que la crevette était infectée par le virus du syndrome des points blancs. Si la bande rose violet n'apparaît que sur la ligne de contrôle (C), ce résultat indique qu'il n'y a pas d'infection par le virus du syndrome des points blancs ou que l'infection est légère et en deçà du seuil de sensibilité du kit. Le seuil est déterminé d'après la sensibilité analytique comme étant de 0,4 ng de la protéine cible.

Estimations de la sensibilité diagnostique (SeD) et de la spécificité diagnostique (SpD) :

3. Estimations de la sensibilité diagnostique et de la spécificité diagnostique - avec des animaux de référence donnés

Deux cent cinquante-deux crevettes indemnes d'agents pathogènes spécifiques ont été soit utilisées comme témoins négatifs (n=105), soit soumises à un test de provocation (n=147) consistant en une injection de 100 µl d'hémolymphe infectée par le virus du syndrome des points blancs, afin de déterminer la sensibilité diagnostique et la spécificité diagnostique pour des échantillons prélevés chez des animaux de référence donnés. Sur les 147 échantillons prélevés chez les animaux soumis à l'épreuve de provocation et positifs avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Durand & Lightner, 2002), les résultats avec le kit de test rapide WSSV RP ont été positifs pour 125 échantillons, tandis que 22 échantillons ont constitué des faux négatifs. Le niveau d'infection de ces 22 échantillons a été considéré comme très léger (nombre de cycle - Ct > 32,5). Parmi les 105 échantillons provenant des animaux témoins n'ayant pas été soumis à un test de provocation et négatifs avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan, aucun résultat faux positif n'a été observé.

Animal de référence :

Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit		Espèce cible / Échantillon : branchie	
		Méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan®	
		Ct < 32,5 est considéré comme positif	Ct < 40 est considéré comme positif
Sensibilité diagnostique	N SeD	(126) (99,21 %)	(147) (85,03 %)

	IC	(99,66 % - 99,98 %)	(78,22 % - 90,38 %)
Spécificité diagnostique	N	(105)	(105)
	SpD	(100 %)	(100 %)
	IC	(96,55-100 %)	(96,55-100 %)

4. Estimations de la sensibilité diagnostique et de la spécificité diagnostique – avec des crevettes de production :

Un total de 465 crevettes issues de 4 lots de systèmes de production a été testé, dont 45 des 465 crevettes ont été classées comme symptomatiques, et 64 des 465 crevettes ont été classées comme positives (Ct < 40) lors du dépistage par qPCR avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Durand & Lightner, 2002).

Par rapport à la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan, la SeD globale du test rapide WSSV RP a été de 92,50 % lorsqu'un Ct < 32,50 était considéré comme positif, de 84,00 % lorsqu'un Ct < 36 était considéré comme positif, ou de 65,62 % lorsqu'un Ct < 40 était considéré comme positif ; la SpD a été de 100 %.

S'agissant de la performance diagnostique chez les crevettes symptomatiques élevées dans des systèmes de production, la SeD a été de 93,33 %, et la SpD de 100 % lorsqu'un Ct < 40 était retenu comme seuil. La valeur prédictive positive (VPP) et la valeur prédictive négative (VPN) ont été de 100 % et 99,3 %. Dans le cas des échantillons pour lesquels le Ct était inférieur à 32,5 (infection modérée à élevée, ≥ 100 copies), la SeD a été de 92,50 %. La concordance globale entre le kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience et le diagnostic est élevée.

Crevettes de production :

Inncreate Bioscience WSSV RP Rapid Test Kit	Espèce cible / Échantillon : branchie				
	Méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan				
	Symptomatique	Ct < 32,5 est considéré comme positif	Ct < 36 est considéré comme positif	Ct < 40 est considéré comme positif	
Sensibilité diagnostique	N	(45)	(40)	(50)	(64)
	SeD	(93,33 %)	(92,50 %)	(84,00 %)	(65,62 %)
	IC	(95,66 %-99,98 %)	(79,61 %-98,43 %)	(95,66 %-99,98 %)	(52,70 %-77,05 %)
Spécificité diagnostique	N	(420)	(425)	(415)	(401)
	SpD	(100 %)	(100 %)	(100 %)	(100 %)
	IC	(99,13 %-100 %)	(99,14 %-100 %)	(70,89 %-92,83 %)	(99,08 %-100 %)

Conclusion :

Le kit de test rapide WSSV RP est apte à l'emploi pour lequel il est prévu, et démontre une sensibilité globale élevée pour l'identification des niveaux modérés et élevés de l'infection par le virus du syndrome des points blancs, ou lorsqu'il est employé pour des échantillons provenant de crevettes manifestant des signes cliniques, et ce test présente une spécificité très élevée. Les VPP et VPN élevées du test et le court délai de réalisation (15-30 minutes sur place vs plus de 4 heures auxquelles s'ajoute le délai d'expédition) en font un outil robuste pour l'identification des foyers potentiels.

Nous recommandons aux utilisateurs de mettre le test en œuvre chez les crevettes qui présentent des modifications du comportement (léthargie, diminution ou absence de consommation d'aliments pour animaux, et comportements natatoires anormaux tels qu'une nage lente, sur le côté, près de la surface de l'eau, ou des regroupements autour des bords des unités d'élevage), soit sur une base régulière, soit lors d'un stress

environnemental, tel que des modifications rapides de la salinité, ou lors de suspicion d'un foyer d'infection par le virus du syndrome des points blancs.

Reproductibilité

Reproductibilité analytique

Conclusion :

Deux laboratoires ont procédé à l'évaluation de la reproductibilité analytique. Six échantillons dans lesquels les niveaux d'infection étaient variés (deux avec une infection légère, deux avec une infection modérée, un avec une infection forte et un indemne d'infection), comme établis avec la méthode de l'OMSA par PCR en temps réel utilisant des sondes TaqMan (Durand & Lightner, 2002), ont été sélectionnés et soumis « en aveugle » aux deux laboratoires. Les tests ont été répétés à quatre reprises et une valeur du coefficient Kappa a été calculée à partir des résultats de l'ensemble des 24 tests. Pour l'ensemble des tests, aucune erreur de classification n'a été observée (20 résultats positifs et 4 résultats négatifs) La concordance entre les deux méthodes était de 100 %, et le coefficient Kappa de 1,0.

Reproductibilité diagnostique

Cinq laboratoires de Taïwan et de Thaïlande, comprenant un laboratoire de référence de l'OMSA, ont procédé à l'évaluation de la reproductibilité diagnostique. Le panel de tests était constitué de 25 échantillons pour lesquels les niveaux d'infection virale étaient variés, comprenant 5 échantillons dont les caractéristiques étaient connues (3 positifs avec des concentrations de protéines cibles de 1,6 ; 0,8 ou 0,4 ng et 2 négatifs) et 20 échantillons inconnus, traités « à l'aveugle ». Les laboratoires impliqués ont suivi les procédures décrites dans le manuel d'instructions du kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience.

Conclusion :

Les échantillons ont été analysés par chacun des cinq laboratoires en utilisant le kit de test rapide WSSV RP d'Inncreate Bioscience. Les résultats montrent que la reproductibilité est élevée. La concordance observée dans les cinq laboratoires a été de 100 % pour les cinq échantillons dont les caractéristiques étaient connues. Quatre des cinq laboratoires ont obtenu une concordance de 100 % pour tous les échantillons analysés « à l'aveugle », tandis que les résultats du cinquième laboratoire présentaient une légère divergence pour un échantillon. Un test du khi-deux d'homogénéité a été effectué afin d'analyser les résultats expérimentaux des cinq laboratoires. La valeur p du test du khi-deux d'indépendance est de 0,998 (Hsu *et al.*, 2022).

Références

- Durand, S., & Lightner, D. V. (2002). Quantitative real time PCR for the measurement of white spot syndrome virus in shrimp. *Journal of Fish Diseases*, 25(7), 381-389.
- Hsu, J. C.-K., Hsu, T.-K., Kannan, J., Wang, H.-C., Tassanakajon, A., & Chen, L.-L. (2022). Diagnostic performance of a Rapid Test Kit for white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture*, 558, 738379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738379>