



**RAPPORT DE LA RÉUNION DE LA COMMISSION DES NORMES SANITAIRES  
POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE**  
**Paris, 17 - 24 février 2021**

**PARTIE A - Textes proposés à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale en mai 2021**

La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE (la Commission des animaux aquatiques) s'est réunie par voie électronique du 17 au 24 février 2021. La liste des participants est présentée en [Annexe 1](#).

Compte tenu de la pandémie actuelle de COVID-19, la 88<sup>e</sup> Session générale annuelle de l'Assemblée mondiale des Délégués se tiendra de manière virtuelle, du lundi 24 au vendredi 28 mai 2021. Lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, des chapitres consacrés aux normes internationales de l'OIE, nouveaux et révisés (le *Code sanitaire pour les animaux aquatiques*, le *Code sanitaire pour les animaux terrestres*, le *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques* et le *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres*) seront proposés pour adoption.

Pour faciliter ce processus, le rapport de la réunion de février 2021 de la Commission des animaux aquatiques sera publié en deux parties : la partie A (ci-jointe) contient les informations ayant trait aux textes nouveaux et révisés destinés au *Code aquatique* et au *Manuel aquatique*, qui seront proposés pour adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale ; et la Partie B (qui sera publiée en avril 2021) présentera les informations relatives aux autres sujets ayant fait l'objet de discussions lors de la réunion de février 2021 de la Commission, qui comprennent les textes diffusés afin de recueillir les commentaires et pour information.

Dans le cadre de la préparation de la 88<sup>e</sup> Session générale virtuelle, l'OIE organisera une série de webinaires d'information afin de veiller à ce que les Membres soient conscients du contexte et des aspects essentiels des normes qui seront proposées pour adoption. La participation à ces webinaires se fera uniquement sur invitation. Veuillez prendre note que les Délégués recevront sous peu des informations détaillées relatives à la 88<sup>e</sup> Session générale virtuelle, et en particulier sur le processus pour l'adoption des normes.

La Commission des animaux aquatiques a remercié les Membres suivants de lui avoir adressé des commentaires écrits sur les projets de textes destinés au *Code sanitaire pour les animaux aquatiques* (le *Code aquatique*) et au *Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques* (le *Manuel aquatique*) et diffusés dans son rapport de septembre 2020 : l'Arménie, l'Australie, le Canada, le Chili, la République populaire de Chine, le Taipei chinois, Cuba, le Japon, la République de Corée, le Libéria, le Mexique, la Nouvelle-Calédonie, la Nouvelle-Zélande, Singapour, la Suisse, la Thaïlande, le Royaume-Uni (RU), les États-Unis d'Amérique, les Membres de la Commission régionale de l'OIE pour les Amériques, les États membres de l'Union européenne (UE) et le Bureau interafricain des ressources animales de l'Union africaine (UA-BIRA), au nom des Membres africains de l'OIE. La Commission a également souhaité remercier les nombreux experts du réseau scientifique de l'OIE pour leurs précieux conseils et contributions.

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

La Commission encourage les Membres à examiner les informations pertinentes figurant dans ses précédents rapports et dans ceux des Groupes *ad hoc* lors de l'élaboration de leurs commentaires, en particulier sur des questions anciennes non résolues. Ces rapports sont accessibles sur le site [internet de l'OIE](#).

Le tableau ci-dessous répertorie les points à l'ordre du jour ainsi que les liens hypertextes permettant d'y accéder directement dans le corps du présent rapport. Les Membres doivent prendre note que les textes présentés en **Annexes 2 à 16** seront proposés à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

## Ordre du jour

<b>1. ACCUEIL PAR LE DIRECTEUR GENERAL ADJOINT</b>	<b>3</b>	
<b>2. REUNION AVEC LA DIRECTRICE GENERALE</b>	<b>3</b>	
<b>3. LE CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE</b>	<b>3</b>	
3.1. TEXTES QUI SERONT PROPOSES A L'ADOPTION EN MAI 2021	3	
3.1.1. Definitions du glossaire	3	<a href="#">Annexe 2</a>
3.1.1.1.« Dechets issus d'animaux aquatiques » et « Produits issus d'animaux aquatiques »	3	
3.1.1.2. « Vecteur »	4	
3.1.2. Nouveau projet de chapitre sur la securite biologique dans les etablissements d'aquaculture (chapitre 4.X)	5	<a href="#">Annexe 3</a>
3.1.3. Article 1.3.3 relatif aux maladies des crustaces listees par l'OIE du chapitre 1.3	9	<a href="#">Annexe 4</a>
3.1.4. Modele d'article 10.x.13 destine aux Chapitres 10.5, 10.6 et 10.10 specifiques aux maladies des poissons (et modele d'article 10.4.17 destine au chapitre 10.4)	10	<a href="#">Annexe 5</a>
3.1.5. Article 10.9.2. du Chapitre 10.9. « Infection par le virus de la viremie printaniere de la carpe »	10	<a href="#">Annexe 6</a>
3.1.6. Article 10.10.2 du Chapitre 10.10 « Infection par le virus de la septicemie hemorragique virale »	11	<a href="#">Annexe 7</a>
3.1.7. Articles 11.3.1 et 11.3.2 du Chapitre 11.3 « Infection a <i>Bonamia ostreae</i> »	12	<a href="#">Annexe 8</a>
<b>4. LE MANUEL DES TESTS DE DIAGNOSTIC POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES DE L'OIE</b>	<b>13</b>	
4.1. Textes proposes a l'adoption en mai 2021	13	
4.1.1. Revision de la liste des especes non sensibles	13	
4.1.2. Chapitre 2.3.3 « Infection with <i>Gyrodactylus salaris</i> »	14	<a href="#">Annexe 9</a>
4.1.3. Chapitre 2.3.6 « Infection with salmonid alphavirus »	15	<a href="#">Annexe 10</a>
4.1.4. Chapitre 2.3.0 « General information » (maladies des poissons)	16	<a href="#">Annexe 11</a>
4.1.5. Sections 2.2.1 et 2.2.2 (sur les especes sensibles) du Chapitre 2.4.3 « Infection with <i>Bonamia ostreae</i> »	18	<a href="#">Annexe 12</a>
4.1.6. Nouveau projet de Chapitre 2.1.x. « Infection with <i>Batrachochytrium salamandrivorans</i> »	18	<a href="#">Annexe 13</a>
4.1.7. Chapitre 2.3.9 « Infection with spring viraemia of carp virus »	19	<a href="#">Annexe 14</a>
4.1.8. Chapitre 2.3.4 « Infection with infectious haematopoietic necrosis virus »	20	<a href="#">Annexe 15</a>
4.1.9. Chapitre 2.3.10 « Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus »	21	<a href="#">Annexe 16</a>

## 1. Accueil par le Directeur général adjoint

La docteure Gillian Mylrea, Cheffe du Service des normes, a accueilli, au nom du Directeur général adjoint, le docteur Matthew Stone, les membres de la Commission des animaux aquatiques auxquels elle a rappelé que cette réunion était la dernière de leur mandat de trois ans. La Commission est demeurée très active en dépit des difficultés importantes qu'elle a rencontrées. L'OIE reconnaît avoir abondamment sollicité les Commissions spécialisées pendant la pandémie de COVID-19. Celles-ci y ont répondu de façon constructive et innovante, dans le respect de l'excellence scientifique qui est la leur. La docteure Mylrea a remercié les Membres de la Commission, ainsi que leurs institutions et gouvernements, pour leur contribution durant leur mandat, y compris la présente réunion. La docteure Mylrea a ensuite informé les membres des progrès réalisés dans l'organisation de la Session générale de l'OIE, qui se tiendra de façon virtuelle. Elle a fait un point sur les travaux en cours concernant le système d'élaboration et de révision des normes de l'OIE, qui comporte notamment un volet sur le développement des procédures opérationnelles normalisées et la planification de la mise en œuvre des outils digitaux. Enfin, elle a donné un aperçu des actions de soutien mises en place par l'OIE pour répondre à la pandémie de COVID-19, en particulier l'implication des groupes *ad hoc*, le développement et la mise en œuvre du Cadre de l'OIE en faveur de la santé de la faune sauvage ainsi que les différents services prévus dans le cadre du document d'appui sur la résilience des Services vétérinaires.

Les membres de la Commission ont remercié la docteure Mylrea pour ce point d'actualité. Ils ont indiqué apprécier d'être tenus informés des travaux entrepris par l'organisation dans de nouveaux domaines.

## 2. Réunion avec la Directrice générale

La docteure Monique Éloit, Directrice générale de l'OIE, a rencontré les membres de la Commission le 23 février 2021. Elle a salué le travail réalisé par la Commission pendant les trois années de son mandat et a remercié ses membres pour leur soutien et leur engagement à la réalisation des objectifs fixés par l'OIE. Elle a souligné les efforts et la capacité d'adaptation de la Commission, qui, en dépit des difficultés engendrées par la pandémie de COVID-19, a permis que le processus d'élaboration des normes ne soit pas interrompu, en développant notamment des nouvelles façons de travailler. La docteure Éloit a fait un point sur les progrès accomplis dans la mise en œuvre du 7<sup>e</sup> Plan stratégique de l'OIE. Elle a souligné que ce plan mettait en avant certaines priorités comme la santé des animaux aquatiques et la santé de la faune sauvage ainsi que des mutations structurelles majeures en matière de transformation digitale et de gestion des données. La Directrice générale a précisé que ces transformations nécessitaient la mobilisation importante de ressources et qu'elles auraient également des conséquences sur la façon dont la Commission et son Secrétariat effectueraient certaines de leurs tâches.

La docteure Éloit a rappelé que l'idée de développer une Stratégie pour la santé des animaux aquatiques de l'OIE avait émergé lors de la Conférence mondiale sur la santé des animaux aquatiques, qui s'est tenue au Chili en avril 2019. Elle a remercié la Commission et le Secrétariat de l'OIE pour l'importance des efforts investis dans l'élaboration de cette stratégie et s'est réjouie de son prochain lancement, lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021. Elle a réaffirmé son soutien à cette stratégie ainsi qu'à son déploiement.

Les membres de la Commission ont remercié la docteure Éloit d'avoir pris le temps de venir à leur rencontre et ont salué l'excellent travail réalisé par le Secrétariat pour la préparation et le déroulement des réunions, et ce malgré les difficultés inhérentes à la tenue de visioconférences.

## 3. Le Code sanitaire pour les animaux aquatiques de l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a examiné les commentaires reçus sur les projets de textes nouveaux et révisés, destinés au *Code aquatique*, et qui avaient été adressés précédemment aux Membres pour avis. Les réponses de la Commission à ces commentaires sont présentées ci-dessous.

### 3.1. Textes qui seront proposés à l'adoption en mai 2021

La Commission des animaux aquatiques a remercié les Membres pour avoir identifié certains problèmes de traduction dans les versions espagnole et française de certaines annexes, adressées pour avis. Elle a indiqué avoir révisé et corrigé le texte en conséquence.

#### 3.1.1. Définitions du Glossaire

##### 3.1.1.1. « Déchets issus d'animaux aquatiques » et « Produits issus d'animaux aquatiques »

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, Cuba, la Suisse et l'UE.

## Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2019, la Commission des animaux aquatiques a proposé d'ajouter, dans le Glossaire, une nouvelle définition, celle du terme « déchets issus d'animaux aquatiques », car il est fréquemment utilisé dans le nouveau projet de chapitre 4.X « Sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture » ainsi que dans le chapitre 4.7 « Manipulation, élimination et traitement des déchets d'animaux aquatiques ».

Lors de sa réunion de février 2020, la Commission est convenue d'amender la définition du terme « produits issus d'animaux aquatiques » figurant dans le Glossaire et d'en garantir l'alignement avec la définition du nouveau terme « déchets issus d'animaux aquatiques ».

La Commission a indiqué qu'une fois que la définition du nouveau terme « déchets issus d'animaux aquatiques » aura été adoptée en vue de son inclusion dans le Glossaire, l'actuelle définition de ce terme figurant à l'article 4.7.3 sera supprimée. En outre, à des fins de mise en cohérence avec cette nouvelle définition, le terme « déchets issus d'animaux aquatiques », indiqué en italique, remplacera, le cas échéant, le terme « déchets » dans l'ensemble des chapitres concernés du *Code aquatique*.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2019 (point 6.7, page 9) ; rapport de février 2020 (point 7.1.6, page 14) ; rapport de septembre 2020 (point 4.5.1, page 8).

### Réunion de février 2021

La Commission a examiné les commentaires reçus, et est convenue de n'apporter aucune modification supplémentaire aux définitions des termes « déchets issus d'animaux aquatiques » et « produits issus d'animaux aquatiques ».

En réponse à une proposition de remplacer le terme « fluides » par le terme « produits biologiques », la Commission a expliqué que les déchets générés au cours de la transformation incluaient le plus souvent de l'eau, qui est couverte par le terme « liquides ». En outre, l'emploi du terme « produits biologiques » tel que figurant dans le Glossaire, n'est pas pertinent au regard de la référence faite, dans la définition, à l'expression « destinés à être éliminés ». La Commission a également précisé que la proposition d'ajouter le terme « boue » n'était pas appropriée car elle élargissait le champ d'application de la définition aux fomites.

Les propositions d'amendements à apporter aux chapitres du *Code aquatique* suite à l'adoption de la nouvelle définition du terme « déchets issus d'animaux aquatiques » sont présentées en **Annexe 2**.

Aucun commentaire additionnel n'a été formulé sur la définition du terme « produits issus d'animaux aquatiques ».

La nouvelle définition du terme « Déchets issus d'animaux aquatiques » et la version révisée du terme « Produits issus d'animaux aquatiques », tous deux destinés au Glossaire, est présentée aux Membres en **Annexe 2**. Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

### 3.1.1.2. « Vecteur »

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, Cuba, la Suisse, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

## Contexte

Lors de ses réunions de février et septembre 2020, la Commission des animaux aquatiques a amendé la définition du terme « Vecteur » figurant dans le Glossaire afin de préciser clairement que les vecteurs associés à un agent pathogène spécifique ne pouvaient pas être inclus dans la liste des espèces y étant sensibles. La Commission a également clarifié le fait qu'un organisme ne pouvait être considéré comme un vecteur que si sa capacité à transférer l'agent pathogène aux espèces sensibles était démontrée.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2020 (point 7.2.1, page 15) ; rapport de septembre 2020 (point 4.5.2, page 8).

## Réunion de février 2021

La Commission a accepté la proposition de supprimer « une population d' » de la définition et de faire apparaître la référence à l'agent pathogène dans la seconde phrase, afin d'améliorer la lisibilité. Elle a également accepté de remplacer « transférait » par « transmettait » à des fins d'harmonisation avec d'autres textes du *Code aquatique* ainsi que pour établir une distinction entre vecteurs et fomites.

La Commission n'a pas accepté la proposition de différencier les espèces non sensibles des vecteurs car elle a considéré que les vecteurs constituaient une sous-catégorie des espèces non sensibles.

La version révisée de la définition du terme « Vecteur » figurant dans le Glossaire est présentée aux Membres en [Annexe 2](#) (versions avec et sans marques de révision). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

### 3.1.2. Nouveau projet de chapitre sur la sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture (chapitre 4.X)

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, l'Australie, le Canada, le Chili, la République populaire de Chine, Cuba, la République de Corée, le Libéria, le Mexique, la Nouvelle-Calédonie, la Nouvelle-Zélande, la Suisse, le RU, les États-Unis d'Amérique, l'UE, les Membres de la Commission régionale de l'OIE pour les Amériques et l'UA-BIRA.

#### *Contexte*

Le nouveau projet de chapitre sur la sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture (chapitre 4.X) est le deuxième des nouveaux chapitres dont l'élaboration s'inscrit dans le cadre de la restructuration planifiée du Titre 4 « Prévention et contrôle des maladies ».

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2018 (point 2.9, page 11) ; rapport de février 2019 (point 2.1, page 10) ; rapport de septembre 2019 (point 6.1, page 4) ; rapport de février 2020 (point 7.1.1, page 6) ; rapport de septembre 2020 (point 4.1, page 3).

## Réunion de février 2021

### Commentaires d'ordre général

En réponse à un commentaire concernant le champ d'application de ce chapitre, la Commission des animaux aquatiques a rappelé qu'il avait pour objectif de fournir des recommandations sur la sécurité biologique à l'échelle des établissements d'aquaculture, et que cet objectif avait déjà été validé par les Membres. La planification de la sécurité biologique à plus grande échelle, comme à l'échelle nationale, n'est pas couverte par le champ d'application. Toutefois, la Commission a pris acte de l'importance de la sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture dans l'élaboration des dispositifs nationaux de sécurité biologique.

La Commission a approuvé le commentaire selon lequel il serait bénéfique pour les Membres de disposer de plus d'orientations sur la mise en place des mesures de sécurité biologique. Elle a toutefois estimé qu'il ne serait pas approprié d'inclure ce type d'informations dans ce chapitre, destiné à devenir une norme du *Code aquatique*. La Commission a indiqué que la proposition d'élaboration d'orientations supplémentaires devra être examinée lors de l'établissement des priorités du programme de travail de la prochaine Commission. La Commission a également signalé que des travaux de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) étaient en cours sur la sécurité biologique appliquée aux animaux aquatiques. Elle a ajouté que la FAO avait invité l'OIE à participer à cette initiative.

#### Article 4.X.1 Objectif

La Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter « ou seraient déjà présents » après « dans le cas où ils s'y seraient introduits », car elle a estimé que le texte tel que rédigé était clair et que tous les agents pathogènes déjà présents seraient également soumis aux mesures d'atténuation du risque de propagation.

#### Article 4.X.2 Champ d'application

La Commission a accepté d'ajouter « la gestion de zones partagées » dans la dernière phrase, afin d'en assurer la cohérence avec l'article 4.X.5 bis ajouté précédemment.

### **Article 4.X.3 Introduction**

La Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter une phrase décrivant les relations entre la sécurité biologique et les pratiques d'élevage. Elle a en effet considéré que le texte additionnel n'était pas en adéquation avec la définition du terme « sécurité biologique » figurant dans le *Code aquatique* et qu'il relevait plutôt des activités générales de gestion sanitaire.

### **Article 4.X.4 Principes généraux**

Dans le premier paragraphe, la Commission n'a pas accepté la proposition d'inclure « mesures de sécurité biologique » pour atténuer les risques associés aux rejets des établissements d'aquaculture car elle a considéré que l'objet principal de cet article était la réduction du risque d'introduction d'un agent pathogène au sein d'un établissement hébergeant des populations d'animaux aquatiques et non les rejets de cet établissement.

Dans la première phrase, la Commission n'a pas accepté d'insérer « et à partir » avant « d'un établissement d'aquaculture », considérant que cet ajout était redondant au regard du contexte de cette phrase. La notion de sécurité biologique étendue à la prévention de l'introduction, de la propagation ou de la dissémination d'agents pathogènes au sein ou par les établissements d'aquaculture est mise en avant dans l'ensemble du chapitre.

Dans la deuxième phrase du premier paragraphe, la Commission n'a pas accepté d'insérer un texte insistant sur l'importance des mesures de sécurité biologique dans la réduction des risques identifiés à un niveau acceptable et permettant d'atteindre les objectifs principaux de la sécurité biologique. La Commission a considéré que cela était implicite dans la rédaction actuelle.

Dans la deuxième phrase du premier paragraphe, la Commission n'a pas accepté de remplacer « La planification » par « La formation » car elle a considéré que l'objectif de la phrase était d'indiquer que la planification était un préalable à la mise en œuvre de la sécurité biologique.

Dans la troisième phrase du premier paragraphe, la Commission n'a pas accepté d'ajouter « les caractéristiques des agents pathogènes » à la suite de « la probabilité d'exposition aux agents pathogènes ». Elle a considéré que cela était déjà couvert par la probabilité d'exposition aux agents pathogènes.

Au point 6, la Commission n'a pas accepté d'ajouter « intoxication », « malnutrition » et « autres mortalités inhabituelles » comme exemples d'éléments déclencheurs de révisions *ad hoc*. Elle a estimé que ce type d'événements n'était aucunement associé aux agents pathogènes infectieux et qu'ils étaient par ailleurs en dehors du champ d'application du *Code aquatique*.

### **Article 4.X.5 Catégories de systèmes de production aquacole**

Dans le paragraphe relatif aux systèmes semi-ouverts, la Commission a accepté la proposition d'ajouter « ou les cages » comme exemple additionnel d'enclos, afin de mieux prendre en compte les différents types d'infrastructure aquacole utilisés dans les systèmes semi-ouverts ainsi que la terminologie la plus répandue dans le monde. Elle est convenue, le cas échéant, de procéder à cette modification dans l'ensemble du chapitre. La Commission a également décidé d'ajouter « ou les systèmes de cordes » comme exemple d'infrastructure dans les systèmes de production de mollusques.

Dans le paragraphe relatif aux systèmes semi-clos, la Commission a accepté la proposition de remplacer « les cages flottantes couvertes » par « les enclos flottants » car elle a estimé que le terme décrivait de façon plus précise ce type de système de production.

### **Article 4.X.6 Voies de transmission et mesures d'atténuation**

#### **1. Animaux aquatiques**

Dans le second paragraphe, en réponse à plusieurs propositions, la Commission a accepté d'ajouter « les larves » comme autre exemple d'étape du cycle des animaux aquatiques. Elle a considéré que ce terme couvrait les autres propositions d'exemples d'étapes de cycle. La Commission a rappelé aux Membres qu'il n'était pas nécessaire d'identifier les animaux aquatiques selon leur origine, c'est-à-dire élevage ou sauvage, car la définition d'« animaux aquatiques » figurant dans le Glossaire incluait les deux.

Au point a), la Commission n'a pas accepté d'ajouter une phrase concernant l'introduction de populations naïves dans des zones où les agents pathogènes spécifiques sont présents car elle a considéré que ce sujet relevait du paragraphe sur l'évaluation du risque.

Au point f), la Commission a accepté d'ajouter « lorsque cette opération est possible » avant « isoler » afin de rendre l'application de cette recommandation un peu plus souple. En effet, l'isolement des populations d'animaux aquatiques n'est pas réalisable dans tous les systèmes d'élevage, et notamment dans les systèmes ouverts et semi-ouverts.

Au point g), la Commission n'a pas accepté de remplacer le terme « moribond » par le terme « malade » car elle a jugé que l'objectif du retrait des animaux moribonds ou morts était de diminuer le nombre de sources de contamination auxquelles était exposée la population. Les animaux malades peuvent potentiellement faire l'objet d'un traitement qui les guérit de leur infection, ce qui rend inutile leur retrait de la population.

Au point h), la Commission a refusé la proposition d'insérer « toutes les » avant « maladies des animaux aquatiques à déclaration obligatoire » car une seule maladie doit faire l'objet d'une notification pour un épisode de mortalités. La Commission a également inséré « ou émergente » afin d'insister sur l'importance de la notification des maladies émergentes.

Au point i), la Commission a accepté de remplacer « au dépeuplement total » par « au retrait des animaux aquatiques de l'ensemble ou d'une partie ». Elle a estimé que le dépeuplement était un terme généralement utilisé dans le cas d'une réponse à un événement sanitaire mais que ce n'était pas la seule façon de retirer des animaux d'un établissement : par exemple, les animaux pouvaient être vendus ou déplacés dans une autre partie de l'établissement.

## 2. Les produits issus d'animaux aquatiques et déchets issus d'animaux aquatiques

Dans le second paragraphe, la Commission n'a pas accepté la proposition d'insérer une nouvelle première phrase indiquant que les déchets issus d'animaux aquatiques devaient être entreposés, transportés, éliminés et traités conformément aux orientations figurant dans le chapitre 4.7 « Manipulation, élimination et traitement des déchets d'animaux aquatiques ». Elle a rappelé que ce point était traité dans un autre paragraphe du chapitre.

Dans le deuxième paragraphe, la Commission n'a pas accepté d'amender la deuxième phrase en vue d'interdire les mouvements de déchets d'animaux aquatiques ou les mouvements de déchets d'animaux aquatiques présentant un risque élevé au sein de l'établissement. Elle a pris en compte la complexité des systèmes aquacoles au niveau mondial ainsi que le fait que certains établissements d'aquaculture ne disposant pas d'installations dédiées à l'élimination, pouvaient avoir recours aux installations sécurisées d'autres établissements. La Commission a toutefois accepté de supprimer « Dans la mesure du possible », afin de renforcer et clarifier l'affirmation selon laquelle les mouvements des déchets issus d'animaux aquatiques au sein des établissements devaient être évités.

## 3. L'eau

Dans le premier paragraphe, la Commission a accepté la proposition de simplifier la formulation en supprimant « Si l'eau est un atout majeur pour la productivité et la santé des animaux aquatiques, cette dernière peut néanmoins ».

Dans le deuxième paragraphe, la Commission a indiqué être en désaccord avec le commentaire selon lequel le concept de système semi-clos n'était pas usité dans la littérature et que, par conséquent, il devait être supprimé. La Commission a rappelé aux Membres que ces catégories avaient été présentées à plusieurs reprises aux Membres pour avis et que, sur la base des commentaires reçus, cette approche avait fait consensus.

Au point b), la Commission n'a pas accepté d'insérer du texte pour inclure les traitements de l'eau sur site car elle a considéré que ce sujet était déjà couvert par le libellé actuel.

## 4. L'aliment pour animaux aquatiques

Dans le premier paragraphe, la Commission a remplacé, à des fins de clarification, le libellé indiquant que l'aliment pour animaux pouvait être initialement contaminé par un libellé précisant qu'il pouvait contenir des agents pathogènes.

La Commission a accepté la proposition d'ajout d'une nouvelle phrase à la fin du second paragraphe, afin de garantir que les risques de transmission d'agents pathogènes à l'environnement soient également pris en compte.

## 5. Les fomites

Dans le premier paragraphe, la Commission n'a pas accepté d'ajouter le terme « navires » dans la liste des fomites car la définition du terme « véhicule » figurant dans le Glossaire inclut les navires.

La Commission a rappelé qu'elle n'acceptait pas d'inclure, dans le Glossaire, une définition du terme « fomites » car elle a estimé que celle figurant habituellement dans le dictionnaire était suffisante. Elle a rappelé aux Membres que le Glossaire ne reprenait pas les définitions courantes du dictionnaire si celles-ci étaient jugées adéquates, ce qui est le cas pour la définition du terme « fomite ».

La Commission n'a pas accepté la proposition de remplacer le terme « risque » par le terme « probabilité » dans cet article. Elle a considéré que le terme « risque » avait été utilisé de façon appropriée dans le texte pour faire référence à la probabilité et les conséquences de l'introduction d'agents pathogènes.

Au point b), la Commission n'a pas accepté d'inclure des informations additionnelles sur la désinfection car elle a considéré que ce sujet était traité dans le chapitre 4.3, auquel il est d'ailleurs fait référence.

Au point c), la Commission a accepté la proposition d'inclure « ou à des zones au sein de cet établissement » car elle a estimé qu'elle permettait de prendre également en compte les zones, au sein d'un établissement d'aquaculture, présentant des statuts sanitaires différents, comme les unités de production destinées aux différentes étapes du cycle des animaux aquatiques.

## 6. Les vecteurs

La Commission a accepté la proposition de remplacer « transférer » par « transmettre » afin d'aligner le texte sur celui de la définition du terme « vecteur » figurant dans le Glossaire. En outre, « transmettre » est utilisé dans tout le chapitre. La Commission a procédé à cette modification dans l'ensemble du chapitre dès que cela s'avérait pertinent.

Au point a) ii), la Commission a accepté d'ajouter « pour les personnels autorisés et visiteurs » afin d'améliorer la clarté du texte.

Au point a) iii), la Commission n'a pas accepté la proposition de remplacer « les animaux aquatiques sauvages et d'autres animaux » par « vecteurs » car elle a estimé que les animaux aquatiques vivant hors du système de production pouvaient également être des espèces sensibles. Il ne serait pas tenu compte de ces animaux si seuls les vecteurs étaient inclus.

Au point a) iv), la Commission a accepté d'ajouter « extérieurs ou » afin d'inclure tous les types d'infrastructures des systèmes aquacoles nécessitant d'être couvertes pour prévenir l'introduction des oiseaux.

Au point b), la Commission n'a pas accepté d'inclure des considérations sur les normes alimentaires de sécurité sanitaire et les réglementations nationales relatives à la faune sauvage car elle a considéré que ces sujets n'entraient pas dans le champ d'application du chapitre.

La Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter un point additionnel sur les proies vivantes utilisées comme aliments, et qui sont susceptibles de jouer le rôle de vecteur. Elle a jugé que ce sujet était déjà couvert par le point 4 relatif à l'aliment pour animaux aquatiques.

### **Article 4.X.7 Analyse des risques**

La Commission n'a pas approuvé le commentaire selon lequel cet article imposait des restrictions quant aux différentes méthodes utilisables pour évaluer les risques. Elle a indiqué que le texte du deuxième paragraphe précisait que différentes approches pouvaient être choisies, en fonction de facteurs spécifiques à l'établissement d'aquaculture.

Dans le deuxième paragraphe du point intitulé « Étape 2 – L'appréciation du risque », la Commission a accepté la proposition d'introduire une référence au tableau 4. Dans la version anglaise, la Commission a également décidé de supprimer le terme « here » dans le tableau 1, afin d'harmoniser le contenu de ses différentes lignes.

La Commission n'a pas accepté la demande d'harmonisation des définitions présentées dans cet article avec celles figurant dans le livre intitulé « Handbook on Import Risk Analysis for Animals and Animal Products Vol. 1 – Introduction and Qualitative Risk Analysis ». Elle a indiqué que les définitions figurant dans ce chapitre avaient été élaborées spécifiquement pour les établissements d'aquaculture, et que ce n'était peut-être pas le cas pour les définitions du livre.



## Article 4.X.8 Élaboration du plan de sécurité biologique

### 2. Éléments essentiels du plan de sécurité biologique

La Commission a accepté la proposition de déplacer le nouveau point f) sur la formation du personnel afin qu'il devienne le point b). En outre, elle a décidé de transférer le dernier paragraphe du point a), traitant de la formation du personnel pour appliquer les procédures opérationnelles normalisées dans ce nouveau point b), considérant que cet agencement était plus logique.

S'agissant du point 2 d), la Commission était en accord avec un commentaire selon lequel le calcul de la morbidité et de la mortalité devait être réalisé selon plusieurs types de modalités au sein d'un élevage. Elle a donc inclus une phrase pour préciser que le suivi de ces deux paramètres devait être réalisé aussi bien à l'échelle de l'unité de production que celle de l'établissement.

Au point 2 e), la Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter « détection précoce » dans la deuxième phrase car elle a considéré que le suivi ne se limitait pas à la détection précoce.

La version révisée du nouveau projet de chapitre 4.X « Sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture » est présentée aux Membres en [Annexe 3](#) (versions avec et sans marques de révision). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

### 3.1.3. Article 1.3.3 relatif aux maladies des crustacés listées par l'OIE du chapitre 1.3

#### Inclusion de l'infection par le virus 1 iridescent des décapodes (DIV1) dans la liste des maladies de l'OIE

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, l'Australie, la République populaire de Chine, le Taipei chinois, Cuba, la République de Corée, la Nouvelle-Calédonie, la Suisse, le RU, les États-Unis d'Amérique, l'UE et les Membres de la Commission régionale de l'OIE pour les Amériques.

#### *Contexte*

Lors de sa réunion de février 2019, la Commission des animaux aquatiques a évalué l'infection par le virus iridescent des crevettes au regard des critères d'inclusion dans la liste des maladies de l'OIE figurant à l'article 1.2.2. Elle en a conclu que cette maladie devait être listée dans l'article 1.3.3 relatif aux maladies des crustacés listées par l'OIE. La Commission a également modifié le nom de la maladie, désormais désignée comme l'« infection par le virus 1 iridescent des décapodes (DIV1) », en adéquation avec la classification de l'agent pathogène dans la base de données du Comité international de taxonomie des virus (ICTV - International Committee of Taxonomy of Viruses).

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2019 (point 3.1.1, page 13) ; rapport de septembre 2019 (point 6.2, page 6) ; rapport de février 2020 (point 7.1.2, page 11) ; rapport de septembre 2020 (point 4.2, page 6).

#### **Réunion de février 2021**

La Commission a exprimé sa reconnaissance aux Membres pour lui avoir transmis des informations complémentaires concernant le DIV1. Elle a apporté des modifications mineures à l'évaluation de l'infection par le DIV1 afin que cette dernière tienne compte de l'information scientifique récemment publiée.

La Commission a pris note que les Membres étaient généralement favorables à l'inclusion de l'infection par le DIV1 dans la Liste des maladies de l'OIE. Elle a rappelé que l'objectif de cette Liste était de permettre aux Membres de prendre les mesures appropriées pour prévenir la propagation transfrontalière du DIV1, par la mise en œuvre transparente, en temps opportun et systématique de la procédure de notification.

En réponse à plusieurs commentaires concernant la disponibilité limitée des tests de diagnostic pour le DIV1, la Commission a décidé de discuter avec les experts de la possibilité de partager les matériaux de contrôle positifs avec les Membres.

La version actualisée de l'« Évaluation de l'infection par le virus iridescent des crevettes (DIV1) au regard des critères d'inclusion dans la Liste des maladies de l'OIE figurant au chapitre 1.3. du *Code aquatique* » est présentée aux Membres en [Annexe 4](#) à titre informatif.

La version révisée de l'article 1.3.3 « Liste des maladies des crustacés de l'OIE » est présentée aux Membres en [Annexe 4](#) (versions avec et sans marques de révision). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

### **3.1.4. Modèle d'article 10.X.13 destiné aux chapitres 10.5, 10.6 et 10.10 spécifiques aux maladies des poissons (et modèle d'article 10.4.17 destiné au chapitre 10.4)**

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, Cuba, la Suisse, le RU et l'UE.

#### *Contexte*

En réponse à des demandes de clarification de l'objectif du modèle d'article 10.X.13 « Importation d'œufs désinfectés destinés à l'aquaculture à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X] », destiné aux chapitres 10.5, 10.6 et 10.10 (et de l'article 10.4.17 destiné au chapitre 10.4), la Commission des animaux aquatiques a initié des travaux de révision lors de sa réunion de septembre 2019.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2019 (point 3.2, page 13) ; rapport de septembre 2019 (point 6.3, page 7) ; rapport de février 2020 (point 7.1.3, page 11) ; rapport de septembre 2020 (point 4.3, page 6).

#### **Réunion de février 2021**

Au point 1 a), la Commission a approuvé un commentaire indiquant que la référence aux recommandations du chapitre 4.4 « Recommandations pour la désinfection de surface des œufs de salmonidés » devait uniquement figurer au point 2 a), qui traite des mesures d'atténuation du risque de transfert d'un agent pathogène lors de l'importation d'œufs désinfectés. Elle a donc procédé au retrait de la référence au chapitre 4.4 au point 1 a). En outre, la Commission a accepté la proposition de supprimer le point 1 c), considérant qu'il ne faisait que reprendre l'information figurant au point 2.

La Commission a examiné une évaluation scientifique, transmise par un Membre, sur l'efficacité de protocoles de désinfection des œufs de flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*) pour inactiver le virus de la septicémie hémorragique virale et le virus de la nécrose pancréatique infectieuse. Après avoir discuté de cette évaluation, la Commission a conclu que les éléments de preuve justifiant l'inclusion d'un nouveau protocole de désinfection pour les œufs de flétan de l'Atlantique dans le chapitre 4.4 du *Code aquatique* étaient insuffisants à ce jour. Elle a rappelé aux Membres que des informations sur la désinfection des œufs de certaines espèces étaient disponibles dans des chapitres du *Manuel aquatique*. La Commission a invité les Membres à lui fournir toutes les informations complémentaires dont ils auraient connaissance sur les protocoles de désinfection des œufs pour les espèces autres que les salmonidés.

La Commission a rappelé aux Membres qu'une fois ce modèle d'article adopté, les modifications proposées seront apportées aux articles 10.5.13, 10.6.13, 10.10.13 et 10.4.17.

La version révisée du « Modèle d'article 10.X.13 destiné aux chapitres 10.5, 10.6 et 10.10 (et de l'article 10.4.17 destiné au chapitre 10.4) » est présentée aux Membres en [Annexe 5](#) (versions avec et sans marques de révision). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

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

#### *Contexte*

La version révisée de la liste des espèces sensibles figurant à l'article 10.9.2. du chapitre 10.9. « Infection par le virus de la virémie printanière de la carpe » a été adoptée lors de la 87<sup>e</sup> Session générale, en mai 2019. Toutefois, en raison de la disponibilité de nouveaux éléments de preuve scientifiques sur la sensibilité du poisson zèbre (*Danio rerio*) à l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe, la Commission des animaux aquatiques a procédé à une nouvelle évaluation de la sensibilité de cette espèce. Elle a conclu que le poisson zèbre satisfaisait aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles et, à ce titre, a proposé son inclusion dans l'article 10.9.2. Cette proposition d'inclusion a été transmise aux Membres dans le rapport de la Commission des animaux aquatiques de septembre 2019 afin qu'ils formulent leurs commentaires. Il a été noté, dans le rapport de la réunion de février 2020, que les membres étaient en faveur de l'inclusion du poisson zèbre dans la liste des espèces

*Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE / février 2021*

sensibles de l'article 10.9.2. Lors de sa réunion de septembre 2020, la Commission est convenue de différer l'examen de ce sujet à la réunion de février 2021.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2019 (point 6.5, page 8) ; rapport de février 2020 (point 7.14, page 12).

### **Réunion de février 2021**

La Commission a pris note qu'aucun commentaire n'avait été adressé par les Membres au sujet de l'annexe diffusée dans le rapport de février 2020 et qu'aucun amendement additionnel n'était nécessaire.

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 aux Membres en [Annexe 6](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **3.1.6. Article 10.10.2 du chapitre 10.10 « Infection par le virus de la septicémie hémorragique virale »**

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, Cuba, la République de Corée, la Suisse, le RU, l'UE et l'UA-BIRA.

##### *Contexte*

Lors de sa réunion de septembre 2019, la Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport du Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons aux maladies listées par l'OIE (de septembre 2019). Le Groupe *ad hoc* a évalué la sensibilité de certaines espèces à l'infection par le virus de la septicémie hémorragique virale en vue de leur inclusion dans la liste des espèces sensibles, en appliquant les critères d'inclusion figurant au chapitre 1.5 « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » du *Code aquatique*. La Commission est convenue d'amender la liste des espèces sensibles figurant à l'article 10.2.2, en ligne avec les recommandations formulées par le Groupe *ad hoc*. Le rapport du Groupe *ad hoc* est accessible sur <https://www.oie.int/fr/normes/commissions-specialisees-et-groupes-de-travail-ad-hoc/rapports-desgroupes-ad-hoc/>.

Lors de sa réunion de septembre 2020, la Commission a confirmé sa décision de ne pas faire figurer les génotypes du virus de la septicémie hémorragique virale dans l'article 10.10.2, car elle n'a pas évalué s'ils pouvaient être différenciés aux fins de l'adaptation des mesures de gestion du risque pour les marchandises commercialisées.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2019 (point 6.4, page 8) ; rapport de février 2020 (point 7.1.5, page 13) ; rapport de septembre 2020 (point 4.4, page 7).

### **Réunion de février 2021**

Plusieurs demandes ont été faites pour que soit réalisée une évaluation de la sensibilité aux génotypes du virus de la septicémie hémorragique virale, à l'instar de celle réalisée pour les différentes souches du virus de l'anémie infectieuse du saumon. La Commission est convenue de consulter les experts des Laboratoires de référence sur ce sujet avant de pouvoir examiner à nouveau le texte lors de sa réunion en septembre 2021. La Commission a fait remarquer que la prise en compte des différentes souches nécessiterait un travail conséquent. Elle a averti qu'elle ne pourrait donner la priorité à ce sujet dans son programme de travail que s'il était démontré qu'il bénéficierait aux Membres.

La Commission n'a pas accepté la proposition d'inclure, dans ce chapitre, une phrase indiquant qu'un Membre peut, sur la base d'une évaluation du risque et d'une déclaration du statut indemne d'un génotype particulier du virus de la septicémie hémorragique virale, prendre les mesures appropriées pour protéger son statut indemne. La Commission a toutefois admis qu'il serait utile de disposer d'orientations supplémentaires sur les principes d'application de l'évaluation du risque afin de justifier les mesures d'atténuation ciblant spécifiquement certains génotypes. Elle a estimé qu'il serait possible de traiter ce sujet en restructurant les articles des chapitres spécifiques aux maladies et en s'inspirant éventuellement des approches empruntées pour le *Code terrestre*. Il sera nécessaire que la prochaine Commission détermine si ce sujet doit être considéré comme prioritaire dans son programme de travail.

La Commission n'a pas accepté la proposition de procéder à de nouvelles modifications de la liste d'espèces destinée à l'article 10.10.2. Elle a expliqué qu'elle avait déjà examiné une partie des espèces proposées et qu'une réévaluation n'était pas justifiée puisque les demandes n'étaient pas étayées par des nouveaux éléments de preuve scientifiques. La Commission a procédé à l'évaluation de la sensibilité de l'autre partie des espèces proposées au regard des critères figurant dans le chapitre 1.5. Elle a conclu qu'aucune d'entre elles ne satisfaisait aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles.

La version révisée de l'article 10.10.2 du chapitre 10.10 « Infection par le virus de la septicémie hémorragique virale » est présentée aux Membres en [Annexe 7](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

### 3.1.7. Articles 11.3.1 et 11.3.2 du chapitre 11.3 « Infection à *Bonamia ostreae* »

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, la République populaire de Chine, Cuba, le Mexique, la Suisse, le RU et l'UE.

#### Contexte

Lors de sa réunion de septembre 2020, la Commission des animaux aquatiques a examiné le rapport de juillet 2020 du Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques aux maladies listées par l'OIE. Le Groupe *ad hoc* a appliqué à l'infection à *Bonamia ostreae* les critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique conformément au chapitre 1.5 du *Code aquatique*. La Commission est convenue d'amender la liste des espèces sensibles figurant dans l'article 11.3.2 conformément aux recommandations formulées par le Groupe *ad hoc* (rapport disponible à l'adresse suivante : <https://www.oie.int/standard-setting/specialists-commissions-working-ad-hoc-groups/ad-hoc-groups-reports/>).

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2020 (point 4.8, page 11).

#### Réunion de février 2021

La Commission a noté que tous les commentaires formulés étaient en faveur des amendements proposés.

La Commission a indiqué avoir reçu des commentaires sur le rapport du Groupe *ad hoc*. Leur examen a été réalisé par la Commission, en collaboration avec le Groupe *ad hoc*. La Commission a conclu que ces commentaires n'avaient aucun impact sur le résultat des évaluations.

La Commission n'a introduit aucun changement supplémentaire dans l'article 11.3.2, conformément à la décision prise lors de sa réunion de septembre 2020. Elle a pris acte que trois des six espèces actuellement répertoriées à l'article 11.3.2 comme étant sensibles à l'infection à *Bonamia ostreae* satisfaisaient aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles : l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), l'huître plate chilienne (*Ostrea chilensis*) et *Crassostrea ariakensis*. Les trois autres espèces, à savoir *Ostrea angasi*, *Ostrea puelchana* et *Ostrea denselammellosa*, ne satisfaisant pas à ces critères, il a été proposé de procéder à leur suppression de l'article 11.3.2. Elle a également noté qu'aucune des nouvelles espèces ayant fait l'objet de l'évaluation n'avait satisfait aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à l'infection à *B. ostreae*.

Les paragraphes concernés du chapitre 2.4.3 « Infection with *Bonamia ostreae* » du *Manuel aquatique* ont été amendés au regard des conclusions figurant dans le rapport de la réunion de septembre 2020 (voir également le point 4.1.5.).

La version révisée des articles 11.3.1 et 11.3.2 du chapitre 11.3 « Infection à *Bonamia ostreae* » est présentée aux Membres en [Annexe 8](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### 4. Le Manuel des tests de diagnostic pour les animaux aquatiques de l'OIE

La Commission des animaux aquatiques a rappelé aux Membres qu'elle avait initié les travaux de reformatage progressif des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique* selon le nouveau modèle de chapitre. Étant donné que les chapitres reformatés et les chapitres mis à jour ont subi des modifications substantielles, la Commission a décidé 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 sont 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 qui ont été réalisés lors de la première consultation ; toutes les modifications effectuées lors de la seconde consultation sont non seulement signalées au moyen des fonctions « double souligné » et « barré » mais également surlignées en jaune).

La Commission des animaux aquatiques a souhaité remercier les experts des Laboratoires de référence pour leurs importantes contributions ainsi que le docteur Marc Crane, rédacteur technique, qui les a aidés dans le processus de révision complète des chapitres du *Manuel aquatique*.

##### 4.1. Textes proposés à l'adoption en mai 2021

###### *Amendements horizontaux*

La Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition de supprimer la section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » de l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies car la microscopie électronique n'est pas une méthode de diagnostic recommandée pour les maladies des animaux aquatiques.

Dans la section 4.3 (et la section 4.4 du chapitre 2.3.3), la Commission a accepté la proposition de supprimer « or artificial media » du titre. Désormais, le nouveau titre de cette section est « Cell culture for isolation ». La modification correspondante sera effectuée dans la liste des tests présentée dans le tableau 4.1.

La Commission a décidé de conserver le terme « conventional » précédant « PCR and RT-PCR » (afin de la distinguer des PCR en temps réel et RT-PCR en temps réel). Elle a en effet considéré que la présence de ce terme améliorerait la clarté du texte. En outre, il figure dans le modèle de chapitre et est largement utilisé dans l'ensemble des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique*. Enfin, par convention, dans le *Manuel aquatique*, « PCR en temps réel » et « RT-PCR en temps réel » sont préférées à « qPCR » et « qRT-PCR ». La Commission a indiqué que cette convention était identique à celle utilisée dans le *Manuel terrestre*.

En réponse à une proposition d'ajouter d'autres tests du tableau 4.1 dans la section 5 « Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations », la Commission a rappelé que l'objet de la section 5 était de mettre l'accent sur les tests considérés comme étant les plus appropriés. Il est possible que deux voire plusieurs autres tests soient ajoutés à la liste des tests recommandés sous réserve qu'ils soient considérés comme étant tout aussi appropriés.

La Commission a examiné une requête concernant la section 6 « Corroborative diagnostic criteria », à savoir que les définitions de cas pour les animaux apparemment en bonne santé ne soient pas séparées de celles pour les animaux présentant des signes cliniques. La Commission a estimé que l'approche proposée demeurait pertinente. La Commission a également indiqué que le nouveau modèle de chapitre destiné au *Manuel aquatique*, dans lequel cette approche est présentée, avait été élaboré par un Groupe *ad hoc* et présenté, pour la première fois, en annexe du rapport de février 2018. Puis, les premiers chapitres ayant été reformatés selon le nouveau modèle ont été présentés dans les annexes du rapport de février 2019. Les chapitres nouvellement reformatés sont désormais présentés en annexe de chaque nouveau rapport.

##### 4.1.1. Révision de la liste des espèces non sensibles

###### **Réunion de février 2021**

La Commission des animaux aquatiques a passé en revue la nouvelle section 2.2.3 « Non-susceptible species » du modèle de chapitre spécifique aux maladies destiné au *Manuel aquatique*. Un certain nombre de Membres ont questionné la pertinence de l'inclusion d'espèces non sensibles dans le *Manuel aquatique* et rappelé l'objectif des critères permettant d'évaluer l'absence de sensibilité dans le chapitre 1.5 « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » du *Code aquatique*. La Commission a admis que l'identification des espèces hôtes non sensibles était uniquement pertinente dans le cas des agents pathogènes affectant un grand nombre d'hôtes, et qui font l'objet de l'évaluation figurant à l'article 1.5.9 « Inclusion d'un échelon taxonomique équivalent ou supérieur à celui du genre dans la liste des espèces sensibles ». La Commission est convenue de supprimer la section 2.2.3 du modèle de chapitre spécifique aux maladies et des chapitres du *Manuel aquatique* ayant fait l'objet d'une révision.

La Commission a rappelé que la réalisation d'évaluations au regard des critères de l'article 1.5.9 se poursuivrait en tant que de besoin et, que dans ce cadre, les preuves de l'absence de sensibilité seraient présentées dans les rapports de Groupe *ad hoc*.

#### **4.1.2. Chapitre 2.3.3 « Infection with *Gyrodactylus salaris* »**

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, la République populaire de Chine, Cuba, la Suisse, le RU, les États-Unis d'Amérique, l'UE et l'UA-BIRA.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2020 (point 8.3.1, page 21) ; rapport de septembre 2020 (point 5.2, page 13).

##### **Réunion de février 2021**

La Commission des animaux aquatiques a remercié les Membres pour leurs précieux commentaires sur ce chapitre.

Dans la section 1 « Scope », la Commission a accepté d'ajouter le terme « freshwater » car elle a considéré que cette modification était utile et permettait de mettre en exergue une caractéristique essentielle du parasite.

Dans la dernière phrase de la section 2.1.1 « Aetiological agent », la Commission a accepté de modifier la formulation afin d'indiquer clairement que les espèces *G. salaris* et *G. thymalli* étaient traitées comme deux espèces différentes aux fins de ce chapitre.

Dans la section 2.2.2 « Species with incomplete evidence for susceptibility », en réponse à un Membre demandant la raison pour laquelle seul le critère de réplication avait été utilisé pour identifier les espèces sensibles, la Commission a invité les Membres à consulter le rapport du Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons aux maladies listées par l'OIE (Annexe 30 du rapport de réunion de la Commission pour les animaux aquatiques de février 2018) dans lequel figure une explication sur l'application de l'article 1.5.6 à *G. salaris* (Commission des animaux aquatiques/ A\_AAC\_Sept\_2017.pdf [oie.int]). Le Groupe *ad hoc* ayant évalué la sensibilité des espèces hôtes à *G. salaris* a conclu que l'attachement du parasite se produisait de façon transitoire chez de nombreuses espèces. Par conséquent, les modifications cliniques induites par l'agent pathogène et la localisation de l'infection ne constituaient pas des critères valables pour conclure à l'infection. Seul le critère de réplication (A) a pu être ainsi utilisé, les critères B (Viabilité ou infectiosité), C (Manifestations cliniques ou pathologiques) et D (Localisation de l'agent pathogène dans les tissus) n'étant pas applicables pour déterminer la sensibilité de l'hôte.

La section 2.2.3 « Non-susceptible species » a été supprimée (voir le point 4.1.1).

S'agissant de la section 2.2.7 « Vectors », la Commission s'est montrée reconnaissante envers un Membre qui lui a transmis une évaluation des risques pour les vecteurs de *G. salaris*. La Commission a rappelé que la proposition de définition du terme vecteur impliquait que la transmission de l'agent pathogène aux espèces sensibles soit démontrée (voir le point 3.1.1.2). Il est indiqué, dans la section 2.2.7, que *G. salaris* peut s'attacher pendant de brèves périodes à des espèces de poissons qui ne sont pas considérées comme sensibles. Toutefois, comme il n'existe aucune preuve de la transmission de l'agent pathogène par des espèces autres que des espèces sensibles, aucune espèce n'est mentionnée dans la section 2.2.7. La Commission a estimé que ce contexte particulier était présenté de façon appropriée au sein de cette section. Elle est convenue que des espèces pourraient être considérées comme des vecteurs que si des preuves concrètes de la transmission étaient apportées.

Dans la section 2.3.5 « Environmental factors », la Commission a ajouté du texte sur la survie à différentes températures et salinités.

Dans la section 2.4.5 « Inactivation methods », la Commission a ajouté des détails sur les méthodes pour tuer le parasite ou prévenir son transfert.

Dans la section 2.4.7 « General husbandry », la Commission a précisé que le parasite pouvait être tué par des traitements administrés par balnéation (par exemple le formaldéhyde ou le chlore).

Dans la section 3.1 « Selection of populations and individual specimens », la Commission a supprimé le texte indiquant que les ombres communs ne devaient pas faire l'objet de prélèvements car il n'y avait pas de catégorie pour les espèces hautement sensibles dans ce chapitre.

La section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » a été supprimée (voir le point 4.1).

Dans la section 3.6 « Pooling of samples », la Commission a clarifié le fait que le mélange de poissons ou de nageoires en vue d'examiner la présence de parasites était acceptable. En revanche, le mélange des parasites à des fins de diagnostic moléculaire ne pouvait pas être recommandé car il y avait un manque d'information sur les conséquences éventuelles que cette pratique aurait sur la performance du test.

La réponse de la Commission à la proposition d'ajouter d'autres tests du tableau 4.1 dans la section 5 « Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations » figure au point 4.1.

La Commission a indiqué que le calcul des tailles d'échantillons n'entraîne pas dans le champ d'application des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique* et que des orientations étaient présentées dans le chapitre 1.4 du *Code aquatique* (en cours de révision).

En réponse à une question sur la section 4.5 « Nucleic acid amplification », la Commission a répondu que la digestion du mélange des sous-échantillons préalablement à l'extraction ne pouvait pas être recommandée.

Dans la section 4.6.2 « CO1 sequencing and sequence analysis », la Commission a accepté, afin d'améliorer la clarté du texte, la proposition d'ajouter la définition de clade suivante : « un groupe d'haplotypes ayant un ancêtre commun ».

La réponse de la Commission à la proposition de ne pas séparer, dans la section 6 « Corroborative diagnostic criteria », les définitions de cas pour les animaux apparemment sains de celles pour les animaux présentant des signes cliniques, figure au point 4.1.

La version révisée du chapitre 2.3.3 « Infection with *Gyrodactylus salaris* » est présentée aux Membres en [Annexe 9](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.3. Chapitre 2.3.6 « Infection with salmonid alphavirus »**

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, la République populaire de Chine, Cuba, la Suisse, la Thaïlande, les États-Unis d'Amérique, le RU et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2020 (point 8.3.2, page 21) ; rapport de septembre 2020 (point 5.3, page 14).

##### **Réunion de février 2021**

Dans la section 2.1.3 « Survival and stability outside the host », la Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition de remplacer « SAV » par « SAV viral genome » car, dans l'étude citée, la méthode mise en œuvre pour détecter l'infection par le virus de l'anémie infectieuse du saumon était la culture cellulaire. La Commission a décidé de supprimer l'affirmation selon laquelle les temps de survie étaient réduits en présence de matière organique. En effet, des rapports indiquent que certains types de matières organiques telles que la graisse favorisent la survie et la propagation du virus.

La section 2.2.3 « Non-susceptible species » a été supprimée (voir le point 4.1.1).

Dans la section 2.2.4 « Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations » (désormais numérotée 2.2.3), la Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter d'une référence plus récente sur la sensibilité des espèces à différentes étapes de leur cycle car l'étude scientifique étayant cette affirmation n'a pas encore été publiée. La Commission a clarifié le fait que le variant SAV1 du virus de l'anémie infectieuse du saumon avait été détecté chez la truite arc-en-ciel.

Dans la section 2.3.1 « Mortality, morbidity and prevalence », la Commission n'a pas jugé utile de préciser qu'il était nécessaire de spécifier que la technique de RT-PCR permettait de détecter le génome viral, considérant que c'était implicite. En outre, il aurait été nécessaire de procéder à cette modification dans l'ensemble du *Manuel aquatique*.

Dans la section 3.2 « Selection of organs or tissues », la Commission n'a pas accepté la proposition de remplacer « RT-PCR en temps réel » par « qRT-PCR » car cette convention n'est pas utilisée dans le

*Manuel aquatique* (voir le point 4.1). Par ailleurs, la Commission a indiqué qu'elle souhaitait conserver l'emploi du terme « abdominal cavity » plutôt que du terme « coelomic cavity » car il est compris par le plus grand nombre.

Dans la section 3.5.1 « Samples for pathogen isolation », la Commission a supprimé l'information d'ordre général et l'a ajoutée au chapitre 2.3.0 « General information » (maladies des poissons). Elle a également inséré une référence à ce chapitre.

La section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » a été supprimée (voir le point 4.1).

Dans la section 3.6 « Pooling of samples », la Commission n'a pas accepté d'ajouter une description de la performance de diagnostic des tests conduits sur les mélanges d'échantillons. Elle a en revanche clairement précisé que la fiabilité des tests de détection conduits sur des mélanges d'échantillons n'ayant été que partiellement évaluée, la réalisation de tests sur des échantillons individuels était plus appropriée pour démontrer l'absence de maladie.

Dans le tableau 4.1 « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals », la Commission a été questionnée sur la cohérence du niveau de validation de certaines méthodes au regard de la note qui leur a été attribuée : par exemple, le niveau de validation de la méthode PCR en temps réel, utilisée aux fins de « Surveillance of apparently healthy animals » et de « Presumptive diagnosis of clinically affected animals », est de 1 alors qu'elle est notée « +++ » ; de même le niveau de validation de la méthode de séquençage des amplicons, utilisée aux fins de « Confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis » est de 2 alors que cette méthode est notée « +++ ». La Commission a expliqué que le niveau de validation n'était pas le seul facteur utilisé dans la détermination des recommandations en matière de tests. Les méthodes recommandées sont celles utilisées en routine pour le diagnostic de l'infection par l'alphavirus des salmonidés et pour lesquelles des informations sont disponibles. Toutefois, le niveau de validation est le résultat d'un processus continu : il a vocation à évoluer dans le temps.

Dans la section 4.4.1 « Real-time RT-PCR », la Commission n'a pas accepté la proposition de remplacer « sequencing » par « sequence analysis » dans la phrase faisant référence aux « RT-PCR and sequencing ». Elle a en effet considéré que « sequencing » était le terme approprié dans le contexte de cette section, qu'il figurait d'ailleurs dans tous les chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique* et qu'il était parfaitement compréhensible. Toutefois, dans la section 4.5 « Amplicon sequencing », la Commission a accepté la proposition de remplacer « nucleotide sequencing » par « nucleotide sequence analysis » car, dans cette phrase, la modification permet de rendre la recommandation plus précise.

La réponse de la Commission à la proposition d'ajouter d'autres tests du tableau 4.1 dans la section 5 « Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations » figure au point 4.1.

La réponse de la Commission à la proposition de ne pas séparer, dans la section 6 « Corroborative diagnostic criteria », les définitions de cas pour les animaux apparemment sains des définitions de cas pour les animaux présentant des signes cliniques, figure au point 4.1.

Dans la section 6.6.1 « Definition of suspect case in apparently healthy animals », la Commission n'a pas accepté la proposition de rétablir deux des critères dont la suppression avait été précédemment demandée, car leur présence n'était pas cohérente dans le tableau 4.1. En effet, ni la RT-PCR conventionnelle ni l'observation de l'effet cytopathogène typique de l'alphavirus des salmonidés en culture cellulaire ne sont recommandés aux fins de la surveillance, dans le tableau 4.1.

La Commission a remercié les experts ayant révisé le texte et complété le tableau 6.3 « Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis ».

La version révisée du chapitre 2.3.6 « Infection with salmonid alphavirus » est présentée aux Membres en [Annexe 10](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.4. Chapitre 2.3.0 « General information » (maladies des poissons)**

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, le Canada, la République populaire de Chine, le Taipei chinois, Cuba, le Japon, la République de Corée, la Nouvelle-Zélande, la Suisse, le RU, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2020 (point 8.4.1, page 22) ; rapport de septembre 2020 (point 5.6, page 15).



## Réunion de février 2021

Lorsque c'était possible, la Commission des animaux aquatiques a supprimé les noms commerciaux et les a remplacés par des termes génériques dans l'ensemble du chapitre. L'OIE, en tant qu'organisation internationale à caractère normatif, ne peut approuver ou recommander, dans ses normes, des marques spécifiques de distributeurs ou fabricants de réactifs chimiques et biologiques, de kits de diagnostic ou de vaccins.

La Commission a accepté la proposition d'inclure des informations d'ordre général sur l'échantillonnage des poissons dans la section A.1.2 « Specifications according to fish populations » plutôt que dans chacun des chapitres spécifiques aux maladies, où seules les informations propres à l'agent pathogène spécifique devraient figurer.

Dans la section A.1.3 « Specifications according to clinical status », la Commission a accepté de recommander que l'échantillon comprenne de cinq à dix poissons présentant des signes cliniques de la maladie, selon la maladie concernée. Une phrase concernant des informations spécifiques aux maladies a été supprimée de cette section et remplacée par une référence à la section 3.2 « Selection of organs or tissues » des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique*.

Dans la section A.1.4 « Specifications according to fish size », la Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter une référence justifiant le retrait du sac vitellin. La Commission a rappelé que le retrait du sac vitellin était une pratique commune et usitée dans les laboratoires car il pouvait s'avérer toxique pour certaines lignées cellulaires. Elle n'a donc pas été convaincue du bien-fondé de l'ajout d'une telle référence. Par ailleurs, la Commission n'a pas accepté la demande de suppression de la section A.1.4, car elle a estimé qu'il était important d'en faire mention dans ce chapitre, même si les textes traitant des agents pathogènes spécifiques sont usuellement présentés dans les chapitres spécifiques aux maladies correspondantes.

Dans la section A.2.2 « Preservation of samples for subsequent virological examination », la Commission a révisé les valeurs des concentrations en formol, utilisé comme fixatif : elle a remplacé l'intervalle de valeurs « 4–10 % » par la valeur « 10 % » car c'est la concentration la plus fréquemment recommandée.

Dans la section A.2.3.2 « Virus isolation », la Commission a corrigé le titre. Elle a remplacé, au point 6, « pre-screening » par « other tests ». La Commission a également ajouté un nouveau point 7 relatif à la recommandation de diviser les échantillons de matériaux homogénéisés en aliquotes pour éviter les cycles successifs de congélation/décongelations.

Dans la section B.1.1 « Fish cell lines », la Commission a accepté la proposition d'ajouter « rainbow trout gonad (RTG-2) » car cette lignée cellulaire est considérée comme importante pour le diagnostic de l'infection par le virus de la septicémie hémorragique virale de la carpe ; à cet égard elle sera également incluse dans le chapitre dédié à cette maladie. La Commission a ajouté les lignées cellulaires de carpe herbivore (GCO) dans la liste car elles sont désormais largement accessibles et importantes pour le diagnostic de l'infection par le virus de la septicémie hémorragique virale de la carpe.

Dans le tableau de la section B.1.3.1 « Virus Production », la Commission a ajouté que la température optimale pour la propagation du virus de la septicémie hémorragique virale était de 15°C.

La Commission a accepté de déplacer une phrase, traitant de la fréquence de détermination du titre des suspensions d'isolats de référence en vue de vérifier la sensibilité des lignées cellulaires à l'infection, de la section B.2.4.1 « Virus isolation » à la fin de la section B.1.3.2 « Preservation and storage of virus stock cultures ».

Dans la section B.2.2.1 « Preparation of slides for histological examination », la Commission a indiqué plus clairement que les poissons devaient être examinés « after humane euthanasia », conformément aux normes en matière de bien-être animal. La Commission a également accepté d'ajouter un intervalle de valeurs pour l'épaisseur des sections coupées, 3 µm étant désormais la valeur minimale.

Dans la section B.2.4 « Virus isolation », la Commission a accepté la proposition d'inclure des ajouts substantiels de texte sur les informations générales en matière d'isolement du virus plutôt que de répéter ces informations dans chacun des chapitres spécifiques aux maladies, où seules les informations propres à l'agent pathogène spécifique devraient figurer.

Dans la section B.2.4.5 « Sub-Cultivation », la Commission a supprimé le texte sur l'amélioration de la confiance accordée aux résultats négatifs pour la présence du virus lorsque des méthodes reposant sur les anticorps ou acides nucléiques (PCR) sont utilisées, car la recommandation ne tient pas compte des résultats faux positifs obtenus avec la PCR. S'agissant des examens virologiques, la Commission a indiqué clairement que des cycles successifs de congélation/décongelations réduisaient les titres viraux et qu'elle recommandait plutôt de diviser les échantillons de matériaux homogénéisés en aliquotes.

Dans la section B.2.4.6 « Virus identification », la Commission a précisé clairement que les cultures cellulaires infectées étaient utilisées pour identifier le virus, au moyen de la technique d'immunofluorescence indirecte. Elle a également indiqué que le supernageant des cultures, dans lesquelles un effet cytopathique avait été observé, était également utilisé pour l'identification des virus, au moyen de techniques mettant en œuvre les acides nucléiques.

Dans la section B.2.5.1 « Sample preparation and types », la Commission n'a pas accepté de supprimer le texte indiquant que, dans le cas de l'hybridation *in-situ*, une durée de fixation supérieure à 24 - 48 h devait être évitée. Elle a effet considéré que cette affirmation traduisait fidèlement les meilleures pratiques en la matière.

La version révisée du chapitre 2.3.0 « General information » est présentée aux Membres en [Annexe 11](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.5. Sections 2.2.1 et 2.2.2 (sur les espèces sensibles) du chapitre 2.4.3 « Infection with *Bonamia ostreae* »**

Des commentaires ont été formulés par l'Arménie, la République populaire de Chine, Cuba, la Suisse, les États-Unis d'Amérique et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2020 (point 5.7, page 16).

##### **Réunion de février 2021**

La Commission des animaux aquatiques n'a pas accepté la proposition d'un Membre d'ajouter des références dans ces sections et a rappelé qu'elles pouvaient être consultées dans les rapports des Groupes *ad hoc* concernés. En cohérence avec sa décision prise au point 4.1.1, la Commission est convenue de supprimer la section 2.2.3 « Non-susceptible species ».

La version révisée des sections 2.2.1 et 2.2.2 du chapitre 2.4.3 « Infection with *Bonamia ostreae* » est présentée aux Membres en [Annexe 12](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.6. Nouveau projet de chapitre 2.1.X « Infection with *Batrachochytrium salamandrivorans* »**

Des commentaires ont été formulés par la Nouvelle-Zélande, la Thaïlande, le RU et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2019 (point 6.1.2, page 17) ; rapport de septembre 2019 (point 6.8.2, page 12) ; rapport de février 2020 (point 8.2.2, page 19).

##### **Réunion de février 2021**

Dans la section 1 « Scope », la Commission des animaux aquatiques a remplacé les catégories « Genus » et « Family » par les catégories « Division » et « Order » auxquelles appartient l'agent pathogène afin d'être en ligne avec les conventions adoptées dans le chapitre correspondant du *Code aquatique*.

Dans la section 2.2.1 « Susceptible host species » et la section 2.2.2 « Species with incomplete evidence for susceptibility », la Commission a complété l'intitulé des deux titres par « [under study] » car la maladie n'a pas encore fait l'objet d'une évaluation par le Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces d'amphibiens aux maladies listées par l'OIE.

La section 2.2.3 « Non-susceptible species » a été supprimée (voir le point 4.1.1).

Dans la section 2.3.5 « Environmental factors », la Commission a décidé de supprimer un paragraphe sur le lien entre la dynamique de la maladie et la densité des hôtes et de le placer dans la section 2.3.1 « Mortality, morbidity and prevalence ». Elle a également supprimé un paragraphe sur le rôle des barrières contre la dissémination des agents pathogènes dans la prévention de la transmission et de le placer dans la section 2.4.7 « General husbandry ». Elle a estimé qu'il était plus logique que ces paragraphes figurent dans ces sections.

Dans la section 3.4 « Non-lethal sampling », la Commission a accepté la proposition de remplacer « cotton-tipped swabs » par « medical swabs ». Elle a estimé que ce terme était plus approprié et ajouté une phrase sur les orientations à suivre pour soumettre les écouvillons aux laboratoires en charge du diagnostic.

La section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » a été supprimée (voir le point 4.1).

Dans la section 3.6 « Pooling of samples », la Commission a ajouté une référence sur la fiabilité des procédures de tests mettant en œuvre des mélanges d'échantillons.

S'agissant du tableau 4.1 « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals », un Membre a demandé si la note « +++ » attribuée à la PCR en temps réel pouvait être remplacée par « ++ », car le tableau et le texte figurant dans la section 4.4.1 « Real-time PCR » indiquent que le test est « partially validated to level 2 ». La Commission a examiné les publications pertinentes sur ce sujet et a noté que la validation incluait l'évaluation de la fiabilité et de la reproductibilité. Elle a jugé qu'un niveau de validation égal à 3 pouvait désormais lui être attribué et modifié le texte figurant dans la section 4.4.1 en conséquence. Comme les niveaux de validation sont présentés à la fois dans le tableau 4.1 et dans le tableau 6.3 « Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis », la Commission est convenue de supprimer toute mention aux niveaux de validation dans le texte.

La Commission n'a pas accepté la proposition d'un Membre d'inclure, dans la section 4.5 « Amplicon sequencing », des informations sur le séquençage des produits générés par la technique PCR en temps réel au moyen d'une sonde TaqMan car aucune information sur le séquençage des produits générés par les PCR en temps réel n'est disponible.

Le nouveau projet de chapitre 2.1.X « Infection with *Batrachochytrium salamandrivorans* » est présenté aux Membres en [Annexe 13](#). Il sera proposé à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.7. Chapitre 2.3.9 « Infection with spring viraemia of carp virus »**

Des commentaires ont été formulés par l'Australie, le Canada, Singapour, la Thaïlande, le RU et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de février 2019 (point 6.1.1, page 16) ; rapport de septembre 2019 (point 6.8.1, page 10) ; rapport de février 2020 (point 8.2.1, page 18).

##### **Réunion de février 2021**

La section 2.2.3 « Non-susceptible species » a été supprimée (voir le point 4.1.1).

Dans la section 2.2.6 « Aquatic animal reservoirs of infection », la Commission des animaux aquatiques a accepté de décrire les poissons qui constituent des réservoirs potentiels de l'infection comme étant « with long term subclinical infections » plutôt que « surviving infection ».

Dans la section 2.3.4 « Modes of transmission and life cycle », la Commission a accepté de supprimer le texte sur la difficulté à éradiquer le virus de la virémie printanière de la carpe une fois qu'il est établi dans les populations car cette difficulté est également observée pour d'autres pathogènes.

Dans la section 3.1 « Selection of populations and individual specimens », la Commission a accepté de supprimer le carassin et la carpe argentée de la liste des espèces cible car ils font partie des espèces pour lesquelles les preuves de la sensibilité sont insuffisantes. Ces espèces ont été remplacées par d'autres exemples de cyprinidés, à savoir la brème et le gardon. La Commission a également indiqué clairement que les sources d'eau devaient faire l'objet d'une évaluation afin de déterminer le risque de maladie associé. Elle a amendé le texte afin de spécifier que l'eau présentant le plus grand risque devait être ciblée en priorité et que l'ensemble des sources présentant un risque équivalent devait être incluse dans l'échantillonnage.

Dans la section 3.5.2 « Preservation of samples for molecular detection », la Commission n'a pas accepté la proposition de modifier la valeur du pourcentage d'éthanol nécessaire à la conservation du matériel utilisé à des fins de diagnostic car la valeur figurant dans le chapitre traitant de l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe était en ligne avec les préconisations générales figurant dans le chapitre 2.3.0.

Dans la section 3.5.3 « Fixed samples for histopathology, immunohistochemistry or *in-situ* hybridisation », la Commission a supprimé le texte sur l'immunohistochimie ou l'hybridation *in-situ* et l'a remplacé par une référence au chapitre 2.3.0.

La section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » a été supprimée (voir le point 4.1).

La Commission a examiné la requête d'inclure un protocole de validation recommandé pour les mélanges d'échantillons dans la section 3.6 « Pooling of samples ». Elle est convenue qu'il serait utile de disposer de telles préconisations dans le chapitre 1.1.2 « Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases ». La Commission a estimé que ce sujet pourrait éventuellement être intégré dans son programme de travail. Dans cette attente, la Commission a suggéré que l'article suivant, publié récemment, serve de référence sur le mélange d'échantillons d'animaux aquatiques :

Laurin E., Thakur K., Mohr P.G., Hick P., Crane M.S.J., Gardner I.A., Moody N.J.G., Colling A. & Ernst I. (2019). To pool or not to pool? Guidelines for pooling samples for use in surveillance testing of infectious diseases in aquatic animals. *J. Fish Dis.*, **42**, 1471–1491.

Dans le tableau 4.1 « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals », un niveau de validation égal à 3 est attribué à l'isolement du virus et au séquençage de l'amplicon. La Commission a reçu une demande d'inclusion de références pour justifier le niveau attribué. Elle a répondu qu'il n'y avait actuellement aucune donnée publiée sur les niveaux de validation 2 ou 3 en raison du manque de sensibilité et de spécificité de diagnostic et analytiques. Les études de validation qui permettront de répondre aux interrogations sur ce sujet sont en cours. Dans cette attente, la Commission a recommandé d'attribuer un niveau de validation égale à 1 à la culture cellulaire, la PCR conventionnel et le séquençage de l'amplicon.

Dans la section 4.3.1 « Cell lines », la Commission a modifié les informations relatives aux lignées cellulaires afin qu'elles soient en ligne avec celles figurant dans les autres chapitres spécifiques aux maladies virales des poissons (par exemple, les chapitres traitant de l'infection par le virus de la nécrose hémato-poïétique infectieuse et de l'infection par le virus de la septicémie hémorragique virale).

Dans la section 4.4.2 « Conventional PCR », la Commission n'a pas accepté la demande de clarification concernant l'inclusion d'information sur le séquençage. Elle a en effet estimé que le séquençage de l'amplicon ne devait pas être considéré comme un test de confirmation de l'infection à part entière mais comme l'étape de confirmation à réaliser après l'amplification par PCR. L'information sur le séquençage sera donc conservée au sein de la section 4.4.2.

Dans la section 5, la Commission n'a pas accepté d'inclure la RT-PCR emboîtée conventionnelle comme autre méthode pour la surveillance des animaux apparemment en bonne santé car la culture cellulaire est considérée comme la méthode la plus adaptée, et ce en dépit du manque de données de validation pour les méthodes de diagnostic de l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe. Une phrase a été ajoutée à la fin de cette section pour donner ces éléments de contexte.

Dans le tableau 6.3, la Commission n'a pas accepté d'ajouter « under study », même si elle a reconnu qu'il n'y avait aucune donnée disponible sur les performances des tests utilisés pour le diagnostic de l'infection par le virus de la virémie printanière de la carpe et que des études de validation étaient effectivement en cours. Elle a jugé que l'ajout de « under study » laisserait à penser qu'elle coordonnait ces études, ce qui n'était pas le cas.

La version révisée du chapitre 2.3.9 « Spring viraemia of carp virus » est présentée aux Membres en [Annexe 14](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.8. Chapitre 2.3.4 « Infection with infectious haematopoietic necrosis virus »**

Des commentaires ont été formulés par le Canada, la République populaire de Chine, le Japon, la Nouvelle-Zélande et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre 2019 (point 6.8.3, page 13) ; rapport de février 2020 (point 8.2.3, page 19).

#### **Réunion de février 2021**

La section 2.2.3 « Non-susceptible species » a été supprimée (voir le point 4.1.1).

Dans la section 2.2.5 « Distribution of the pathogen in the host » (désormais numérotée 2.2.4), la Commission des animaux aquatiques a accepté d'inclure la région orale, le pharynx, le pancréas et le

*Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE / février 2021*

cartilage dans la liste des tissus à cibler pour l'isolement du virus. Elle a ajouté les références correspondantes.

Dans la section 3.1 « Selection of populations and individual specimens », la Commission a accepté de supprimer les phrases suggérant que la truite arc-en-ciel était l'espèce la plus sensible à l'infection par le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse. En effet, aucune publication ne justifie cette affirmation, qui va en outre à l'encontre de la préconisation de disposer d'un échantillonnage représentatif des populations présentes, qu'il s'agisse des truites arc-en-ciel ou d'autres espèces.

Dans la section 3.2 « Selection of organs or tissues », la Commission a accepté la proposition de réviser complètement le texte afin de mieux expliquer que la sélection des tissus cible différait selon que les prélèvements étaient effectués sur des animaux présentant des signes cliniques de la maladie ou des animaux en bonne santé.

Dans la section 3.3 « Samples or tissues not suitable for pathogen detection », la Commission a examiné un commentaire sur la toxicité des sacs vitellins pour l'ensemble des lignées cellulaires, et a conclu qu'il n'était pas nécessaire de modifier le texte (voir les commentaires sur la section A.14 figurant au point 4.1.7).

La section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » a été supprimée (voir le point 4.1).

La Commission a validé le commentaire selon lequel le niveau de validation attribué à la PCR conventionnelle aux fins respectives du « presumptive diagnosis of a clinically affected animals » et du « Confirmatory diagnosis of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis » devrait être identique. Elle a donc attribué un niveau égal à 2 dans les deux cas, dans le tableau 4.1 « OIE recommended diagnostic methods and their level of validation for surveillance of apparently healthy animals and investigation of clinically affected animals ».

Dans la section 4.3.2 « Sample preparation and inoculation », la Commission a amendé le texte de façon à ce qu'il soit aligné sur celui des autres chapitres traitant des maladies virales des poissons. Elle a notamment supprimé le sous-titre « Interpretation of results », harmonisé le texte sur l'effet cytopathogène et inclus une section sur la « Subcultivation ».

Dans la section 4.4.1 « Real-time RT-PCR », la Commission a refusé la suggestion de ne pas inclure la RT-PCR en temps réel en une étape tant que cette dernière n'aurait pas été validée. La RT-PCR en temps réel en deux étapes a fait l'objet d'une validation et a présenté de très bonnes spécificité et sensibilité. Pour des raisons pratiques, la plupart des laboratoires préfèrent avoir recours à l'essai en une étape, qui est une adaptation de l'essai en deux étapes, sans que les caractéristiques du test en soient affectées. La Commission a ajouté du texte ainsi qu'une référence confirmant que la performance de l'essai en une étape ne différait en rien de celle de l'essai en deux étapes.

Dans le tableau 6.3 « Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis », la Commission a remplacé « steelhead » par « rainbow trout ».

La version révisée du chapitre 2.3.4 « Infection with infectious haematopoietic necrosis virus » est présentée aux Membres en [Annexe 15](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

#### **4.1.9. Chapitre 2.3.10 « Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus »**

Des commentaires ont été formulés par la Canada, le Japon, la République de Corée et l'UE.

**Précédents rapports de réunion de la Commission des animaux aquatiques traitant de ce point :** rapport de septembre de 2019 (point 6.8.4, page 13) ; rapport de février 2020 (point 8.2.4, page 20).

##### **Réunion de février 2021**

Dans la section 2.1.2 « Survival and stability in processed or stored samples », la Commission des animaux aquatiques a accepté la proposition d'amender le texte afin d'y préciser clairement que le procédé de surgélation commercial désignait un entreposage permettant d'atteindre la température de -24°C à cœur.

Dans la section 2.2.2 « Species with incomplete evidence for susceptibility », la Commission est convenue d'ajouter, pour le génotype viral IVb, *Petromyzon marinus* (lamproie) afin d'être en ligne avec la nouvelle évaluation du Groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de poissons aux maladies listées par l'OIE.

La section 2.2.3 « Non-susceptible species » a été supprimée (voir le point 4.1.1).

Dans la section 2.2.7, la Commission n'a pas accepté la proposition d'ajouter le cladocère comme vecteur potentiel de l'infection (par voie orale) car la publication de référence ne démontrait pas la transmission de l'infection. La Commission a décidé d'ajouter une phrase afin d'indiquer clairement que le virus de la septicémie hémorragique viral avait été détecté dans de nombreuses espèces animales mais qu'il n'avait pas été démontré que celles-ci transmettaient l'infection.

La Commission a décidé d'amender le texte figurant dans la section 2.4.1 « Vaccination » afin de préciser clairement qu'aucun vaccin n'était actuellement commercialisé.

Dans la section 3.2, la Commission n'a pas accepté d'inclure le foie ou le tractus gastro-intestinal dans la liste des organes à prélever dans les populations présentant des manifestations cliniques car leur concentration élevée en enzymes était susceptible d'inactiver le virus. La Commission a clarifié le fait que dans les populations apparemment en bonne santé, les tissus à prélever en priorité étaient la partie antérieure du rein et le cœur ainsi que, pendant la phase chronique de l'infection, le cerveau, car le virus pouvait persister dans les tissus du système nerveux. Les références correspondantes ont été ajoutées.

La section 3.5.4 « Samples for electron microscopy » a été supprimée (voir le point 4.1).

Dans le tableau 4.1 « Test(s) recommended for surveillance to demonstrate freedom in apparently healthy populations », la Commission a accepté, à des fins d'alignement avec la section 4.9 « Antibody- or antigen-based detection methods », de supprimer de la liste des tests recommandés pour la surveillance des animaux apparemment en bonne santé le test immunoenzymatique (ELISA) et le test de séroneutralisation, tous deux utilisés pour la détection des anticorps.

Comme conséquence des modifications apportées dans le tableau 4.1, la Commission a supprimé, de la liste des critères de la section 6.1.1 « Definition of suspect case in apparently healthy animals », la détection des anticorps. La Commission a également remplacé, aux alinéas ii) et iii) de cette section, l'utilisation de PCR en temps réel et de PCR conventionnelle par l'utilisation de RT-PCR en temps réel et de RT-PCR conventionnelle.

Dans la section 4.5, la Commission a ajouté une phrase et une référence sur le fait que le génotype du virus de la septicémie hémorragique viral pouvait être identifié par séquençage de l'amplicon généré par une RT-PCR conventionnelle, en utilisant l'ensemble d'amorces 3F2R.

La version révisée du chapitre 2.3.10 « Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus » est présentée aux Membres en [Annexe 16](#). Elle sera proposée à l'adoption lors de la 88<sup>e</sup> Session générale, en mai 2021.

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

Paris, 17 - 24 février 2021

### Liste des participants

#### MEMBRES DE LA COMMISSION

<p><b>Dr Ingo Ernst</b> (Président) Director Aquatic Pest and Health Policy Animal Division Department of Agriculture, Water and the Environment GPO Box 858 Canberra ACT 2601 AUSTRALIE Tél. : +61 2 6272 5615 ingo.ernst@awe.gov.au</p>	<p><b>Dr Kevin William Christison</b> Department of Environment, Forestry and Fisheries Directorate: Aquaculture Research and Development Private Bag X 2V Vlaeberg, 8018 AFRIQUE DU SUD kchristison@environment.gov.za</p>	<p><b>Dr Alicia Gallardo Lagno</b> (Vice-Président) Undersecretary of Fisheries and Aquaculture Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, SUBPESCA Bellavista 168, piso 16 Valparaiso CHILI Tél. : +56 32 2502700 agallardol@subpesca.cl</p>
<p><b>Dr Atle Lillehaug</b> Head of Section Section for Fish Health and Biosecurity Norwegian Veterinary Institute Ullevålsveien 68, 0454 Oslo Pb 750 Sentrum, N-0106 Oslo NORVÈGE atle.lillehaug@vetinst.no</p>	<p><b>Dr Prof. Hong Liu</b> Deputy Director Animal and Plant Inspection and Quarantine Technical Center Shenzhen Customs District General Administration of Customs, 1011 building of Fuqiang Road Futianqu, Shenzhen City, Guangdong province CHINE (République Populaire de) szc_liuhong@customs.gov.cn 709274714@qq.com</p>	<p><b>Dr Edmund Peeler</b> (Vice-Président) Epidemiologist Aquatic Pests and Pathogens, Barrack Road, Weymouth Dorset, DT4 8UB ROYAUME-UNI Tél. : +44 (0)1305 206746 ed.peeler@cefasc.co.uk</p>

#### SIÈGE DE L'OIE

<p><b>Dr Gillian Mylrea</b> Cheffe du Service des normes g.mylrea@oie.int</p>	<p><b>Dr Gounalan Pavade</b> Chargé de mission Service des normes g.pavade@oie.int</p>	<p><b>Dr Stian Johnsen</b> Chargé de mission Service des normes s.johnsen@oie.int</p>
<p><b>Mme Sara Linnane</b> Secrétaire de rédaction scientifique Service scientifique s.linnane@oie.int</p>	<p><b>Dr Bernita Giffin</b> Coordinatrice scientifique de la santé des animaux aquatiques Service des normes b.giffin@oie.int</p>	

[Retour à l'ordre du jour](#)

## GLOSSAIRE

### **DECHETS ISSUS D'ANIMAUX AQUATIQUES** (nouvelle définition destinée au glossaire ayant été initialement proposée dans le rapport de septembre 2019 de la Commission)

désigne l'ensemble ou des parties du corps d'un *animal aquatique* tout ce qui est généré par les *animaux aquatiques* morts ou ayant été tués à des fins de contrôle des *maladies* ou par les *animaux aquatiques* abattus et transformés à des fins de consommation humaine ou à d'autres fins. Cela peut inclure l'ensemble ou des parties du corps des *animaux aquatiques* ainsi que les fluides qui en sont issus et qui sont destinés à être éliminés.

### **DECHETS ISSUS D'ANIMAUX AQUATIQUES (VERSION SANS MARQUES DE REVISION)**

désigne l'ensemble ou des parties du corps d'un *animal aquatique* ainsi que les fluides qui en sont issus et qui sont destinés à être éliminés.

### **PRODUITS ISSUS D'ANIMAUX AQUATIQUES**

désigne les *animaux aquatiques* non viables, les parties du corps des *animaux aquatiques* ou les biens manufacturés comportant des matières issues d'*animaux aquatiques* destinés à la vente ou aux échanges commerciaux et les produits à base d'*animaux aquatiques*.

### **PRODUITS ISSUS D'ANIMAUX AQUATIQUES (VERSION SANS MARQUES DE REVISION)**

désigne les *animaux aquatiques* non viables, les parties du corps des *animaux aquatiques* ou les biens manufacturés comportant des matières issues d'*animaux aquatiques* destinés à la vente ou aux échanges commerciaux.

### **VECTEUR**

désigne tout organisme vivant, autre qu'une espèce sensible, pour lequel il a été démontré qu'il transférait porteur transmettait d'un agent pathogène qu'il transmet à un *animal aquatique* une population d' des espèces sensibles, aux aliments qu'il consomme ou à son environnement immédiat. Cet agent pathogène peut ou non passer par un cycle de développement au sein du vecteur. Les espèces sensibles à un agent pathogène ne sont pas considérées comme des vecteurs de cet d'un agent pathogène spécifique.

### **VECTEUR (VERSION SANS MARQUES DE REVISION)**

désigne tout organisme vivant pour lequel il a été démontré qu'il transmettait un agent pathogène à des espèces sensibles. Les espèces sensibles ne sont pas considérées comme des vecteurs d'un agent pathogène spécifique.



## AMENDEMENTS PROPOSÉS VISANT À REMPLACER LE TERME « DÉCHETS » PAR LE TERME « DÉCHETS ISSUS D'ANIMAUX AQUATIQUES » DANS LE CODE AQUATIQUE

Article	Page	Modification proposée
Guide de l'utilisateur, C. Thèmes spécifiques, 7), dernière phrase		L'évaluation des <i>produits issus d'animaux aquatiques</i> en vue de leur inclusion dans les articles susmentionnés tient compte de la forme et la présentation du produit, du volume attendu de <u>déchets</u> <del>tissulaires</del> <u>issus d'animaux aquatiques</u> générés par le consommateur et de la présence probable d' <i>agents pathogènes</i> viables dans ces déchets.
2.1.4., 2.c), dernier tiret		– méthodes d'élimination des déchets <del>méthodes d'élimination des déchets</del> <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> .
4.2.3., 2.i)		i) élimination des déchets <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> ;
4.3.6.	60	Il doit être tenu compte du niveau élevé de risque de maladie (en raison de l'importance de la <i>maladie</i> ), de la concentration importante en agents pathogènes, des volumes potentiellement conséquents d' <i>animaux aquatiques</i> infectés et de déchets <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> , des vastes surfaces requérant une désinfection et des volumes considérables d'eau contaminée.
4.7.1.	71	L'objectif du présent chapitre est de donner des orientations sur l'entreposage, le transport, l'élimination et le traitement des déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> afin de maîtriser les risques sanitaires associés.
4.7.2.	71	Le champ d'application du présent chapitre couvre les déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> produits par : i) les opérations courantes d'entretien et de fonctionnement des <i>établissements d'aquaculture</i> ; ii) les activités de transformation on shore, indépendamment de l'origine des animaux ; iii) l'abattage massif à des fins de contrôle sanitaire et iv) les mortalités en masse (y compris celle se produisant dans l'environnement naturel).
4.7.3.	71	<u>Aux fins du présent chapitre :</u> Par déchets d'animaux-aquatiques, on entend le corps ou des parties du corps d'animaux-aquatiques trouvés morts ou mis à mort à des fins de contrôle sanitaire ainsi que les animaux-aquatiques abattus, ou des parties de leur corps, qui ne sont pas destinés à la consommation humaine. Les déchets à haut risque désignent des déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> qui constituent ou sont suspectés de constituer un risque sanitaire grave pour les <i>animaux aquatiques</i> ou l'homme. Les déchets à faible risque désignent les déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> qui n'entrent pas dans la catégorie des déchets à haut risque.
4.7.4.	71	L' <i>Autorité compétente</i> doit s'assurer que la méthode d'élimination des déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> est efficace et permet d'obtenir les résultats escomptés. [...] : 1) permettre l'accès physique et logistique ainsi que l'accès aux données au personnel approprié, en coopération avec les partenaires, y compris l'accès par l' <i>Autorité compétente</i> aux déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> ; 2) exercer des contrôles des mouvements et conférer l'autorité de délivrer des dérogations sous certaines conditions de <i>sécurité biologique</i> , tel que le transport des déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> vers un autre site en vue d'y être éliminés ; [...]
4.7.5.	72	Après la récolte, la durée d'entreposage des déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> doit être réduite autant que possible néanmoins, dans les cas où celle-ci doit se prolonger, la capacité d'entreposage doit être suffisante pour le volume de déchets attendu et l' <i>Autorité compétente</i> peut exiger des mesures additionnelles. [...] Les conteneurs dans lesquels sont entreposés les déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> doivent être étanches et sécurisés afin de prévenir tout contact avec des <i>animaux aquatiques</i> , d'autres animaux ou des oiseaux, ainsi que du personnel non autorisé. Les déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> infectés ou suspectés d'être infectés <u>contaminés</u> par un agent causant une <i>maladie</i> visée dans le Code <i>aquatique</i> , <u>ou suspectés de l'être</u> , ne pourront être transportés sans autorisation préalable de l' <i>Autorité compétente</i> . [...] Les conteneurs utilisés pour transporter les déchets d'animaux-aquatiques- <u>déchets</u> <u>issus d'animaux aquatiques</u> doivent être étanches et la nature de leur contenu doit être indiquée sur leur étiquetage. [...]

4.7.6.	7.2.	1. <u>Nécessité pour l'établissement d'être agréé</u> Tous les établissements d'élimination des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> doivent être agréés par l'Autorité compétente. [...]
4.7.6.	72	2. <u>Conditions de délivrance de l'agrément</u> Pour obtenir un agrément l'autorisant à prendre en charge les déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> , un établissement d'élimination doit : [...] d) satisfaire aux exigences en matière de manipulation des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> et des produits spécifiés par l'Autorité compétente. [...] 3. <u>Exigences liées au fonctionnement</u> [...] c) la manipulation et le traitement des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> , qui doivent s'effectuer le plus rapidement possible après réception ; [...]
	73	1. <u>Équarrissage</u> [...] Typiquement, le procédé consiste à préchauffer à 50 - 60 °C puis à cuire la matière première les <u>déchets bruts issus d'animaux aquatiques</u> à 95 - 100 °C pendant 15 à 20 minutes. [...] 2. <u>Incinération</u> [...] Les incinérateurs à rideau d'air mobiles présentent l'avantage de permettre le traitement des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> sur place, rendant de ce fait leur transport inutile. Les incinérateurs n'ont qu'une capacité de traitement limitée des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> .
4.7.7.	74	6. <u>Ensilage</u> [...] Le traitement des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> destinés à l'ensilage par un acide organique tel que l'acide formique constitue une méthode efficace pour inactiver la plupart des <i>agents pathogènes</i> sous 48 heures. [...]
4.7.7.	74	7. <u>Enfouissement</u> [...] Les déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> doivent, autant que possible, être soumis à un traitement qui permet d'inactiver les <i>agents pathogènes</i> préalablement à l'enfouissement. Afin de sélectionner un site d'enfouissement acceptable, il est nécessaire de prendre en considération les aspects ci-après : [...] b) Accès – l'acheminement de l'équipement et des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> au site doit s'effectuer facilement. Il peut être nécessaire d'installer des clôtures et de restreindre l'accès au site. c) Réalisation d'une fosse d'enfouissement – [...] Les dimensions de la fosse dépendent du volume de déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> à enfouir et son remplissage doit être aisé. d) Recouvrement de la fosse – le contenu doit être recouvert de chaux vive (CaO) à raison de 85 kg de chaux pour 1 000 kg de déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> afin d'accélérer le processus de décomposition et de tenir à distance les charognards. 8. <u>Bûcher</u> Le bûcher n'est pas une méthode d'élimination adaptée à des volumes importants de déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> . [...] b) L'accès – l'acheminement de l'équipement nécessaire à la réalisation du bûcher et à son entretien, du combustible et des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> au site doit pouvoir s'effectuer facilement. [...] Un bûcher correctement réalisé doit permettre de brûler les déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> en moins de 48 heures.

4.7.8.	75	<p>1. <u>Ensilage</u></p> <p>Le traitement des déchets d'animaux aquatiques <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> destinés à l'ensilage par un acide organique tel que l'acide formique constitue une méthode efficace pour inactiver la plupart des <i>agents pathogènes</i> sous 48 heures.</p>
5.4.2.	93	<p>[...] Les critères d'inclusion des <i>produits issus d'animaux aquatiques</i> énumérés à l'alinéa 1 de l'article X.X.11. (pour les chapitres spécifiques aux maladies des mollusques), de l'article X.X.12. (pour les chapitres spécifiques aux maladies des amphibiens, des crustacés et des poissons) et de l'article 10.4.16. sont les formes et présentation du produit, le volume de déchets <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> générés attendus par le consommateur et la présence probable d'<i>agents pathogènes</i> viables présents dans ces déchets.</p>
5.4.2.	93	<p>[...]</p> <p>L'hypothèse de départ est (i) que les <i>produits issus d'animaux aquatiques</i> sont destinés à la consommation humaine uniquement, (ii) qu'il n'est pas toujours possible de s'assurer que les déchets <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> générés sont manipulés de manière à limiter le risque d'introduction de l'<i>agent pathogène</i>, l'importance du risque sanitaire encouru dépendant de la gestion des déchets <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> pratiquée dans les pays ou territoires de chacun des États membres ; [...]</p>
5.4.2.	93	<p><b>Critères</b></p> <p>[...]</p> <p>SOIT</p> <p>2) la quantité de déchets <u>déchets bruts issus d'animaux aquatiques</u> générée par le consommateur est telle qu'il paraît peu probable qu'elle ait comme conséquence l'introduction et l'établissement de l'<i>agent pathogène</i> ;</p> <p>SOIT</p> <p>3) l'<i>agent pathogène</i> n'est pas présent à l'état naturel dans les déchets <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> générés par le consommateur.</p>
6.5.3.	129	<p>3. <u>Appréciation du risque d'entrée</u></p> <p>[...]</p> <p>– données sur les tendances et l'apparition de micro-organismes résistants obtenus grâce à la <i>surveillance</i> des <i>animaux aquatiques</i>, des <i>produits issus d'animaux aquatiques</i> et des déchets d'origine animale <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u>.</p> <p>4. <u>Appréciation de l'exposition</u></p> <p>[...]</p> <p>pratiques d'élimination des déchets <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> et probabilité d'<i>exposition</i> humaine à des micro-organismes résistants ou à des déterminants de résistance véhiculés par ces déchets <u>déchets issus d'animaux aquatiques</u> ;</p> <p>[...]</p>

---

[Retour à l'ordre du jour](#)

**Nouveau projet de chapitre sur la sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture (chapitre 4.X) –  
marques de révision apparentes**

CHAPITRE 4.X.

**SÉCURITÉ BIOLOGIQUE  
DANS LES ÉTABLISSEMENTS D'AQUACULTURE**

Article 4.X.1.

**Objectif**

Fournir des recommandations pour l'élaboration et la mise en œuvre de mesures de *sécurité biologique* principalement destinées à atténuer le *risque* d'introduction d'*agents pathogènes spécifiques* dans les *établissements d'aquaculture*, et, dans le cas où ils s'y seraient introduits, d'atténuer le *risque* de propagation ou de dissémination d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*.

Article 4.X.2.

**Champ d'application**

Les principes de *sécurité biologique* sont importants pour l'application des normes figurant dans le *Code aquatique*, à l'échelle d'un pays, d'une *zone*, d'un *compartiment* ou, ~~le cas échéant~~, d'un *établissement d'aquaculture*. Le présent chapitre détaille les recommandations sur la *sécurité biologique* destinées aux *établissements d'aquaculture*, notamment les systèmes semi-ouverts, semi-clos et clos. Il décrit les principes généraux d'élaboration d'un *plan de sécurité biologique*, les différentes ~~types catégories~~ de système de production aquacole, ~~les voies de transmission les plus importantes~~, la gestion de zones partagées, les mesures d'atténuation applicables aux voies de transmission, ~~le recours à la mise en œuvre de l'analyse des risques et d'approches~~ pour l'élaboration du *plan de sécurité biologique* ~~et les composantes essentielles d'un plan~~.

Pour disposer d'orientations spécifiques sur la prévention et le contrôle des *maladies*, il convient de se référer aux autres chapitres du au Titre 4 du Code aquatique.

Article 4.X.3.

**Introduction**

~~Le principe fondamental qui sous-tend la prévention des *maladies des animaux aquatiques* à l'échelle d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* est l'application de mesures de *sécurité biologique*. L'application des mesures de *sécurité biologique* à l'échelle d'un *établissement d'aquaculture* peut faire partie intégrante des mesures de *sécurité biologique* efficaces à l'échelle d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* afin de maintenir pour assurer de façon optimale le statut sanitaire et le bien-être des les populations d'*animaux aquatiques* dans un état sanitaire optimal.~~ Le présent chapitre décrit les principes de la *sécurité biologique* destinés à atténuer les *risques* associés à l'introduction, la propagation ou la dissémination d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*. ~~L'application des mesures de *sécurité biologique* à l'échelle d'un *établissement d'aquaculture* peut faire partie intégrante de mesures de *sécurité biologique* efficaces à l'échelle d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* afin de maintenir les populations d'*animaux aquatiques* dans un état sanitaire optimal.~~

Compte tenu des défis particuliers que constitue la grande diversité des systèmes de production aquacole et des espèces d'*animaux aquatiques* élevées, l'élaboration de *plans de sécurité biologique* pour les *établissements d'aquaculture* nécessite l'*appréciation des risques* de *maladies* associés à des *agents pathogènes* spécifiques et à leurs voies de transmission potentielles. Un *plan de sécurité biologique* décrit la gestion et les mesures physiques et de gestion destinées à atténuer les *risques* identifiés, d'une façon qui soit adaptée aux conditions de l'*établissement d'aquaculture*. Le personnel de l'*établissement d'aquaculture*, et les prestataires de service et les professionnels de la santé des animaux aquatiques ou vétérinaires doivent être engagés dans l'élaboration et la mise en œuvre du *plan de sécurité biologique* afin de s'assurer qu'il est concret et efficace.

Le résultat de la mise en œuvre des mesures de *sécurité biologique* dans les *établissements d'aquaculture* est l'amélioration de la santé et du bien-être des *animaux aquatiques* tout au long du cycle de production. Les bénéfices qui peuvent en résulter ~~résultent~~ incluent notamment un une amélioration de l'accès au marché, et une meilleure productivité (obtenue ~~directement~~ par l'amélioration des taux de survie, de croissance et de conversion alimentaire, et ~~indirectement~~ par la une réduction de l'utilisation du nombre de traitements des produits médicaments ~~médico-vétérinaires (y compris des *agents antimicrobiens*)~~, aboutissant ainsi à une diminution ~~et~~ des coûts de production associés et à un ralentissement du phénomène d'émergence de la résistance aux agents antimicrobiens (RAM).

## Principes généraux

La *sécurité biologique* est un ensemble de mesures physiques et de gestion qui, lorsqu'elles sont utilisées conjointement, réduisent cumulativement le *risque d'infection* chez les populations d'*animaux aquatiques* au sein d'un *établissement d'aquaculture*. La planification et la mise en œuvre de la *sécurité biologique* dans un *établissement d'aquaculture* nécessite de planifier une identification des ~~d'identifier les~~ une identification des ~~risques et de prendre en considération les des les~~ des mesures ayant un rapport coût / efficacité avantageux pour atteindre les objectifs de *sécurité biologique* définis par le plan. Les mesures requises varieront d'un *établissement d'aquaculture* à l'autre, en fonction de facteurs tels que le *risque la probabilité* d'exposition aux *agents pathogènes*, les espèces d'*animaux aquatiques élevés*, la catégorie de système de production aquacole, les pratiques d'élevage, les conditions environnementales et la localisation géographique. ~~Bien que différentes~~ Différentes approches ~~puissent peuvent~~ être adoptées pour atteindre un objectif défini en matière de *sécurité biologique*. ~~Toutefois, les principes généraux d'qui sous-tendent~~ l'élaboration et ~~de la~~ mise en œuvre d'un *plan de sécurité biologique* demeurent constants et sont décrits ci-dessous :

- ~~1)~~ La ~~planification est nécessaire pour détailler les objectifs du *plan de sécurité biologique*, les *risques* identifiés qui doivent être gérés, les mesures qui seront mises en place pour gérer les *risques de maladie*, les procédures de fonctionnement et le suivi nécessaires comme décrit aux articles 4.X.6. et 4.X.7.~~
- ~~21)~~ Les voies de transmission potentielles pour les *agents pathogènes* qui pénètrent, circulent et quittent l'*établissement d'aquaculture* doivent être identifiées comme décrit à l'article ~~aux articles 4.X.5. et~~ 4.X.6. Il doit être tenu compte de la catégorie de système de production aquacole et de la conception de l'*établissement d'aquaculture*.
- ~~32)~~ L'*analyse des risques* doit être réalisée afin d'identifier et d'évaluer les menaces de *maladies* pour la *sécurité biologique* et de s'assurer que le plan prend en compte les *risques* de façon appropriée et efficace. L'*analyse des risques* peut être simple ou au contraire complexe, selon les objectifs du *plan de sécurité biologique*, les conditions au sein de l'*établissement d'aquaculture* et les *risques de maladies*, comme décrit à l'article 4.X.7.
- ~~43)~~ Les mesures de *sécurité biologique* visant à répondre aux *risques de maladies* identifiés doivent être évaluées au regard de leur efficacité potentielle, de leurs coûts initiaux et récurrents (par exemple, des travaux de construction, la maintenance) et des impératifs de gestion, comme décrit à l'article 4.X.7.
- ~~54)~~ Les pratiques de gestion doivent être intégrées dans les procédures de fonctionnement de l'*établissement d'aquaculture* et les formations ~~adéquates correspondantes~~ appropriées doivent être dispensées au personnel, comme décrit à l'article ~~aux articles 4.X.7. et~~ 4.X.8.
- ~~5)~~ Un affichage clair des consignes doit être effectué afin que le personnel, les visiteurs et le public soient sensibilisés et se conforment aux mesures du plan de *sécurité biologique*.
- ~~565)~~ Des registres et une documentation appropriés sont essentiels pour démontrer la mise en œuvre effective du *plan de sécurité biologique*. Des exemples sont présentés décrits à l'article 4.X.8.
- ~~676)~~ Un calendrier de révisions périodiques et d'audits du *plan de sécurité biologique* doit être établi, ainsi que les Les éléments événements identifiés comme déclencheurs d'une révision *ad hoc* doivent être déterminés (par exemple, l'apparition de *foyers de maladie* et les des modifications apportées à l'infrastructure, aux techniques de production ou au profil de *risques* ainsi que l'apparition de *foyers de maladie*). Un audit réalisé ~~Des audits réalisés~~ par des organismes tiers peuvent s'avérer nécessaires lorsque la reconnaissance des mesures de *sécurité biologique* est exigée par les consommateurs, les régulateurs ou pour l'accès au marché, comme décrit comme précisé décrit à l'article 4.X.8.

## Catégories de systèmes de production aquacole

~~Les *animaux aquatiques* peuvent être élevés dans~~ Il existe quatre différentes catégories de systèmes de production aquacole, qui sont définies en fonction de la capacité à traiter l'eau d'entrée et de sortie du système et du niveau de contrôle exercé sur les *animaux aquatiques* et les *vecteurs*. Ces ~~mesures~~ facteurs doivent être prises en considération lors de l'élaboration du *plan de sécurité biologique*.

### Systèmes ouverts

Dans un système de production aquacole ouvert, aucun contrôle ne peut être exercé sur ~~Les systèmes de production aquacole ouverts ne permettent pas de contrôler~~ l'eau, les conditions environnementales, et les animaux ~~et~~ ou les *vecteurs*. Parmi ces systèmes de production peuvent figurer ceux utilisés aux fins de l'augmentation des stocks de populations d'*animaux aquatiques* sauvages, qui hébergent des animaux issus d'établissements d'aquaculture ou de l'environnement naturel. Étant donné que ces systèmes ne peuvent pas être considérés comme des « *établissements d'aquaculture* », ils ne seront pas traités dans le présent chapitre. Toutefois, les mouvements d'*animaux aquatiques* issus d'entre les établissements d'aquaculture vers et les systèmes ouverts doivent toujours être faire l'objet d'une appréciation afin de déterminer s'il est nécessaire de mettre en œuvre soumis à des mesures d'atténuation du *risque de maladie*.

## Systèmes semi-ouverts

Dans un système de production aquacole semi-ouvert, il n'est possible de contrôler ni l'eau d'entrée ou de sortie du système, ni les conditions environnementales. Certains *animaux aquatiques* et certains *vecteurs* peuvent également s'introduire dans le système et en sortir. Parmi les exemples de systèmes semi-ouverts de production aquacole figurent les enclos en filets immergés ou les cages pour les poissons et les nacelles en suspension ou les systèmes de cordes pour les élevages de mollusques, dans des étendues d'eaux naturelles et les élevages de mollusques, sur des supports en suspension dans l'eau ou reposant sur le fond marin.

## Systèmes semi-clos

Dans un système de production aquacole semi-clos, un contrôle partiel peut être exercé sur l'eau d'entrée et de sortie du système ainsi que sur les conditions environnementales. Il est possible de prévenir l'introduction ou la sortie des *animaux aquatiques* et des *vecteurs* du système ; toutefois, le contrôle de l'introduction et de la sortie des *agents pathogènes* demeure limité. Parmi les exemples de systèmes de production aquacole semi-clos figurent les bassins, les bassins de type « couloir », les cages flottantes couvertes enclos flottants et les cuves à circulation d'eau continue.

## Systèmes clos

Dans un système de production aquacole clos, le contrôle exercé sur l'eau d'entrée et de sortie est suffisant pour ~~permettre~~ d'exclure du système les *animaux aquatiques*, les *vecteurs* et les *agents pathogènes*. Les conditions environnementales peuvent être également contrôlées. Parmi les exemples de système de production aquacole clos figurent les systèmes de production aquacole en circuit recirculé, les systèmes de production approvisionnés en eau salubre exempte d'*agents pathogènes* ou d'*animaux aquatiques* (par exemple, les eaux souterraines) ou les systèmes de production dont les eaux d'entrée et de sortie sont traitées de façon intensive et répétée. ~~Les conditions environnementales peuvent également être contrôlées.~~

### Article 4.X.5.bis

## Gestion des zones partagées

Il peut s'avérer impossible de contrôler la transmission des *agents pathogènes* entre les établissements d'aquaculture semi-ouverts ou semi-clos, établis à proximité d'étendues d'eaux partagées. Dans ces conditions, un ensemble cohérent de mesures de sécurité biologique doit être appliqué par l'ensemble des établissements d'aquaculture considérés comme épidémiologiquement liés. Des accords de gestion des zones partagées peuvent formaliser la coordination des mesures de sécurité biologique communes à l'ensemble des établissements d'aquaculture épidémiologiquement liés.

### Article 4.X.6.

## Voies de transmission, et risques associés et mesures d'atténuation

Les voies de transmission permettant la propagation, la dissémination et le rejet d'*agents pathogènes* au sein ou par les établissements d'aquaculture sont diverses. L'identification de l'ensemble des voies de transmission potentielles est essentielle à l'élaboration d'un *plan de sécurité biologique* efficace. Il y a lieu de privilégier ~~les stratégies limitant l'exposition des animaux aquatiques sensibles à des concentrations élevées en agents pathogènes.~~ les mesures permettant d'interrompre les voies de transmission probables d'*agents pathogènes* spécifiques.

Les *risques* associés à l'introduction, la propagation ou la dissémination d'*agents pathogènes* au sein ou par les établissements d'aquaculture doivent être pris en considération pour chacune des voies de transmission suivantes :

### 1. Les animaux aquatiques

Les mouvements d'*animaux aquatiques* dans, au sein ou à partir d'établissements d'aquaculture, qu'ils soient ou non intentionnels, ~~peuvent représenter~~ ont généralement peuvent présenter une probabilité élevée ~~un risque élevé~~ de transmission de ~~transmettre~~ des ~~des~~ *agents pathogènes*. Tel est notamment le cas lorsque des *animaux aquatiques* infectés, présentant ou non des signes cliniques, ou lorsque des *animaux aquatiques* dont le statut sanitaire est inconnu, sont transférés au sein d'une population sensible.

Parmi les *animaux aquatiques* introduits, ou déplacés, de façon intentionnelle dans un établissement d'aquaculture ~~ou déplacés à l'intérieur de celui-ci~~ peuvent se trouver les géniteurs, les larves, les stocks de juvéniles destinés au grossissement et le matériel génétique tel que les œufs et la laitance. Les mécanismes de la transmission horizontale comme ceux de la transmission verticale des agents pathogènes doivent être pris en considération pour les *animaux aquatiques*. Il est possible nécessaire de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par les *animaux aquatiques*, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes ; ~~parmi les mesures d'atténuation possibles figurent :~~

- a) ~~en n'introduisant uniquement~~ l'introduction, dans l'établissement d'aquaculture, que des ~~des~~ *animaux aquatiques* limitée dont le statut sanitaire est connu, que ce statut soit équivalent ou plus élevé que celui des animaux présents dans l'établissement ;

- b) ~~en plaçant en quarantaine~~ le placement en quarantaine des animaux aquatiques introduits et dont le statut au regard des *maladies* est inconnu dans des unités de production séparées de celles des autres populations d'élevage ou dans des installations de *quarantaine* dédiées ; en cas d'introduction d'animaux aquatiques dont le statut au regard des *maladies* est inconnu, procéder à leur placement en *quarantaine* ;
- c) le cas échéant, ~~en traitant les~~ le traitement des ~~traiter les~~ animaux aquatiques placés en *quarantaine* afin d'atténuer les risques de *maladies* (par exemple, un traitement antiparasitaire externe pour les parasites externes) ;
- d) ~~en assurant, l'assurance,~~ s'assurer, lors du transport des *animaux aquatiques*, de la mise en place des conditions de *sécurité biologique* permettant de prévenir l'exposition des animaux aquatiques aux agents pathogènes et la dissémination de ces derniers ;
- e) ~~en conditionnant le~~ le conditionnement du ~~conditionner le~~ déplacement des *animaux aquatiques* au sein des différentes populations de l'établissement à la prise en considération des *risques* de *maladies*, afin de maintenir le plus élevé possible le statut sanitaire de la population d'*animaux aquatiques* ;
- f) ~~en isolant l'isolement~~ lorsque l'opération est possible, isoler des autres populations les populations d'*animaux aquatiques* présentant des signes cliniques de *maladie* jusqu'à ce que la cause soit identifiée et que la situation soit réglée ;
- g) ~~en retirant les~~ le retrait des ~~retirer les~~ animaux aquatiques malades moribonds ou morts des unités de production le plus rapidement possible et ~~en les éliminant~~ leur élimination les éliminer dans les conditions de *sécurité biologique* adéquates conformément au chapitre 4.7. ;
- h) ~~le signalement de~~ signaler à l'Autorité compétente les mortalités inexplicables ou inhabituelles ou d'une toute suspicion d'une *maladie* à déclaration obligatoire ou d'une maladie émergente touchant les *animaux aquatiques*, conformément aux exigences locales ; l'investigation et le *diagnostic* de la cause des mortalités doivent être entrepris par des *professionnels de la santé des animaux aquatiques* ou des *vétérinaires* ;
- i) dans la mesure du possible, ~~le~~ procéder au dépeuplement total au retrait des animaux aquatiques de l'ensemble ou d'une partie de l'établissement d'aquaculture à intervalles réguliers, par exemple entre deux générations d'*animaux aquatiques* ou deux cycles de production, suivi par un nettoyage, et une *désinfection* et un séchage des installations de production ; un *vide sanitaire* des sites doit être instauré pendant une période suffisante pour interrompre le cycle de l'*infection* et réduire ou éliminer l'exposition à un agent pathogène lors du repeuplement en *animaux aquatiques* ; l'instauration du *vide sanitaire* doit être réalisée de façon coordonnée entre les établissements d'aquaculture qui sont épidémiologiquement liés par des étendues d'eaux partagées ;
- j) le cas échéant, ~~en évitant l'évitement de~~ tout mouvement non intentionnel d'*animaux aquatiques* dans, au sein ou à partir de l'établissement La prise en considération de envisager le recours à des mesures physiques afin de réduire au minimum la probabilité que des animaux aquatiques d'élevage s'évadent ou que des animaux aquatiques sauvages s'introduisent au sein de l'établissement d'aquaculture ; la probabilité d'introduction ou d'évasion des animaux aquatiques sera plus élevée pour les systèmes semi-ouverts que pour les systèmes clos ou semi-clos.

Le niveau de *risque* associé aux mouvements non intentionnels d'*animaux aquatiques* sera influencé par la catégorie de système de production aquacole, la probabilité étant plus forte dans le cas des systèmes semi-ouverts que dans celui des systèmes clos. Si ce niveau de *risque* s'avère élevé, la mise en place de mesures d'atténuation physiques pourra s'avérer nécessaire.

## 2. Les Produits issus d'animaux aquatiques et les déchets issus d'animaux aquatiques

Les *produits issus d'animaux aquatiques* peuvent également être introduits, ~~ou~~ déplacés au sein ou à partir d'un établissement d'aquaculture ; par exemple, les *produits issus d'animaux aquatiques* récoltés sur d'autres sites. Les déchets issus d'animaux aquatiques comprennent l'ensemble ou des parties du corps des *animaux aquatiques* morts ou ayant été tués à des fins de contrôle des *maladies* ainsi que des *animaux aquatiques* abattus et qui ne sont pas destinés à la consommation humaine. peuvent être générés par la mort ou la mise à mort d'animaux aquatiques à des fins de contrôle des maladies ou par leur abattage et leur transformation en vue de leur consommation par l'homme ou de leur utilisation à d'autres fins.

Les mouvements des produits issus d'animaux aquatiques et des déchets issus d'animaux aquatiques dans, au sein et à partir des établissements d'aquaculture peuvent représenter un *risque* de transmission d'*agents pathogènes*. Tel est notamment le cas lorsqu'une population sensible est exposée à des produits issus d'animaux aquatiques et à des déchets issus d'animaux aquatiques infectés, qu'ils présentent ou non des signes cliniques. Les déchets à haut risque risque élevé sont les déchets issus d'animaux aquatiques qui constituent ou sont suspectés de constituer un *risque* sanitaire élevé significatif pour les *animaux aquatiques*. Dans la mesure du possible, les Les mouvements de déchets issus d'animaux aquatiques au sein des établissements d'aquaculture doivent être évités. Les déchets issus d'animaux aquatiques doivent être entreposés, transportés, éliminés et traités en conformité avec les orientations fournies par comme décrit dans le chapitre 4.7. « Manipulation, élimination et traitement des déchets issus d'animaux aquatiques ».

Dans le cas de mouvements intentionnels de produits issus d'animaux aquatiques et de déchets issus d'animaux aquatiques, la probabilité de la présence d'*agents pathogènes* dans les *animaux aquatiques* qui les ont générés doit être évaluée en prenant en considération l'espèce, la source et le statut sanitaire.

Il est ~~possible~~ nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission d'agents pathogènes par les produits issus d'animaux aquatiques et par les déchets issus d'animaux aquatiques, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes ; parmi les mesures d'atténuation possibles figurent :

- a) ~~en déterminant le la détermination du~~ déterminer le *risque* de *maladie* potentiel que représentent les produits issus d'animaux aquatiques et les déchets issus des d'animaux aquatiques pour les animaux aquatiques présents dans l'établissement et l'environnement ;
- b) ~~la gestion des gérer les produits issus d'animaux aquatiques et des les déchets issus d'animaux aquatiques dans des zones, au sein de l'établissement d'aquaculture, qui sont isolées en isolant les l'isolement des zones de l'établissement d'aquaculture dans lesquelles les produits et déchets issus d'animaux aquatiques sont gérés à partir des populations d'animaux aquatiques afin de réduire au minimum les risques de transmission de maladies identifiés ;~~
- c) ~~en s'assurant l'assurance~~ s'assurer que les systèmes des procédures sont mises en place de façon appropriée pour la collecte, le traitement (inactivation des *agents pathogènes*), le transport, l'entreposage ou l'élimination des produits issus d'animaux aquatiques et des déchets issus d'animaux aquatiques, en vue de réduire au minimum les *risques* de transmission de maladies identifiés des agents pathogènes.

### 3. L'eau

Si l'eau L'eau est un atout majeur pour la productivité et la santé des animaux aquatiques, cette dernière peut représenter néanmoins représenter un risque d'introduction, de propagation et de rejet d'*agents pathogènes* au sein ou par les établissements d'aquaculture. La source de l'eau et le lien épidémiologique qu'elle peut représenter soit entre l'établissement d'aquaculture et les autres populations, qu'elles soient d'élevage ou sauvages, soit entre l'établissement d'aquaculture et les établissements de transformation, doivent être identifiés et pris en considération. Il doit être également tenu compte de l'exposition aux eaux de transport et de ballast.

Pour l'établissement d'aquaculture, l'importance du *risque* d'exposition à de l'eau contenant des *agents pathogènes* peut être influencée par la catégorie de systèmes de production aquacole, la probabilité étant plus forte dans le cas des systèmes semi-ouverts que dans celui des systèmes semi-clos et clos. Toute eau dans laquelle évoluent des *animaux aquatiques* dont le statut sanitaire est plus faible ou inconnu représente un *risque* potentiel de transmission d'*agents pathogènes* à des *animaux aquatiques* ayant un statut sanitaire plus élevé.

Il est ~~possible~~ nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission de l'*agent pathogène* par l'intermédiaire de l'eau, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes ; parmi les mesures d'atténuation possibles figurent :

- a) si possible, ~~en choisissant le choix des~~ choisir des une sources d'eau entièrement exemptes de populations d'*animaux aquatiques* sensibles et d'*agents pathogènes* jugés préoccupants ; ce type de sources peut inclure les eaux souterraines, qu'elles soient salées ou douces, l'eau du réseau municipal préalablement déchlorée et l'eau de mer artificielle ; ces sources d'eau peuvent être particulièrement adaptées pour les *animaux aquatiques* ayant un statut sanitaire élevé tels que les géniteurs ;
- b) ~~en assurant l'assurance~~ s'assurer d'un niveau approprié de tamisage, de filtration ou de désinfection (conformément au chapitre 4.3.) des eaux provenant de sources dont il est probable qu'elles contiennent des *espèces sensibles* et qui peuvent présenter un *risque* de transmission de l'*agent pathogène* (par exemple, les océans, les ruisseaux ou les lacs) ; le type et le niveau de traitement requis sera seront fonction des *risques* identifiés ;
- c) ~~l'assurance~~ s'assurer d'un niveau approprié de filtration, et de désinfection ou de capacité de rétention (conformément au chapitre 4.3.) des effluents (et des déchets filtrés associés) provenant des établissements d'aquaculture (ou des ateliers d'abattage ou de transformation associés) et qui peuvent présenter un *risque* de transmission d'*agents pathogènes* aux *animaux aquatiques sauvages* ou à d'autres établissements d'aquaculture hébergeant des *espèces sensibles* ; le type et le niveau de traitement nécessaires ~~sera~~ seront fonction des *risques* identifiés ;
- ed) ~~En choisissant le choix de~~ choisir la localisation des arrivées et sorties d'eau des établissements d'aquaculture de type semi-clos et clos et la localisation des établissements d'aquaculture de type semi-ouvert de façon à minimiser le *risque* de contamination par les autres populations d'élevage et sauvages ainsi que par les établissements de transformation, en prenant en compte certains facteurs tels que la distance et les courants ;
- e) apprécier la probabilité que de l'eau contaminée puisse pénétrer soit lors d'inondations d'origine extérieure soit en raison d'infrastructures détériorées (par exemple, fuite de conduites, obstruction de drains, rupture de mur de protection) et appliquer des mesures de gestion ou infrastructurelles appropriées ;
- f) apprécier le risque et établir les procédures de traitement et d'élimination des eaux usées générées par le transport des animaux aquatiques.



#### 4. L'aliment pour animaux aquatiques

L'aliment pour animaux aquatiques peut constituer une voie de transmission importante d'agents pathogènes aux animaux aquatiques. L'aliment pour animaux aquatiques fabriqué à partir d'animaux aquatiques infectés peut contenir des agents pathogènes ou être contaminé au cours de la récolte, du transport, de l'entreposage ou de la transformation. L'aliment pour animaux aquatiques peut être initialement contaminé par les contenir des agents pathogènes ou être contaminé au cours de la récolte, du transport, de l'entreposage et de la transformation des marchandises utilisées comme ingrédients d'aliments pour animaux aquatiques. De mauvaises conditions d'hygiène peuvent être à l'origine de contaminations lors de la fabrication, du transport, de l'entreposage et de l'utilisation des aliments pour animaux aquatiques.

Dans les systèmes de production clos ou semi-clos, il est possible d'exercer un haut niveau de contrôle sur les l'aliments pour animaux aquatiques. En revanche, dans les systèmes de production semi-ouverts, les animaux aquatiques peuvent prélever de la nourriture dans leur environnement (par exemple, les mollusques, qui se nourrissent par filtration et les poissons sauvages qui peuvent être l'objet de prédation dans les enclos en filets ou les poissons élevés dans les enclos en filets ou cages, qui s'attaquent aux poissons sauvages s'y introduisant). En outre, le risque de transmission de maladies par l'aliment pour animaux aquatiques à l'environnement doit également être géré.

Il est possible nécessaire d'apprécier et de gérer le risque de transmission d'agents pathogènes par l'intermédiaire des aliments pour animaux aquatiques au moyen des mesures d'atténuation conformément précisées décrites au chapitre 4.8., par exemple en utilisant des aliments pour animaux aquatiques ou des ingrédients d'aliments pour animaux aquatiques qui :

- a) ont subi une transformation suffisante pour inactiver les agents pathogènes jugés préoccupants ;
- b) proviennent de sources déclarées indemnes d'agents pathogènes jugés préoccupants ou pour lesquelles il a été confirmé (par un test par exemple) que les agents pathogènes n'étaient pas présents dans la marchandise dans les aliments pour animaux aquatiques ou dans les ingrédients d'aliments pour animaux aquatiques;
- c) ont été transformés, fabriqués, entreposés, et transportés et livrés pendant le nourrissage des animaux aquatiques, de façon à prévenir toute contamination par des agents pathogènes.

#### 5. Les fFomites

L'équipement, les véhicules, les matériaux d'emballage, les vêtements, les chaussures, les sédiments, l'infrastructure et les autres objets contaminés fomites peuvent transférer de façon mécanique des agents pathogènes dans, au sein, et à partir d'un établissement d'aquaculture.

Le niveau de risque La probabilité de transfert d'agents pathogènes dépendra de la résistance de l'agent pathogène dans l'environnement, de la présence et de la nature de la matière organique sur la surface de l'objet contaminé, ainsi que du type de surface et de sa capacité à retenir l'eau. Le risque La probabilité de transfert d'agents pathogènes peut être plus importante pour les objets contaminés fomites qui sont difficiles à nettoyer et à désinfecter. L'équipement qui est partagé Le partage de l'équipement par plusieurs établissements d'aquaculture, ou qui est partagé par les des établissements d'aquaculture et les installations de transformation, ou bien encore qui est partagé par différentes unités de production ayant des statuts sanitaires différents au sein d'un même établissement d'aquaculture, ou par des établissements d'aquaculture et des installations de transformation peut avoir comme conséquence la propagation des agents pathogènes présenter un risque plus élevé que celui du matériel neuf ou dédié. Il est possible nécessaire d'apprécier et de gérer le risque la probabilité le risque de transmission d'agents pathogènes par l'intermédiaire des fomites objets contaminés, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes ; parmi les mesures d'atténuation possibles figurent :

- a) en évaluant le l'évaluation du apprécier le risque de maladie associé à tout objet contaminé introduit transféré dans, au sein ou à partir de l'établissement d'aquaculture ;
- b) en s'assurant l'assurance s'assurer que des procédures et des infrastructures sont en place afin de nettoyer et désinfecter les fomites, y compris les zones désignées pour la livraison et le chargement, préalablement à l'entrée dans l'établissement d'aquaculture conformément au chapitre 4.3. ; les recommandations relatives au nettoyage et à la désinfection des fomites sont décrites au chapitre 4.3. ;
- e) en attribuant l'attribution d'un équipement dédié à l'usage des unités de production ayant un statut sanitaire différent ; lorsque l'équipement doit être utilisé dans plusieurs unités de production, il doit alors être nettoyé et désinfecté préalablement à tout déplacement d'une unité à l'autre.
- c) dans la mesure du possible, l'attribution dédier les objets difficiles à désinfecter, ou pour lesquels la probabilité de contamination est élevée, à un établissement d'aquaculture spécifique ou à des zones au sein de cet établissement, plutôt que les déplacer ; leurs mouvements d'un établissement d'aquaculture à un autre, après l'opération de désinfection, est à éviter ;
- d) l'application des appliquer les mesures d'atténuation décrites aux points a) à c) aux mouvements des fomites entre les unités de production d'un établissement d'aquaculture ; le choix des mesures reposera sur les résultats de l'évaluation du risque de transmission de maladies.

## 6. Les vecteurs

Les vecteurs peuvent transporter transférer transmettre les agents pathogènes et ainsi contaminer les animaux aquatiques sensibles dans les établissements d'aquaculture. Parmi les vecteurs se trouvent peuvent se trouver les animaux aquatiques sauvages s'introduisant dans le système par l'approvisionnement en eau mais aussi les prédateurs, les oiseaux sauvages, les charognards, et les animaux nuisibles tels que les rongeurs et les personnes. Les vecteurs peuvent également introduire, propager et disséminer transmettre des agents pathogènes au sein et par un établissement d'aquaculture, que ce soit par transfert mécanique ou comme hôte intermédiaire du cycle de l'agent pathogène. La catégorie du système de production aquacole aura une influence sur le risque d'exposition non intentionnelle aux vecteurs.

Le niveau de risque La probabilité que les vecteurs transfèrent transmettent des agents pathogènes de transfert d'agents pathogènes par les vecteurs varie selon les espèces le type de vecteurs, la nature de l'agent pathogène, la catégorie de système de production aquacole et le niveau de sécurité biologique. Les mesures identifiées pour atténuer les risques associés aux animaux aquatiques, telles que décrites au point 1, permettent également d'atténuer les risques associés aux vecteurs. Parmi les mesures d'atténuation applicables à d'autres vecteurs figurent :

Il est nécessaire d'apprécier et de gérer le risque de transmission d'agents pathogènes par les vecteurs, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes :

- a) la mise en place de filets de protection (afin de bloquer l'accès pour les oiseaux) ; appliquer des mesures d'atténuation physiques afin de prévenir l'introduction des vecteurs dans les établissements d'aquaculture peut consister en :
  - i) la filtration ou le tamisage du flux entrant et sortant d'eau dans les systèmes de production aquacole semi-clos et clos afin de prévenir l'introduction des animaux aquatiques sauvages ;
  - ii) l'installation d'une clôture ou d'un mur autour des systèmes de production aquacole continentale afin de prévenir l'introduction d'animaux et de personnes, ainsi qu'un accès au site contrôlé par une barrière pour les personnels autorisés et les visiteurs ;
  - iii) l'installation de barrières autour des systèmes de production aquacole flottants, dans le périmètre de l'établissement d'aquaculture, afin de prévenir tout contact avec les animaux aquatiques sauvages et d'autres animaux ou leur introduction ;
  - iv) l'installation de filets de protection des dans les systèmes de production aquacole extérieurs extérieurs ou non clos contre les oiseaux ;
- b) la mise en place de barrières dans le périmètre de l'établissement, afin de prévenir l'introduction d'autres animaux (par exemple des clôtures électrifiées) ;
- b) l'accès du personnel aux établissements d'aquaculture doit être contrôlé en établissant une délimitation entre la zone externe à risque et la zone interne où la sécurité biologique est assurée, et qui comprend notamment les installations :
  - i) dédiées au changement de tenue et de chaussures ou à l'utilisation de tenues à usage unique (charlottes, blouses, surchaussures) ;
  - ii) dédiées à la désinfection des mains et à l'utilisation de pédiluves ;
- eb) contrôler les nuisibles ainsi que l'entreposage sécurisé des aliments pour animaux aquatiques et des animaux morts.

## 7. Le personnel et les visiteurs

- a) L'accès du personnel et des visiteurs aux établissements d'aquaculture doit être contrôlé en établissant une délimitation entre la zone externe à risque et la zone interne où la sécurité biologique est assurée, et qui comprend notamment les installations :
  - i) dédiées à l'enregistrement des visiteurs ; devront figurer sur le registre le nom des visiteurs, leurs coordonnées et le signalement de leur exposition à des animaux aquatiques ou à des agents pathogènes pendant une période précédant la visite, notamment lors de visites d'autres établissements d'aquaculture ou d'autres installations ;
  - ii) dédiées au changement de tenue et de chaussures ou à l'utilisation de tenues à usage unique (par exemple, des charlottes, des blouses, des gants et des surchaussures) ;
  - iii) dédiées à la désinfection des mains et à l'utilisation de pédiluves.
- b) Tous les visiteurs doivent être informés et encadrés de façon à garantir le respect du plan de sécurité biologique.
- c) Un affichage clair des consignes doit être effectué afin que le personnel, les visiteurs et le public soient sensibilisés et se conforment aux mesures du plan de sécurité biologique.

## Analyse des risques

L'*analyse des risques* est une approche communément acceptée pour l'évaluation des menaces à la *sécurité biologique* et est utilisée comme appui à l'élaboration de mesures d'atténuation. Une *analyse des risques* formelle comprend quatre volets : l'*identification du danger*, l'*appréciation du risque*, la *gestion du risque* et la *communication relative au risque* (voir chapitre 2.1.). Cet article précise les principes figurant au décrets dans le chapitre 2.1. en vue du afin d'accompagner le développement de plans de la sécurité biologique dans les établissements d'aquaculture.

Un plan de sécurité biologique peut ne pas nécessiter la conduite d'une *analyse des risques* approfondie pour apprécier les risques de maladies en lien avec les voies de transmission. L'approche choisie peut dépendre des objectifs du plan de sécurité biologique, du niveau de sécurité biologique approprié au regard des exigences de productions spécifiques de l'établissement d'aquaculture, de la complexité des menaces auxquelles il faut répondre ainsi que de la disponibilité des informations et des ressources. Selon les circonstances, il peut être approprié de conduire une analyse partielle et cette analyse partielle pourra s'appuyer sur de précédentes expériences pour identifier les dangers associés aux voies de transmissions correspondantes.

Les trois étapes formelles du processus d'*analyse des risques* sur lequel repose le un plan de sécurité biologique sont :

### Étape 1 – L'identification du danger

L'identification du danger a pour objectif de déterminer les agents pathogènes qui doivent faire l'objet de l'*appréciation du risque*. Un danger peut être un agent pathogène spécifique ou un groupe d'agents pathogènes désigné sous un terme plus général. Cette étape nécessite l'identification et le recueil d'informations pertinentes sur les agents pathogènes susceptibles de causer des maladies chez les populations d'animaux aquatiques présentes au sein d'un établissement d'aquaculture. Le processus doit prendre en considération le statut sanitaire des animaux aquatiques de l'établissement et, dans le cas des systèmes semi-ouverts et semi-clos de production aquacole, le statut sanitaire des animaux aquatiques présents dans les zones ayant un lien épidémiologique avec l'établissement. L'étape suivante vise à identifier les maladies connues et émergentes absentes de l'établissement d'aquaculture, et qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur les populations d'élevage. Les maladies connues et les maladies émergentes, qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur les populations d'élevage, doivent être identifiées, qu'elles soient ou non présentes dans l'établissement d'aquaculture.

En vue de compléter les prochaines étapes de l'*appréciation du risque*, l'information nécessaire relative à l'identification des dangers est requise et inclut : i) la fréquence d'apparition, ii) les caractéristiques biophysiques, iii) la probabilité de détection en cas de présence avérée et iv) les voies de transmission possibles (décrites dans l'article 4.X.6.). De nombreux dangers ont les mêmes voies de transmission. Les voies de La transmission de nombreux dangers sont similaires Un danger peut être un agent pathogène spécifique ou un groupe d'agents pathogènes désigné sous un terme plus général.

### Étape 2 – L'appréciation du risque

La réalisation d'une *appréciation du risque* peut être initiée dès lors que l'existence d'un danger biologiques a été établie et que les éléments d'informations exigés et listés à l'étape 1 ont été recueillis. L'objectif de l'*appréciation du risque* est d'établir une estimation du risque, qui est une combinaison des résultats de la probabilité de survenue d'un danger et de l'appréciation des conséquences de l'introduction, de la propagation et du rejet d'un agent pathogène dans et par l'établissement d'aquaculture.

Une *appréciation du risque* peut être réalisée selon une méthode quantitative ou une méthode qualitative. Les deux méthodes reposent sur le même concept, à savoir l'identification des étapes nécessaires à l'introduction, l'établissement et la propagation du danger. Dans le cas de la méthode qualitative d'*appréciation du risque*, la probabilité d'introduction et d'établissement est estimée au moyen de descripteurs de probabilité. Dans le cas de la méthode quantitative d'*appréciation du risque*, il est nécessaire de disposer de données à partir desquelles la probabilité est estimée. Dans la plupart des cas, la probabilité de transmission de la maladie et ses conséquences les voies de transmission seront évaluées de façon qualitative mais dans le cadre d'une *appréciation du risque* formelle. Des exemples de descripteurs qualitatifs utilisés pour la probabilité de survenue et l'*appréciation* des conséquences figurent dans les tableaux 1 et 2. Le tableau 3 illustre la façon dont les estimations de la probabilité de survenue et l'*appréciation* des conséquences peuvent être combinés au sein d'une matrice afin de donner une estimation du risque. Le tableau 4 fournit une interprétation des estimations du risque.

**Tableau 1. Descripteurs qualitatifs de la probabilité de survenue**

Estimation	Descripteur
Improbable	Pas d'antécédent de survenue mais celle-ci n'est Survenue très improbable mais pas impossible.
Peu probable	Il peut y avoir survenue, mais seulement dans de rares circonstances.
Possible	Les preuves recueillies suggèrent clairement que la survenue est possible dans cette situation.
Probable	La survenue est probable mais pas certaine.
Certain	La survenue est certaine.

**Tableau 2. Descripteurs qualitatifs de l'appréciation des conséquences**

Estimation	Descripteur <u>des conséquences à l'échelle de l'établissement d'aquaculture</u>
Insignifiant	L'impact est indétectable ou minime. <u>Il n'y a pas impact sur les échanges commerciaux.</u>
Mineur	L'impact sur la productivité de l' <u>établissement d'aquaculture</u> est limité à certaines unités de production ou à une courte période. <u>La diminution de la productivité ne concerne qu'un faible nombre d'unités ou les échanges commerciaux sont perturbés pendant une courte période et/ou de façon très limitée et transitoire.</u>
Modéré	L'impact sur la productivité de l' <u>établissement d'aquaculture</u> est généralisé en raison de l'augmentation des mortalités ou de la diminution des performances. <u>La productivité diminue (par exemple, en raison d'une augmentation constante des mortalités ou d'une diminution du taux de croissance) et/ou les échanges commerciaux sont perturbés sur le court ou le moyen terme, avec pour résultat une perte financière.</u>
Majeur	L'impact sur la productivité de l' <u>établissement d'aquaculture</u> est considérable, avec pour résultat des difficultés d'approvisionnement et des conséquences financières importantes. <u>La production diminue fortement de façon considérable et/ou les échanges commerciaux sont perturbés sur le moyen ou le long terme, avec pour résultat une perte financière significative.</u>
Catastrophique	Dépeuplement total <u>Perte de production totale</u> de l' <u>établissement d'aquaculture</u> et possiblement obstacles au redémarrage de la production. <u>La perte de production est totale et il y a possiblement des obstacles au redémarrage de la production et/ou les échanges commerciaux sont bloqués, avec pour résultat une immense perte financière extrêmement lourde.</u>

**Tableau 3. Matrice pour l'estimation du risque**

Estimation de la probabilité de survenue	Estimation de l'appréciation des conséquences					
	Insignifiant	Mineur	Modéré	Majeur	Catastrophique	
Improbable	Négligeable	Faible	Faible	Faible	Moyen	
Peu probable	Faible	Faible	Moyen	Moyen	Elevé	
Possible	Faible	Moyen	Moyen	Elevé	Elevé	
Probable	Faible	Moyen	Elevé	Elevé	Extrême	
Certain	<del>Moyen-Faible</del>	Elevé	Elevé	Extrême	Extrême	

Les résultats de l'appréciation des risques informent sur les dangers biologiques qu'il est nécessaire de prendre en compte, sur les points de contrôle critiques à cibler pour **appréhender la gestion des** les voies de transmission et sur les mesures qui seront probablement les plus efficaces pour réduire le *risque*.

**Tableau 4. Interprétation des estimations du risque**

Niveau de <u>Estimation du risque*</u>	Explication et réponse apportée en matière de gestion
Négligeable	Niveau de <i>risque</i> acceptable. Aucune action n'est requise.
Faible	Niveau de <i>risque</i> acceptable. Un suivi permanent peut être requis.
Moyen	Niveau de <i>risque</i> inacceptable. <u>Une gestion active est requise afin de réduire le niveau de <i>risque</i>. Réexaminer et renforcer les mesures d'atténuation du <i>risque</i>.</u>
Élevé	Niveau de <i>risque</i> inacceptable. <u>Une intervention est requise afin d'atténuer le niveau de <i>risque</i>. Identifier et mettre en place des mesures d'atténuation du <i>risque</i> additionnelles.</u>
Extrême	Niveau de <i>risque</i> inacceptable. <u>Une intervention d'urgence est requise afin d'atténuer le niveau de <i>risque</i>. Mettre immédiatement en place des actions afin d'atténuer le <i>risque</i>.</u>

\*Le niveau de l'estimation du *risque* est déterminé en combinant les résultats des estimations de la probabilité de survenue à ceux de l'appréciation des conséquences au moyen d'une matrice pour l'appréciation estimation du risque (tableau 3). Les estimations de la probabilité de survenue et celles de l'appréciation des conséquences sont combinées au moyen de la matrice pour l'estimation du *risque* (Tableau 3) afin d'obtenir une estimation du *risque*.

### Étape 3 – La gestion du risque

La *gestion du risque* est utilisée pour déterminer la réponse appropriée en matière de gestion pour le niveau de *risque* apprécié comme décrit dans le tableau 4. Le processus d'*appréciation du risque* identifie les étapes de la transmission présentant le plus grand *risque*, permettant ainsi de déterminer les mesures d'atténuation les plus efficaces. La transmission de nombreux *dangers* est similaire : par conséquent, les mesures d'atténuation peuvent être efficaces contre plus d'un *danger*. Les informations sur les dangers et leur voie d'introduction (étape 1) doivent être utilisées en combinaison avec les résultats de l'appréciation du *risque* obtenus pour chacune des voies de transmission (étape 2) afin d'identifier les mesures d'atténuation du *risque* les plus appropriées et les plus efficaces en termes de coût.

L'article X.X.6. décrit certaines des mesures d'atténuation possibles qu'il est pertinent de mettre en œuvre pour les différents modes de transmission. Les mesures d'atténuation les plus appropriées pour un *établissement d'aquaculture* dépendront des ~~risques dangers~~ identifiés, de l'efficacité et de la fiabilité de la mesure d'atténuation, de la catégorie du système de production aquacole et du coût.

À la suite de la mise en œuvre du *plan de sécurité biologique*, les *dangers* devraient être réévalués régulièrement, et les mesures ajustées au regard des modifications apportées aux estimations du *risque*.

Article 4.X.8.

### Élaboration du plan de sécurité biologique

L'objectif principal d'un *plan de sécurité biologique* est de réduire le *risque* d'introduction d'*agents pathogènes* dans un *établissement d'aquaculture* et, dans le cas où ils s'y seraient introduits, de réduire le *risque* de propagation ou de dissémination de ces *agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*. Le plan doit consigner les voies de transmission préalablement identifiées, les résultats des *analyses de risques* qui auraient été éventuellement conduites (*dangers*, estimation du *risque* et mesures d'atténuation) et les informations concernant la mise en œuvre, le suivi et la révision du plan en cours.

#### 1. Élaboration d'un plan de sécurité biologique

Le processus d'élaboration d'un *plan de sécurité biologique* variera selon les objectifs fixés, le niveau de *sécurité biologique* approprié pour satisfaire aux exigences d'un système de production spécifique, la complexité des *risques* de *maladies* à prendre en compte et la disponibilité des informations et des ressources. Il est recommandé que les éléments suivants soient pris en compte et documentés :

- a) les objectifs et le champ d'application du *plan de sécurité biologique* et ainsi que les exigences réglementaires applicables ;
- b) les informations concernant l'*établissement d'aquaculture*, notamment les plans actualisés des bâtiments et des unités de production (y figurent, s'il y en a, les unités épidémiologiques ainsi que les structures et processus visant à maintenir une les méthodes de séparation), les aires de chargement/déchargement, de décolisage, de transformation, d'entreposage des aliments pour animaux aquatiques, d'entreposage des déchets issus d'animaux aquatiques et de réception, les points d'accès ainsi que les schémas présentant les principaux axes de circulation des *animaux aquatiques*, des produits issus d'animaux aquatiques et des déchets issus d'animaux aquatiques, de l'eau, des *aliments pour animaux aquatiques* et des objets contaminés fomites (qui incluent le personnel, l'équipement et les véhicules) ;
- c) les potentielles voies d'introduction, de propagation et de dissémination des *agents pathogènes* au sein ou par l'*établissement d'aquaculture* (se référer à l'article X.X.6. ci-dessus) ;
- d) une *analyse des risques*, qui prévoit une identification des principaux *dangers* pour la santé des animaux de l'*établissement d'aquaculture* (se référer à l'article X.X.7. ci-dessus) ;
- e) les mesures d'atténuation adoptées pour appréhender les *risques identifiés* ;
- f) les procédures d'urgence en cas d'échec des mesures de *sécurité biologique* ; elles peuvent prévoir des exigences en matière de signalement, et des mesures d'urgence pour éradiquer les agents pathogènes telles que le dépeuplement, l'élimination des animaux aquatiques et la désinfection du site, conformément aux chapitres 4.3. et 7.4. ;
- g) ~~les procédures opératoires normalisées requises pour accompagner la mise en œuvre des mesures d'atténuation, des procédures d'urgence et d'actions de formation pour satisfaire aux besoins du personnel ;~~
- gh) les procédures de communication interne et externe, ~~ainsi que~~ les rôles et responsabilités des membres du personnel de l'établissement d'aquaculture ainsi que les coordonnées des personnes à joindre, par exemple le personnel, les professionnels chargés de la santé des animaux aquatiques ou les vétérinaires le vétérinaire de l'élevage et ainsi que l'Autorité compétente ;
- hi) le calendrier de suivi et d'audit ;
- ij) l'évaluation de la performance ;
- i) les procédures opérationnelles normalisées requises pour accompagner la mise en œuvre des mesures d'atténuation décrites dans le plan de sécurité biologique, des procédures d'urgence et les exigences en matière de formation pour le personnel de l'établissement.

## 2. Éléments essentiels du plan de sécurité biologique

### a) Procédures opérationnelles normalisées

Dans les procédures opérationnelles normalisées sont décrits les processus de gestion périodique qui sont nécessaires pour garantir l'efficacité du *plan de sécurité biologique*. Chaque procédure opérationnelle normalisée doit clairement décrire ses objectifs, les responsabilités du personnel, la procédure (notamment la tenue des registres), les précautions à prendre et la date de la révision la plus récente.

Le personnel doit être formé à l'application des procédures opérationnelles normalisées, qui incluent le renseignement des formulaires, le suivi des listes de vérification et des autres registres associés avec chacune des procédures ainsi que l'obligation de communication périodique.

### b) Formation du personnel

Le personnel doit être formé à l'application des procédures opérationnelles normalisées, qui incluent le renseignement des formulaires, le suivi des listes de vérification et des autres registres associés avec chacune des procédures ainsi que l'obligation de communication périodique.

Le plan de sécurité biologique doit inclure un programme de formation afin de garantir que l'ensemble des membres du personnel sera en capacité de jouer son rôle dans la mise en place de la sécurité biologique de l'établissement d'aquaculture.

### cb) Documentation et tenue des registres

Le *plan de sécurité biologique* décrit la documentation nécessaire pour justifier de la conformité au plan du respect des mesures d'atténuation. Le niveau de détails requis pour la documentation dépend des résultats de l'évaluation des voies de transmission.

Parmi les exemples de documentation requise figurent les plans de l'*établissement d'aquaculture*, les mouvements d'*animaux aquatiques*, les individus échappés, l'origine et la destination ainsi que et le statut sanitaire des *animaux aquatiques* introduits dans l'*établissement d'aquaculture*, les mesures de quarantaine, les registres des visiteurs accueillis par l'établissement, les individus échappés évasions, les densités de peuplement, les taux de nourrissage et de croissance, la tenue de registres pour la formation du personnel, les traitements/la vaccination, la qualité de l'eau, les épisodes de nettoyage et de désinfection, les mortalités et les morbidités (y compris le retrait et l'élimination des mortalités), les registres pour la *surveillance* et le laboratoire.

### ed) Procédures d'urgence

Des procédures doivent être élaborées et, le cas échéant, mises en œuvre afin de minimiser les conséquences des urgences, des épisodes de *maladies* et des mortalités inexplicables chez les *animaux aquatiques*. Ces procédures doivent inclure des seuils clairement définis pour permettre d'identifier une situation d'urgence et d'activer les protocoles d'intervention. Ces protocoles prévoient une obligation de signalement.

### de) Suivi sanitaire

Le suivi sanitaire est un volet du *plan de sécurité biologique* qui prévoit le suivi du statut sanitaire des *animaux aquatiques* dans les *établissements d'aquaculture*. Le suivi doit être réalisé à l'échelle de l'unité de production et à celle de l'établissement. Les activités afférentes à ce volet peuvent inclure une *surveillance* de la *maladie*, le suivi périodique de paramètres importants pour la production et la santé de la population (par exemple, par le producteur personnel, le un professionnel de la santé des animaux aquatiques ou un vétérinaire), la tenue d'un registre pour consigner la présence de signes cliniques de *maladie*, le nombre d'animaux morbides et morts, les résultats des tests de laboratoire ainsi que l'analyse de ces données (par exemple, le calcul des taux de mortalité et de morbidité).

### ef) Révision périodique et audit

Le *plan de sécurité biologique* doit systématiquement prévoir un calendrier d'audit afin de vérifier la mise en œuvre des mesures et leur conformité aux exigences du *plan de sécurité biologique*. La révision périodique du *plan de sécurité biologique* est nécessaire pour garantir qu'il continue à appréhender les *risques* d'atteinte à la *sécurité biologique* de façon efficace.

Le *plan de sécurité biologique* doit également être révisé au moins une fois par an ou lorsque des modifications sont apportées au fonctionnement de l'*établissement d'aquaculture*, à la conception des installations et à l'approche utilisée pour la conduite d'élevage ; il doit également être révisé en cas d'identification d'un nouveau *risque* de *maladie* ou d'incident portant atteinte à la *sécurité biologique*, et ce, au moins une fois par an. Les incidents portant atteinte à la *sécurité biologique* et les actions à mettre en place pour y répondre doivent être documentés afin de permettre la réappréciation des la procédures opérationnelles normalisées.

### f) Formation du personnel

Le plan de sécurité biologique doit inclure un programme de formation afin de garantir que l'ensemble des membres du personnel sera en capacité de jouer son rôle dans la mise en place de la sécurité biologique de l'établissement d'aquaculture.

**NOUVEAU PROJET DE CHAPITRE SUR LA SÉCURITÉ BIOLOGIQUE  
DANS LES ÉTABLISSEMENTS D'AQUACULTURE  
(CHAPITRE 4.X) – VERSION EXEMPTÉ DE MARQUES DE RÉVISION**

**CHAPITRE 4.X.**

**SÉCURITÉ BIOLOGIQUE  
DANS LES ÉTABLISSEMENTS D'AQUACULTURE**

Article 4.X.1.

**Objectif**

Fournir des recommandations pour l'élaboration et la mise en œuvre de mesures de *sécurité biologique* principalement destinées à atténuer le *risque* d'introduction d'*agents pathogènes* spécifiques dans les *établissements d'aquaculture*, et, dans le cas où ils s'y seraient introduits, d'atténuer le *risque* de propagation ou de dissémination d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*.

Article 4.X.2.

**Champ d'application**

Les principes de *sécurité biologique* sont importants pour l'application des normes figurant dans le *Code aquatique*, à l'échelle d'un pays, d'une *zone*, d'un *compartiment* ou d'un *établissement d'aquaculture*. Le présent chapitre détaille les recommandations sur la *sécurité biologique* destinées aux *établissements d'aquaculture*, notamment les systèmes semi-ouverts, semi-clos et clos. Il décrit les principes généraux d'élaboration d'un *plan de sécurité biologique*, les différentes catégories de système de production aquacole, la gestion de zones partagées, les mesures d'atténuation applicables aux voies de transmission, la mise en œuvre de l'*analyse des risques* et d'approches pour l'élaboration du *plan de sécurité biologique*.

Pour disposer d'orientations spécifiques sur la prévention et le contrôle des *maladies*, il convient de se référer aux autres chapitres du Titre 4.

Article 4.X.3.

**Introduction**

L'application des mesures de *sécurité biologique* à l'échelle d'un *établissement d'aquaculture* fait partie intégrante des mesures de *sécurité biologique* efficaces à l'échelle d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* pour assurer de façon optimale le statut sanitaire et le bien-être des populations d'*animaux aquatiques*. Le présent chapitre décrit les principes de la *sécurité biologique* destinés à atténuer les *risques* associés à l'introduction, la propagation ou la dissémination d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*.

Compte tenu des défis particuliers que constitue la grande diversité des systèmes de production aquacole et des espèces d'*animaux aquatiques* élevées, l'élaboration de *plans de sécurité biologique* pour les *établissements d'aquaculture* nécessite l'appréciation des *risques* de *maladies* associés à des *agents pathogènes* spécifiques et à leurs voies de transmission potentielles. Un *plan de sécurité biologique* décrit la gestion et les mesures physiques destinées à atténuer les *risques* identifiés, d'une façon qui soit adaptée aux conditions de l'*établissement d'aquaculture*. Le personnel de l'*établissement d'aquaculture*, les prestataires de service et les *professionnels de la santé des animaux aquatiques* ou les *vétérinaires* doivent être engagés dans l'élaboration et la mise en œuvre du *plan de sécurité biologique* afin de s'assurer qu'il est concret et efficace.

Le résultat de la mise en œuvre des mesures de *sécurité biologique* dans les *établissements d'aquaculture* est l'amélioration de la santé et du bien-être des *animaux aquatiques* tout au long du cycle de production. Les bénéfices qui peuvent en résulter incluent notamment une amélioration de l'accès au marché, une meilleure productivité (obtenue par l'amélioration des taux de survie, de croissance et de conversion alimentaire), et une réduction de l'utilisation des produits médico-vétérinaires (y compris des *agents antimicrobiens*), aboutissant ainsi à une diminution des coûts de production et à un ralentissement du phénomène d'émergence de la résistance aux agents antimicrobiens.

Article 4.X.4.

**Principes généraux**

La *sécurité biologique* est un ensemble de mesures physiques et de gestion qui, lorsqu'elles sont utilisées conjointement, réduisent cumulativement le *risque d'infection* chez les populations d'*animaux aquatiques* au sein d'un *établissement d'aquaculture*. La planification et la mise en œuvre de la *sécurité biologique* dans un *établissement d'aquaculture* nécessite une identification des *risques* et des mesures ayant un rapport coût / efficacité avantageux pour atteindre les objectifs de *sécurité biologique* définis par le plan. Les mesures requises varieront d'un *établissement d'aquaculture* à l'autre, en fonction de facteurs tels que la probabilité d'exposition aux *agents pathogènes*, les espèces d'*animaux aquatiques* élevées, *Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE / février 2021*

la catégorie de système de production aquacole, les pratiques d'élevage, les conditions environnementales et la localisation géographique. Différentes approches peuvent être adoptées pour atteindre un objectif défini en matière de *sécurité biologique*. Toutefois, les principes généraux qui sous-tendent l'élaboration et la mise en œuvre d'un *plan de sécurité biologique* demeurent constants et sont décrits ci-dessous :

- 1) Les voies de transmission potentielles pour les *agents pathogènes* qui pénètrent, circulent et quittent l'*établissement d'aquaculture* doivent être identifiées comme décrit à l'article 4.X.6. Il doit être tenu compte de la catégorie de système de production aquacole et de la conception de l'*établissement d'aquaculture*.
- 2) L'*analyse des risques* doit être réalisée afin d'identifier et d'évaluer les menaces de *maladies* et de s'assurer que le plan prend en compte les *risques* de façon appropriée et efficace. L'*analyse des risques* peut être simple ou au contraire complexe, selon les objectifs du *plan de sécurité biologique*, les conditions au sein de l'*établissement d'aquaculture* et les *risques* de *maladies*, comme décrit à l'article 4.X.7.
- 3) Les mesures de *sécurité biologique* visant à répondre aux *risques* de *maladies* identifiés doivent être évaluées au regard de leur efficacité potentielle, de leurs coûts initiaux et récurrents (par exemple, des travaux de construction, la maintenance) et des impératifs de gestion, comme décrit à l'article 4.X.7.
- 4) Les pratiques de gestion doivent être intégrées dans les procédures de fonctionnement de l'*établissement d'aquaculture* et les formations appropriées doivent être dispensées au personnel, comme décrit à l'article 4.X.8.
- 5) Des registres et une documentation appropriés sont essentiels pour démontrer la mise en œuvre effective du *plan de sécurité biologique*. Des exemples sont décrits à l'article 4.X.8.
- 6) Un calendrier de révisions périodiques et d'audits du *plan de sécurité biologique* doit être établi. Les éléments déclencheurs d'une révision *ad hoc* doivent être déterminés (par exemple, l'apparition de *foyers* de *maladie* et les modifications apportées à l'infrastructure, aux techniques de production ou au profil de *risques*). Des audits réalisés par des organismes tiers peuvent s'avérer nécessaires lorsque la reconnaissance des mesures de *sécurité biologique* est exigée par les consommateurs, les régulateurs ou pour l'accès au marché, comme décrit à l'article 4.X.8.

Article 4.X.5.

### Catégories de systèmes de production aquacole

Il existe quatre différentes catégories de systèmes de production aquacole, définies en fonction de la capacité à traiter l'eau d'entrée et de sortie du système et du niveau de contrôle exercé sur les *animaux aquatiques* et les *vecteurs*. Ces facteurs doivent être pris en considération lors de l'élaboration du *plan de sécurité biologique*.

#### Systèmes ouverts

Dans un système de production aquacole ouvert, aucun contrôle ne peut être exercé sur l'eau, les conditions environnementales, les animaux ou les *vecteurs*. Parmi ces systèmes de production peuvent figurer ceux utilisés aux fins de l'augmentation des stocks de populations d'*animaux aquatiques* sauvages, qui hébergent des animaux issus d'*établissements d'aquaculture* ou de l'environnement naturel. Étant donné que ces systèmes ne peuvent pas être considérés comme des « *établissements d'aquaculture* », ils ne seront pas traités dans le présent chapitre. Toutefois, les mouvements d'*animaux aquatiques* entre les *établissements d'aquaculture* et les systèmes ouverts doivent faire l'objet d'une appréciation afin de déterminer s'il est nécessaire de mettre en œuvre des mesures d'atténuation du *risque* de *maladie*.

#### Systèmes semi-ouverts

Dans un système de production aquacole semi-ouvert, il n'est possible de contrôler ni l'eau d'entrée ou de sortie du système, ni les conditions environnementales. Certains *animaux aquatiques* et certains *vecteurs* peuvent également s'introduire dans le système et en sortir. Parmi les exemples de systèmes semi-ouverts de production aquacole figurent les enclos en filets immergés ou les cages pour les poissons et les nacelles en suspension ou les systèmes de cordes pour les mollusques, dans les étendues d'eaux naturelles.

#### Systèmes semi-clos

Dans un système de production aquacole semi-clos, un contrôle partiel peut être exercé sur l'eau d'entrée et de sortie du système ainsi que sur les conditions environnementales. Il est possible de prévenir l'introduction ou la sortie des *animaux aquatiques* et des *vecteurs* du système ; toutefois, le contrôle de l'introduction et de la sortie des *agents pathogènes* demeure limité. Parmi les exemples de systèmes de production aquacole semi-clos figurent les bassins, les bassins de type « couloir », les enclos flottants et les cuves à circulation d'eau continue.

#### Systèmes clos

Dans un système de production aquacole clos, le contrôle exercé sur l'eau d'entrée et de sortie est suffisant pour exclure du système les *animaux aquatiques*, les *vecteurs* et les *agents pathogènes*. Les conditions environnementales peuvent être également contrôlées. Parmi les exemples de système de production aquacole clos figurent les systèmes de production aquacole en circuit recirculé, les systèmes de production approvisionnés en eau salubre exempte d'*agents pathogènes* ou d'*animaux aquatiques* (par exemple, les eaux souterraines) ou les systèmes de production dont les eaux d'entrée et de sortie sont traitées de façon intensive et répétée.



### Gestion des zones partagées

Il peut s'avérer impossible de contrôler la transmission des *agents pathogènes* entre les *établissements d'aquaculture* semi-ouverts ou semi-clos, établis à proximité d'étendues d'eaux partagées. Dans ces conditions, un ensemble cohérent de mesures de *sécurité biologique* doit être appliqué par l'ensemble des *établissements d'aquaculture* considérés comme épidémiologiquement liés. Des accords de gestion des zones partagées peuvent formaliser la coordination des mesures de *sécurité biologique* communes à l'ensemble des *établissements d'aquaculture* épidémiologiquement liés.

### Article 4.X.6.

### Voies de transmission et mesures d'atténuation

Les voies de transmission permettant la propagation, la dissémination et le rejet d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture* sont diverses. L'identification de l'ensemble des voies de transmission potentielles est essentielle à l'élaboration d'un *plan de sécurité biologique* efficace. Il y a lieu de privilégier les mesures permettant d'interrompre les voies de transmission probables d'*agents pathogènes* spécifiques.

Les *risques* associés à l'introduction, la propagation ou la dissémination d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture* doivent être pris en considération pour chacune des voies de transmission suivantes :

#### 1. Les animaux aquatiques

Les mouvements d'*animaux aquatiques* dans, au sein ou à partir d'*établissements d'aquaculture*, qu'ils soient ou non intentionnels, peuvent présenter une probabilité élevée de transmettre des *agents pathogènes*. Tel est notamment le cas lorsque des *animaux aquatiques* infectés, présentant ou non des signes cliniques, ou lorsque des *animaux aquatiques* dont le statut sanitaire est inconnu, sont transférés au sein d'une population sensible.

Parmi les *animaux aquatiques* introduits, ou déplacés, de façon intentionnelle dans un *établissement d'aquaculture* peuvent se trouver les géniteurs, les larves, les stocks de juvéniles destinés au grossissement et le matériel génétique tel que les œufs et la laitance. Les mécanismes de la transmission horizontale comme ceux de la transmission verticale des *agents pathogènes* doivent être pris en considération pour les *animaux aquatiques*. Il est nécessaire de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par les *animaux aquatiques*, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes :

- a) n'introduire, dans l'*établissement d'aquaculture*, que des *animaux aquatiques* dont le statut sanitaire est connu, qu'il soit équivalent ou plus élevé que celui des animaux présents dans l'établissement ;
- b) en cas d'introduction d'*animaux aquatiques* dont le statut au regard des *maladies* est inconnu, procéder à leur placement en *quarantaine* ;
- c) le cas échéant, traiter les *animaux aquatiques* placés en *quarantaine* afin d'atténuer les *risques* de *maladies* (par exemple, un traitement antiparasitaire externe) ;
- d) s'assurer, lors du transport des *animaux aquatiques*, de la mise en place des conditions de *sécurité biologique* permettant de prévenir l'exposition des *animaux aquatiques* aux *agents pathogènes* et la dissémination de ces derniers ;
- e) conditionner le déplacement des *animaux aquatiques* au sein des différentes populations de l'établissement à la prise en considération des *risques* de *maladies*, afin de maintenir le plus élevé possible le statut sanitaire de la population d'*animaux aquatiques* ;
- f) lorsque l'opération est possible, isoler des autres populations les populations d'*animaux aquatiques* présentant des signes cliniques de *maladie* jusqu'à ce que la cause soit identifiée et que la situation soit réglée ;
- g) retirer les *animaux aquatiques* moribonds ou morts des unités de production le plus rapidement possible et les éliminer dans les conditions de *sécurité biologique* adéquates, conformément au chapitre 4.7. ;
- h) signaler à l'*Autorité compétente* les mortalités inexplicables ou inhabituelles ou toute suspicion d'une *maladie* à déclaration obligatoire ou d'une *maladie émergente* touchant les *animaux aquatiques*, conformément aux exigences locales ; l'investigation et le *diagnostic* de la cause des mortalités doivent être entrepris par des *professionnels de la santé des animaux aquatiques* ou des *vétérinaires* ;
- i) dans la mesure du possible, procéder au retrait des *animaux aquatiques* de l'ensemble ou d'une partie de l'*établissement d'aquaculture* à intervalles réguliers, par exemple entre deux générations d'*animaux aquatiques* ou deux cycles de production, suivi par un nettoyage, une *désinfection* et un séchage des installations de production ; un *vide sanitaire* des sites doit être instauré pendant une période suffisante pour interrompre le cycle de l'*infection* et réduire ou éliminer l'exposition à un agent pathogène lors du repeuplement en *animaux aquatiques* ; l'instauration du *vide sanitaire* doit être réalisée de façon coordonnée entre les *établissements d'aquaculture* qui sont épidémiologiquement liés par des étendues d'eaux partagées ;

- j) envisager le recours à des mesures physiques afin de réduire au minimum la probabilité que des *animaux aquatiques* d'élevage s'évadent ou que des *animaux aquatiques* sauvages s'introduisent au sein de l'*établissement d'aquaculture* ; la probabilité d'introduction ou d'évasion des *animaux aquatiques* sera plus élevée pour les systèmes semi-ouverts que pour les systèmes clos ou semi-clos.

## 2. Les produits issus d'animaux aquatiques et les déchets issus d'animaux aquatiques

Les *produits issus d'animaux aquatiques* peuvent également être introduits, déplacés au sein ou à partir d'un *établissement d'aquaculture* ; par exemple, les *produits issus d'animaux aquatiques* récoltés sur d'autres sites. Les *déchets issus d'animaux aquatiques* peuvent être générés par la mort ou la mise à mort d'*animaux aquatiques* à des fins de contrôle des *maladies* ou par leur abattage et leur transformation en vue de leur consommation par l'homme ou de leur utilisation à d'autres fins.

Les mouvements des *produits issus d'animaux aquatiques* et des *déchets issus d'animaux aquatiques* dans, au sein et à partir des *établissements d'aquaculture*, peuvent représenter un *risque* de transmission d'*agents pathogènes*. Tel est notamment le cas lorsqu'une population sensible est exposée à des *produits issus d'animaux aquatiques* et à des *déchets issus d'animaux aquatiques* infectés, qu'ils présentent ou non des signes cliniques. Les mouvements de *déchets issus d'animaux aquatiques* au sein des *établissements d'aquaculture* doivent être évités. Les *déchets issus d'animaux aquatiques* doivent être entreposés, transportés, éliminés et traités comme décrit dans le chapitre 4.7.

Dans le cas de mouvements intentionnels de *produits issus d'animaux aquatiques* et de *déchets issus d'animaux aquatiques*, la probabilité de la présence d'*agents pathogènes* dans les *animaux aquatiques* qui les ont générés doit être évaluée en prenant en considération l'espèce, la source et le statut sanitaire.

Il est nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par les *produits issus d'animaux aquatiques* et par les *déchets issus d'animaux aquatiques*, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes :

- a) déterminer le *risque* de *maladie* potentiel que représentent les *produits issus d'animaux aquatiques* et les *déchets issus d'animaux aquatiques* pour les *animaux aquatiques* présents dans l'établissement et l'environnement ;
- b) gérer les *produits issus d'animaux aquatiques* et les *déchets issus d'animaux aquatiques* dans des zones, au sein de l'*établissement d'aquaculture*, qui sont isolées des populations d'*animaux aquatiques* afin de réduire au minimum les *risques* de transmission de *maladies* identifiés ;
- c) s'assurer que des procédures sont mises en place de façon appropriée pour la collecte, le traitement (inactivation des *agents pathogènes*), le transport, l'entreposage ou l'élimination des *produits issus d'animaux aquatiques* et des *déchets issus d'animaux aquatiques*, en vue de réduire au minimum les *risques* de transmission de *maladies* identifiés.

## 3. L'eau

L'eau peut représenter un *risque* d'introduction, de propagation et de rejet d'*agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*. La source de l'eau et le lien épidémiologique qu'elle peut représenter soit entre l'*établissement d'aquaculture* et les autres populations, qu'elles soient d'élevage ou sauvages, soit entre l'*établissement d'aquaculture* et les établissements de transformation, doivent être identifiés et pris en considération. Il doit être également tenu compte de l'exposition aux eaux de transport et de ballast.

Pour l'*établissement d'aquaculture*, l'importance du *risque* d'exposition à de l'eau contenant des *agents pathogènes* peut être influencée par la catégorie de systèmes de production aquacole, la probabilité étant plus forte dans le cas des systèmes semi-ouverts que dans celui des systèmes semi-clos et clos. Toute eau dans laquelle évoluent des *animaux aquatiques* dont le statut sanitaire est plus faible ou inconnu représente un *risque* potentiel de transmission d'*agents pathogènes* à des *animaux aquatiques* ayant un statut sanitaire plus élevé.

Il est nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par l'intermédiaire de l'eau, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes :

- a) si possible, choisir une source d'eau entièrement exempte de populations d'*animaux aquatiques* sensibles et d'*agents pathogènes* jugés préoccupants ; ce type de sources peut inclure les eaux souterraines, qu'elles soient salées ou douces, l'eau du réseau municipal préalablement déchlorée et l'eau de mer artificielle ; ces sources d'eau peuvent être particulièrement adaptées pour les *animaux aquatiques* ayant un statut sanitaire élevé tels que les géniteurs ;
- b) s'assurer d'un niveau approprié de tamisage, de filtration ou de *désinfection* (conformément au chapitre 4.3.) des eaux provenant de sources dont il est probable qu'elles contiennent des *espèces sensibles* et qui peuvent présenter un *risque* de transmission d'*agents pathogènes* (par exemple, les océans, les ruisseaux ou les lacs) ; le type et le niveau de traitement nécessaires seront fonction des *risques* identifiés ;

- c) s'assurer d'un niveau approprié de filtration et de *désinfection* (conformément au chapitre 4.3.) des effluents (et des déchets filtrés associés) provenant des *établissements d'aquaculture* (ou des ateliers d'abattage ou de transformation associés) et qui peuvent présenter un *risque* de transmission d'*agents pathogènes* aux *animaux aquatiques* sauvages ou à d'autres *établissements d'aquaculture* hébergeant des *espèces sensibles*. ; le type et le niveau de traitement nécessaires seront fonction des *risques* identifiés ;
- d) choisir la localisation des arrivées et sorties d'eau des *établissements d'aquaculture* de type semi-clos et clos et la localisation des *établissements d'aquaculture* de type semi-ouvert de façon à minimiser le *risque* de contamination par les autres populations d'élevage et sauvages ainsi que par les établissements de transformation, en prenant en compte certains facteurs tels que la distance et les courants ;
- e) apprécier la probabilité que de l'eau contaminée puisse pénétrer soit lors d'inondations d'origine extérieure soit en raison d'infrastructures détériorées (par exemple, fuite de conduites, obstruction de drains, rupture de mur de protection) et appliquer des mesures de gestion ou infrastructurelles appropriées ;
- f) apprécier le *risque* et établir les procédures de traitement et d'élimination des eaux usées générées par le transport des *animaux aquatiques*.

#### 4. L'aliment pour animaux aquatiques

L'*aliment pour animaux aquatiques* peut constituer une voie de transmission importante d'*agents pathogènes* aux *animaux aquatiques*. L'*aliment pour animaux aquatiques* fabriqué à partir d'*animaux aquatiques* infectés peut contenir des *agents pathogènes* ou être contaminé au cours de la récolte, du transport, de l'entreposage ou de la transformation. De mauvaises conditions d'hygiène peuvent être à l'origine de contaminations lors de la fabrication, du transport, de l'entreposage et de l'utilisation des *aliments pour animaux aquatiques*.

Dans les systèmes de production clos ou semi-clos, il est possible d'exercer un haut niveau de contrôle sur l'*aliment pour animaux aquatiques*. En revanche, dans les systèmes de production semi-ouverts, les *animaux aquatiques* peuvent prélever de la nourriture dans leur environnement (par exemple, les mollusques, qui se nourrissent par filtration ou les poissons élevés dans les enclos en filets ou cages, qui s'attaquent aux poissons sauvages s'y introduisant). En outre, le *risque* de transmission de *maladies* par l'*aliment pour animaux aquatiques* à l'environnement doit également être géré.

Il est nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par l'intermédiaire des *aliments pour animaux aquatiques* au moyen des mesures d'atténuation décrites au chapitre 4.8., par exemple en utilisant des *aliments pour animaux aquatiques* ou des *ingrédients d'aliments pour animaux aquatiques* qui :

- a) ont subi une transformation suffisante pour inactiver les *agents pathogènes* jugés préoccupants ;
- b) proviennent de sources déclarées indemnes d'*agents pathogènes* jugés préoccupants ou pour lesquelles il a été confirmé (par un test par exemple) que les *agents pathogènes* n'étaient pas présents dans les *aliments pour animaux aquatiques* ou dans les *ingrédients d'aliments pour animaux aquatiques* ;
- c) ont été transformés, fabriqués, entreposés, transportés et livrés pendant le nourrissage des *animaux aquatiques*, de façon à prévenir toute contamination par des *agents pathogènes*.

#### 5. Les fomites

L'équipement, les *véhicules*, les matériaux d'emballage, les vêtements, les chaussures, les sédiments, l'infrastructure et les autres fomites peuvent transférer de façon mécanique des *agents pathogènes* dans, au sein, et à partir d'un *établissement d'aquaculture*.

La probabilité de transfert d'*agents pathogènes* dépendra de la résistance de l'*agent pathogène* dans l'environnement, de la présence et de la nature de la matière organique sur la surface de l'objet contaminé, ainsi que du type de surface et de sa capacité à retenir l'eau. La probabilité de transfert d'*agents pathogènes* peut être plus importante pour les fomites qui sont difficiles à nettoyer et à désinfecter. Le partage de l'équipement par plusieurs *établissements d'aquaculture*, par différentes unités de production au sein d'un même *établissement d'aquaculture*, ou par des *établissements d'aquaculture* et des installations de transformation peut avoir comme conséquence la propagation des *agents pathogènes*. Il est nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par l'intermédiaire des fomites, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes :

- a) apprécier le *risque* de *maladie* associé à tout objet contaminé transféré dans, au sein ou à partir de l'*établissement d'aquaculture* ;
- b) s'assurer que des procédures et des infrastructures sont en place afin de nettoyer et désinfecter les fomites, y compris les zones désignées pour la livraison et le chargement, préalablement à l'entrée dans l'*établissement d'aquaculture* ; les recommandations relatives au nettoyage et à la *désinfection* des fomites sont décrites au chapitre 4.3. ;
- c) dédier les objets difficiles à désinfecter, ou pour lesquels la probabilité de contamination est élevée, à un *établissement d'aquaculture* spécifique ou à des zones au sein de cet établissement, plutôt que les déplacer après l'opération de *désinfection* ;

- d) appliquer les mesures d'atténuation décrites aux points a) à c) aux mouvements des fomites entre les unités de production d'un *établissement d'aquaculture* ; le choix des mesures reposera sur les résultats de l'évaluation du *risque* de transmission de *maladies*.

## 6. Les vecteurs

Les *vecteurs* peuvent transmettre les *agents pathogènes* et ainsi contaminer les *animaux aquatiques* sensibles dans les *établissements d'aquaculture*. Parmi les *vecteurs* peuvent se trouver les *animaux aquatiques* s'introduisant dans le système par l'approvisionnement en eau mais aussi les prédateurs, les oiseaux sauvages, les charognards, et les animaux nuisibles tels que les rongeurs. Les *vecteurs* peuvent également transmettre les *agents pathogènes* au sein et par un *établissement d'aquaculture*.

La probabilité que les *vecteurs* transmettent des *agents pathogènes* varie selon le type de *vecteurs*, la nature de l'*agent pathogène*, la catégorie de système de production aquacole et le niveau de *sécurité biologique*.

Il est nécessaire d'apprécier et de gérer le *risque* de transmission d'*agents pathogènes* par les *vecteurs*, en prenant en considération les mesures d'atténuation suivantes :

- a) appliquer des mesures d'atténuation physiques afin de prévenir l'introduction des *vecteurs* dans les *établissements d'aquaculture* peut consister en :
  - i) la filtration ou le tamisage du flux entrant et sortant d'eau dans les systèmes de production aquacole semi-clos et clos afin de prévenir l'introduction des *animaux aquatiques* sauvages ;
  - ii) l'installation d'une clôture ou d'un mur autour des systèmes de production aquacole continentale afin de prévenir l'introduction d'animaux et de personnes, ainsi qu'un accès au site contrôlé par une barrière pour les personnels autorisés et les visiteurs;
  - iii) l'installation de barrières autour des systèmes de production aquacole flottants, dans le périmètre de l'établissement, afin de prévenir tout contact avec les *animaux aquatiques* sauvages et d'autres animaux ou leur introduction ;
  - iv) l'installation de filets de protection dans les systèmes de production aquacole extérieurs ou non clos contre les oiseaux ;
- b) contrôler les nuisibles.

## 7. Le personnel et les visiteurs

- a) L'accès du personnel et des visiteurs aux *établissements d'aquaculture* doit être contrôlé en établissant une délimitation entre la zone externe à *risque* et la zone interne où la *sécurité biologique* est assurée, et qui comprend notamment les installations :
  - i) dédiées à l'enregistrement des visiteurs ; devront figurer sur le registre le nom des visiteurs, leurs coordonnées et le signalement de leur exposition à des *animaux aquatiques* ou à des *agents pathogènes* pendant une période précédant la visite, notamment lors de visites d'autres *établissements d'aquaculture* ou d'autres installations ;
  - ii) dédiées au changement de tenue et de chaussures ou à l'utilisation de tenues à usage unique (par exemple, des charlottes, des blouses, des gants et des surchaussures) ;
  - iii) dédiées à la *désinfection* des mains et à l'utilisation de pédiluves.
- b) Tous les visiteurs doivent être informés et encadrés de façon à garantir le respect du *plan de sécurité biologique*.
- c) Un affichage clair des consignes doit être effectué afin que le personnel, les visiteurs et le public soient sensibilisés et se conforment aux mesures du *plan de sécurité biologique*.

Article 4.X.7.

## **Analyse des risques**

L'*analyse des risques* est une approche communément acceptée pour l'évaluation des menaces à la *sécurité biologique* et est utilisée comme appui à l'élaboration de mesures d'atténuation. Une *analyse des risques* formelle comprend quatre volets : l'*identification du danger*, l'*appréciation du risque*, la *gestion du risque* et la *communication relative au risque*. Cet article précise les principes décrits dans le chapitre 2.1. afin d'accompagner le développement de *plans de sécurité biologique* dans les *établissements d'aquaculture*.

Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE / février 2021

Un *plan de sécurité biologique* peut ne pas nécessiter la conduite d'une *analyse des risques* approfondie pour apprécier les *risques de maladies* en lien avec les voies de transmission. L'approche choisie peut dépendre des objectifs du *plan de sécurité biologique*, du niveau de *sécurité biologique* approprié au regard des exigences de productions spécifiques de l'*établissement d'aquaculture*, de la complexité des menaces auxquelles il faut répondre ainsi que de la disponibilité des informations et des ressources. Selon les circonstances, il peut être approprié de conduire une analyse partielle et cette analyse partielle pourra s'appuyer sur de précédentes expériences pour identifier les *dangers* associés aux voies de transmission correspondantes.

Les trois étapes formelles du processus d'*analyse des risques* sur lequel repose un *plan de sécurité biologique* sont :

### Étape 1 – L'identification du danger

L'identification du *danger* a pour objectif de déterminer les *agents pathogènes* qui doivent faire l'objet de l'*appréciation du risque*. Un *danger* peut être un *agent pathogène* spécifique ou un groupe d'*agents pathogènes* désigné sous un terme plus général. Cette étape nécessite l'identification et le recueil d'informations pertinentes sur les *agents pathogènes* susceptibles de causer des *maladies* chez les populations d'*animaux aquatiques* présentes au sein d'un *établissement d'aquaculture*. Le processus doit prendre en considération le *statut sanitaire des animaux aquatiques* de l'établissement et, dans le cas des systèmes semi-ouverts et semi-clos de production aquacole, le *statut sanitaire des animaux aquatiques* présents dans les zones ayant un lien épidémiologique avec l'établissement. Les *maladies connues* et les *maladies émergentes*, qui peuvent avoir des conséquences néfastes sur les populations d'élevage, doivent être identifiées, qu'elles soient ou non présentes dans l'*établissement d'aquaculture*.

En vue de compléter les prochaines étapes de l'*appréciation du risque*, l'information relative à l'identification des *dangers* est requise et inclut : i) la fréquence d'apparition, ii) les caractéristiques biophysiques, iii) la probabilité de détection en cas de présence avérée et iv) les voies de transmission possibles (décrites dans l'article 4.X.6.). Les voies de transmission de nombreux *dangers* sont similaires.

### Étape 2 – L'appréciation du risque

La réalisation d'une *appréciation du risque* peut être initiée dès lors que l'existence d'un *danger* a été établie et que les éléments d'informations exigés et listés à l'étape 1 ont été recueillis. L'objectif de l'*appréciation du risque* est d'établir une estimation du *risque*, qui est une combinaison des résultats de la probabilité de survenue d'un *danger* et de l'appréciation des conséquences de l'introduction, de la propagation et du rejet d'un *agent pathogène* dans et par l'*établissement d'aquaculture*.

Une *appréciation du risque* peut être réalisée selon une méthode quantitative ou une méthode qualitative. Les deux méthodes reposent sur le même concept, à savoir l'identification des étapes nécessaires à l'introduction, l'établissement et la propagation du *danger*. Dans le cas de la méthode qualitative d'*appréciation du risque*, la probabilité d'introduction et d'établissement est estimée au moyen de descripteurs de probabilité. Dans le cas de la méthode quantitative d'*appréciation du risque*, il est nécessaire de disposer de données à partir desquelles la probabilité est estimée. Dans la plupart des cas, la probabilité de transmission de la *maladie* et ses conséquences seront évaluées de façon qualitative mais dans le cadre d'une *appréciation du risque* formelle. Des exemples de descripteurs qualitatifs utilisés pour la probabilité de survenue et l'appréciation des conséquences figurent dans les tableaux 1 et 2. Le tableau 3 illustre la façon dont les estimations de la probabilité de survenue et l'appréciation des conséquences peuvent être combinés au sein d'une matrice afin de donner une estimation du *risque*. Le tableau 4 fournit une interprétation des estimations du *risque*.

**Tableau 1. Descripteurs qualitatifs de la probabilité de survenue**

Estimation	Descripteur
Improbable	Survenue très improbable mais pas impossible.
Peu probable	Il peut y avoir survenue, mais seulement dans de rares circonstances.
Possible	Les preuves recueillies suggèrent clairement que la survenue est possible dans cette situation.
Probable	La survenue est probable mais pas certaine.
Certain	La survenue est certaine.

**Tableau 2. Descripteurs qualitatifs de l'appréciation des conséquences**

Estimation	Descripteur des conséquences à l'échelle de l'établissement d'aquaculture
Insignifiant	L'impact est indétectable ou minime. Il n'y a pas impact sur les échanges commerciaux.
Mineur	La diminution de la productivité ne concerne qu'un faible nombre d'unités ou les échanges commerciaux sont perturbés pendant une courte période et/ou de façon très limitée et transitoire.
Modéré	La productivité diminue (par exemple, en raison d'une augmentation constante des mortalités ou d'une diminution du taux de croissance) et/ou les échanges commerciaux sont perturbés sur le court ou le moyen terme, avec pour résultat une perte financière.

Majeur	La production diminue de façon considérable et/ou les échanges commerciaux sont perturbés sur le moyen ou le long terme, avec pour résultat une perte financière significative.
Catastrophique	La perte de production est totale et il y a possiblement des obstacles au redémarrage de la production et/ou les échanges commerciaux sont bloqués, avec pour résultat une perte financière extrêmement lourde.

**Tableau 3. Matrice pour l'estimation du risque**

Estimation de la probabilité de survenue	Estimation de l'évaluation des conséquences					
		Insignifiant	Mineur	Modéré	Majeur	Catastrophique
	Improbable	Négligeable	Faible	Faible	Faible	Moyen
	Peu probable	Faible	Faible	Moyen	Moyen	Elevé
	Possible	Faible	Moyen	Moyen	Elevé	Elevé
	Probable	Faible	Moyen	Elevé	Elevé	Extrême
	Certain	Faible	Elevé	Elevé	Extrême	Extrême

Les *appréciations de risques* informent sur les *dangers* qu'il est nécessaire de prendre en compte, sur les points de contrôle critiques à cibler pour la gestion des voies de transmission et sur les mesures qui seront probablement les plus efficaces pour réduire le *risque*.

**Tableau 4. Interprétation des estimations du risque**

Estimation du <i>risque</i> *	Explication et réponse apportée en matière de gestion
Négligeable	Niveau de <i>risque</i> acceptable. Aucune action n'est requise.
Faible	Niveau de <i>risque</i> acceptable. Un suivi permanent peut être requis.
Moyen	Niveau de <i>risque</i> inacceptable. Réexaminer et renforcer les mesures d'atténuation du <i>risque</i> .
Élevé	Niveau de <i>risque</i> inacceptable. Identifier et mettre en place des mesures d'atténuation du <i>risque</i> additionnelles.
Extrême	Niveau de <i>risque</i> inacceptable. Mettre immédiatement en place des actions afin d'atténuer le <i>risque</i> .

\* Les estimations de la probabilité de survenue et l'appréciation des conséquences sont combinées au moyen de la matrice pour l'estimation du *risque* (tableau 3) afin d'obtenir une estimation du *risque*.

### Étape 3 – La gestion du risque

La *gestion du risque* est utilisée pour déterminer la réponse appropriée en matière de gestion pour le niveau de *risque* apprécié comme décrit dans le tableau 4. Le processus d'*appréciation du risque* identifie les étapes de la transmission présentant le plus grand *risque*, permettant ainsi de déterminer les mesures d'atténuation les plus efficaces. La transmission de nombreux *dangers* est similaire : par conséquent, les mesures d'atténuation peuvent être efficaces contre plus d'un *danger*. Les informations sur les *dangers* et leur voie d'introduction (étape 1) doivent être utilisées en combinaison avec les résultats de l'*appréciation du risque* obtenus pour chacune des voies de transmission (étape 2) afin d'identifier les mesures d'atténuation du *risque* les plus appropriées et les plus efficaces en termes de coût.

L'article X.X.6. décrit certaines des mesures d'atténuation possibles qu'il est pertinent de mettre en œuvre pour les différents modes de transmission. Les mesures d'atténuation les plus appropriées pour un *établissement d'aquaculture* dépendront de l'efficacité et de la fiabilité de la mesure d'atténuation, de la catégorie du système de production aquacole et du coût.

À la suite de la mise en œuvre du *plan de sécurité biologique*, les *dangers* devraient être réévalués régulièrement, et les mesures ajustées au regard des modifications apportées aux estimations du *risque*.

Article 4.X.8.

### Élaboration du plan de sécurité biologique

L'objectif principal d'un *plan de sécurité biologique* est de réduire le *risque* d'introduction d'*agents pathogènes* dans un *établissement d'aquaculture* et, dans le cas où ils s'y seraient introduits, de réduire le *risque* de propagation ou de dissémination de ces *agents pathogènes* au sein ou par les *établissements d'aquaculture*. Le plan doit consigner les voies de transmission préalablement identifiées, les résultats des *analyses de risques* qui auraient été éventuellement conduites (*dangers*, estimation du *risque* et mesures d'atténuation) et les informations concernant la mise en œuvre, le suivi et la révision du plan en cours.

#### 1. Élaboration d'un plan de sécurité biologique

Le processus d'élaboration d'un *plan de sécurité biologique* variera selon les objectifs fixés, le niveau de *sécurité biologique* approprié pour satisfaire aux exigences d'un système de production spécifique, la complexité des *risques* de *maladies* à prendre en compte et la disponibilité des informations et des ressources. Il est recommandé que les éléments suivants soient pris en compte et documentés :

- a) les objectifs et le champ d'application du *plan de sécurité biologique* et ainsi que les exigences réglementaires applicables ;
- b) les informations concernant l'*établissement d'aquaculture*, notamment les plans actualisés des bâtiments et des unités de production (y figurent, s'il y en a, les *unités épidémiologiques* ainsi que les structures et processus visant à maintenir une séparation), les aires de chargement/déchargement, de décolisage, de transformation, d'entreposage des *aliments pour animaux aquatiques*, d'entreposage des *déchets issus d'animaux aquatiques* et de réception, les points d'accès ainsi que les schémas présentant les principaux axes de circulation des *animaux aquatiques*, des *produits issus d'animaux aquatiques* et des *déchets issus d'animaux aquatiques*, de l'eau, des *aliments pour animaux aquatiques* et des fomites ;
- c) les potentielles voies d'introduction, de propagation et de dissémination des *agents pathogènes* au sein ou par l'*établissement d'aquaculture* (se référer à l'article X.X.6. ci-dessus) ;
- d) une *analyse des risques*, qui prévoit une identification des principaux *dangers* pour la santé des animaux de l'*établissement d'aquaculture* (se référer à l'article X.X.7. ci-dessus) ;
- e) les mesures d'atténuation adoptées pour appréhender les *risques* ;
- f) les procédures d'urgence en cas d'échec des mesures de *sécurité biologique* ; elles peuvent prévoir des exigences en matière de signalement, et des mesures d'urgence pour éradiquer les *agents pathogènes* telles que le dépeuplement, l'élimination des *animaux aquatiques* et la *désinfection* du site, conformément aux chapitres 4.3. et 7.4. ;
- g) les procédures de communication interne et externe, les rôles et responsabilités des membres du personnel de l'*établissement d'aquaculture* ainsi que les coordonnées des personnes à joindre, par exemple le personnel, les *professionnels chargés de la santé des animaux aquatiques* ou les *vétérinaires* ainsi que l'*Autorité compétente* ;
- h) le calendrier de suivi et d'audit ;
- i) l'évaluation de la performance ;
- j) les procédures opérationnelles normalisées nécessaires pour accompagner la mise en œuvre des mesures d'atténuation décrites dans le *plan de sécurité biologique*, des procédures d'urgence et les exigences en matière de formation pour le personnel de l'établissement.

## 2. Éléments essentiels du plan de sécurité biologique

- a) Procédures opérationnelles normalisées

Dans les procédures opérationnelles normalisées sont décrits les processus de gestion périodique qui sont nécessaires pour garantir l'efficacité du *plan de sécurité biologique*. Chaque procédure opérationnelle normalisée doit clairement décrire ses objectifs, les responsabilités du personnel, la procédure (notamment la tenue des registres), les précautions à prendre et la date de la révision la plus récente.

- b) Formation du personnel

Le personnel doit être formé à l'application des procédures opérationnelles normalisées, qui incluent le renseignement des formulaires, le suivi des listes de vérification et des autres registres associés avec chacune des procédures ainsi que l'obligation de communication périodique.

Le *plan de sécurité biologique* doit inclure un programme de formation afin de garantir que l'ensemble des membres du personnel sera en capacité de jouer son rôle dans la mise en place de la *sécurité biologique* de l'*établissement d'aquaculture*.

- c) Documentation et tenue des registres

Le *plan de sécurité biologique* décrit la documentation nécessaire pour justifier de la conformité au plan. Le niveau de détails requis pour la documentation dépend des résultats de l'évaluation des voies de transmission.

Parmi les exemples de documentation requise figurent les plans de l'*établissement d'aquaculture*, les mouvements d'*animaux aquatiques*, l'origine et la destination ainsi que le statut sanitaire des *animaux aquatiques* introduits dans l'*établissement d'aquaculture*, les mesures de *quarantaine*, les registres des visiteurs accueillis par l'établissement, les évasions, les densités de peuplement, les taux de nourrissage et de croissance, la tenue de registres pour la formation du personnel, les traitements/la vaccination, la qualité de l'eau, les épisodes de nettoyage et de *désinfection*, les mortalités et les morbidités (y compris le retrait et l'élimination des mortalités), les registres pour la *surveillance* et le laboratoire.

d) Procédures d'urgence

Des procédures doivent être élaborées et, le cas échéant, mises en œuvre afin de minimiser les conséquences des urgences, des épisodes de *maladies* et des mortalités inexpliquées chez les *animaux aquatiques*. Ces procédures doivent inclure des seuils clairement définis pour permettre d'identifier une situation d'urgence et d'activer les protocoles d'intervention. Ces protocoles prévoient une obligation de signalement.

e) Suivi sanitaire

Le suivi sanitaire est un volet du *plan de sécurité biologique* qui prévoit le suivi du statut sanitaire des *animaux aquatiques* dans les *établissements d'aquaculture*. Le suivi doit être réalisé à l'échelle de l'unité de production et à celle de l'établissement. Les activités afférentes à ce volet peuvent inclure une *surveillance* de la *maladie*, le suivi périodique de paramètres importants pour la production et la santé de la population (par exemple, par le personnel, un *professionnel de la santé des animaux aquatiques* ou un *vétérinaire*), la tenue d'un registre pour consigner la présence de signes cliniques de *maladie*, le nombre d'animaux morbides et morts, les résultats des tests de laboratoire ainsi que l'analyse de ces données (par exemple, le calcul des taux de mortalité et de morbidité).

f) Révision périodique et audit

Le *plan de sécurité biologique* doit systématiquement prévoir un calendrier d'audit afin de vérifier la mise en œuvre des mesures et leur conformité aux exigences du *plan de sécurité biologique*. La révision périodique du *plan de sécurité biologique* est nécessaire pour garantir qu'il continue à appréhender les *risques* d'atteinte à la *sécurité biologique* de façon efficace.

Le *plan de sécurité biologique* doit également être révisé au moins une fois par an ou lorsque des modifications sont apportées au fonctionnement de l'*établissement d'aquaculture*, à la conception des installations et à l'approche utilisée pour la conduite d'élevage ; il doit également être révisé en cas d'identification d'un nouveau *risque de maladie* ou d'incident portant atteinte à la *sécurité biologique*. Les incidents portant atteinte à la *sécurité biologique* et les actions à mettre en place pour y répondre doivent être documentés afin de permettre la réappréciation des procédures opérationnelles normalisées.

---

Retour à l'ordre du jour



CHAPITRE 1.3.  
**MALADIES LISTÉES PAR L'OIE**

[...]

Article 1.3.3.

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

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

[...]

---

# ÉVALUATION DE L'INFECTION PAR LE VIRUS 1 IRIDESCENT DES DÉCAPODES (DIV1) EN VUE DE SON INCLUSION DANS LA LISTE DES MALADIES FIGURANT AU CHAPITRE 1.3. DU CODE SANITAIRE POUR LES ANIMAUX AQUATIQUES

## Évaluation globale

La Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE (la Commission des animaux aquatiques) a évalué l'infection par le virus 1 iridescent des décapodes (DIV1) au regard des critères d'inclusion dans la liste des maladies figurant à l'article 1.2.2. du *Code aquatique*. Elle a conclu que l'infection par le DIV1 satisfaisait aux critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE, notamment aux critères n°1. « La propagation internationale de l'agent pathogène est probable. », 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 », n°3. « Une définition de cas précise est disponible et il existe une méthode fiable de détection et de diagnostic » et 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 constatées au niveau du pays ou de la zone » (voir le Tableau 1 ci-dessous).

**Tableau 1.** Récapitulatif de l'évaluation de l'infection par le DIV1 au regard des critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE

	Critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE						Conclusion
	1	2	3	4a	4b	4c	
Infection par le DIV1	+	+	+	NA	+	-	La maladie satisfaisait aux critères d'inclusion dans la Liste de l'OIE.

NA = non applicable.

## Contexte

Un nouveau membre de la famille des *Iridoviridae*, nommé virus 1 iridescent des décapodes (DIV1) (ICTV, 2019), caractérisé par un génome d'ADN double-brin long de 166 kpb (Li *et al.*, 2017 ; Qiu *et al.*, 2017b), a été identifié comme étant la cause des mortalités massives dans les élevages de crevettes et d'écrevisses (Xu *et al.*, 2016 ; Qiu *et al.*, 2017a ; Qiu *et al.*, 2019a). À ce jour, l'infection par le DIV1 a été détectée chez *Cherax quadricarinatus* (Xu *et al.*, 2016), la crevette à pattes blanches (*Penaeus vannamei*) (Qiu *et al.*, 2017a, b), le bouquet géant (*Macrobrachium rosenbergii*) (Qiu *et al.*, 2019a), l'écrevisse rouge des marais (*Procambarus clarkii*) (Qiu *et al.*, 2019a, b), le bouquet nippon (*Macrobrachium nipponense*) (Qiu *et al.*, 2019a), le bouquet quille (*Exopalaemon carinicauda*) et la crevette géante tigrée (*Penaeus monodon*) (OIE, 2020 ; Srisala *et al.*, 2020). Il a été démontré que deux espèces de crabes, le crabe chinois (*Eriocheir sinensis*) et *Pachygrapsus crassipes*, avaient été infectées lors d'une procédure expérimentale dans des conditions ne reproduisant pas les conditions naturelles de la transmission de la maladie (Pan *et al.*, 2017). La Commission des animaux aquatiques a reconnu la gravité potentielle de l'infection par le DIV1 pour de nombreux pays en raison de l'importance, au niveau international, de l'élevage et des échanges commerciaux de crevettes. Pour l'heure, l'infection par le DIV1 est considérée comme une « maladie émergente » et, par conséquent, elle devrait être notifiée conformément à l'article 1.1.4. du *Code aquatique*.

### Critères d'inclusion d'une maladie affectant des animaux aquatiques dans la Liste de l'OIE (article 1.2.2.)

**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

Le virus a été détecté par une méthode reposant sur une technique de PCR ou de PCR emboîtée chez la crevette à pattes blanches (*P. vannamei*), le bouquet géant (*M. rosenbergii*), l'écrevisse rouge des marais (*P. clarkii*), le bouquet nippon (*M. nipponense*) et le bouquet quille (*E. carinicauda*) dans des fermes aquacoles en République populaire de Chine (Xu *et al.*, 2016 ; Qiu *et al.*, 2017a ; Qiu *et al.*, 2018b ; Qiu *et al.*, 2019b). En outre, le DIV1 a été détecté dans les élevages de *P. monodon* du Taipei chinois (OIE, 2020) et chez les *P. monodon* sauvages récoltés dans l'Océan indien (Srisala *et al.*, 2020). Les reproducteurs et les post-larves destinés à la production des espèces *P. vannamei*, *P. monodon* et d'autres espèces de crustacés sensibles dans de nouvelles régions géographiques font, depuis longtemps, l'objet d'un commerce international. Ainsi les conditions propices à la transmission de la maladie sont réunies et la propagation internationale du virus est probable. Les examens histopathologiques, les observations au MET et l'hybridation *in situ* mettent en évidence la présence du virus, qui peut être localisée dans les tissus hématopoïétiques, l'organe lymphoïde, les branchies, l'hépatopancréas, l'épithélium, les péréiopodes et les muscles (Sanguanrut *et al.*, 2020 ; Qiu *et al.*, 2020a). La détection par PCR quantitative chez des crevettes infectées dans des conditions expérimentales a montré que la concentration virale la plus élevée se trouvait dans l'hémolymphe et les tissus hématopoïétiques alors que la concentration virale la plus faible était localisée dans le muscle (Qiu *et al.*, 2018a ; Qiu *et al.*, 2019a).

### Conclusion

Le critère est satisfait.

**ET**

**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.**

### Évaluation

Actuellement, l'infection par le DIV1 a été détectée en République populaire de Chine, dans le Taipei chinois et dans l'Océan indien mais la distribution géographique du virus pourrait être plus étendue si un grand nombre d'épisodes de mortalités avaient fait l'objet d'investigations. Toutefois, en raison de la large distribution de *P. vannamei*, *P. monodon*, *M. rosenbergii* et d'autres espèces sensibles à l'infection par le DIV1, de l'importance du commerce de ces espèces ainsi que du tableau clinique de la maladie et des mortalités associées, il aurait été attendu que la maladie fasse l'objet de nouveaux rapports si le virus s'était largement propagé.

En outre, la maladie a été listée comme maladie à déclaration obligatoire par le Réseau des centres d'aquaculture dans la région Asie-Pacifique (NACA) dans son rapport trimestriel sur les maladies des animaux aquatiques (région Asie-Pacifique), depuis janvier 2019. Par conséquent, il est probable qu'au moins un pays puisse être en mesure de démontrer l'absence de la maladie sur son territoire ou dans une zone chez les animaux aquatiques sensibles.

### Conclusion

Le critère est satisfait.

**ET**

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

### Évaluation

Il a été constaté que l'estomac et les intestins de *P. vannamei* étaient vides et que toutes les crevettes présentaient une légère décoloration à la surface et sur la section de l'hépatopancréas ainsi qu'une carapace molle. Il a été observé que le corps de certains individus présentait une légère coloration rougeâtre. Les crevettes moribondes perdent leur aptitude natatoire et coulent au fond du bassin (Qiu *et al.*, 2017a). Chez *M. rosenbergii*, les individus malades exhibent un triangle blanc de taille significative à l'intérieur de la carapace, à la base du rostre, qui est la localisation du tissu hématopoïétique (Qiu *et al.*, 2019a).

À ce jour, plusieurs méthodes de détection du DIV1 ont fait l'objet d'une publication et sont disponibles : la méthode reposant sur la technique de PCR (Xu *et al.*, 2016), la méthode reposant sur la technique de PCR emboîtée (Qiu *et al.*, 2017a), la méthode reposant sur la technique de PCR quantitative par détection en temps réel au moyen d'une sonde TaqMan (ou TaqMan qPCR) ciblant le gène codant pour l'ATPase (Qiu *et al.*, 2018a), la méthode d'hybridation *in situ* (Qiu *et al.*, 2017a), la méthode ISDL (*in situ* DIG-labeling-loop-mediated DNA amplification) (Chen *et al.*, 2019), la méthode RPA (recombinase polymérase amplification) (Chen *et al.*, 2019) et la méthode reposant sur la technique TaqMan qPCR ciblant le gène codant pour la MCP (Qiu *et al.*, 2020b). Il a été montré que les amorces et la sonde TaqMan ciblant le gène codant pour la MCP étaient spécifiques du DIV1 (pas de réaction croisée avec d'autres agents pathogènes des crevettes), avec une faible limite de détection (41,2 copies par réaction) ainsi qu'une sensibilité et une spécificité élevées (respectivement 97,2 % et 98,7 %). La méthode reposant sur la technique de PCR emboîtée ainsi que celle reposant sur la technique de PCR quantitative par détection en temps réel au moyen des deux types de sonde TaqMan ont été validées.

Il peut être conclu qu'il existe des méthodes de détection et de diagnostic fiables et qu'une définition de cas précise peut être développée sur la base des signes cliniques observés et des tests de diagnostic disponibles.

### Conclusion

Le critère est satisfait.

ET

**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

Aucune donnée disponible aux fins de l'évaluation.

Conclusion

Le critère n'est pas applicable.

OU

**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 constatées au niveau du pays ou de la zone.**

Évaluation

Des mortalités élevées (> 80 %) ont été observées dans les populations de *P. vannamei* et *M. rosenbergii* élevées en République populaire de Chine (Qiu *et al.*, 2017a ; Qiu *et al.*, 2019a). Des études de transmission expérimentale de l'infection menées chez *P. vannamei* et reproduisant les conditions naturelles de transmission de la maladie (*per os*) ont eu pour résultat des mortalités cumulées de 100 % en moins de deux semaines (Qiu *et al.*, 2017a). Des essais de transmission par injection chez *P. vannamei*, *C. quadricarinatus* et *P. clarkii* ont également eu pour résultat des mortalités cumulées de 100 % (Xu *et al.*, 2016 ; Qiu *et al.*, 2017a). Depuis 2014, plusieurs épisodes de mortalités massives de *P. vannamei* et *M. rosenbergii*, qui se sont produits dans des provinces côtières de la République populaire de Chine, ont été associés à l'infection par le DIV1 (Qiu *et al.*, 2017a ; Qiu *et al.*, 2019a; Qiu *et al.*, 2020a). La surveillance ciblée mise en place en Chine de 2017 à 2019 a permis de détecter la présence du DV1 dans 13 des 16 provinces concernées (Qiu *et al.*, 2018b ; Qiu *et al.*, 2019b). En 2020, dans le Taipei chinois, la présence du DIV1 associée à des épisodes de maladies et des mortalités dans les élevages de crustacés a été rapportée (OIE, 2020 ; Qiu *et al.*, 2020c). Les pertes sont significatives à l'échelle d'un pays.

Conclusion

Le critère est satisfait.

OU

**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 a été montré que l'infection par le DIV1 avait un effet significatif sur la santé des crevettes ou des écrevisses d'élevage, avec des conséquences graves, notamment des mortalités et des morbidités. Dans le cadre d'investigations menées sur des *P. monodon* sauvages dans l'Océan indien en avril 2018, les résultats des tests de PCR emboîtée pour le DIV1 se sont révélés positifs pour 5 des 26 crevettes du lot concerné (Srisala *et al.*, 2020). Il est également possible que la maladie affecte les animaux aquatiques sauvages. Toutefois, aucune donnée démontrant l'impact (par exemple, des mortalités et des morbidités) de la maladie sur les populations d'animaux aquatiques sauvages n'est disponible à ce jour.

Conclusion

Le critère n'est pas satisfait.

**Références :**

CHEN, X., QIU, L., WANG, H.L. (2019). Susceptibility of *Exopalaemon carinicauda* to the infection with Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV 20141215), a strain of Decapod iridescent virus 1 (DIV1). *Viruses*, **11(4)**: 387. doi: 10.3390/v11040387.

- CHEN, Z. W., HUANG, J., ZHANG, F., ZHOU, Y. & HUANG H. J. (2019). Detection of shrimp hemocyte iridescent virus by recombinase polymerase amplification assay. *Molecular and Cellular Probes*, **49**, 101475.
- ICTV. (2019). One New Genus with One New Species in the Subfamily Betairidovirinae. Available online: [https://talk.ictvonline.org/files/ictv\\_official\\_taxonomy\\_updates\\_since\\_the\\_8th\\_report/m/animal-dna-viruses-and-retroviruses/8051](https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/animal-dna-viruses-and-retroviruses/8051).
- LI, F., XU, L. & YANG, F. (2017). Genomic characterization of a novel iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*: evidence for a new genus within the family *Iridoviridae*. *Journal of General Virology*, **98(10)**.
- OIE (2020). Disease notification report, 09/07/2020. [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=34902](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=34902)
- PAN, C. K., YUAN, H. F., WANG, T. T., YANG, F., CHEN, J. M. (2017). Study of *Cherax quadricarinatus* iridovirus in two crab. *Journal of Applied Oceanography*, 36(1): 82-86 (in Chinese).
- QIU, L., CHEN, M. M. & WAN, X. Y., (2017a). Characterization of a new member of *Iridoviridae*, Shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV), found in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Scientific Reports*, **7(1)**:11834.
- QIU, L., CHEN, M. M. & WANG, R. Y., (2017b). Complete genome sequence of shrimp hemocyte iridescent virus (SHIV) isolated from white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Archives of Virology*, **130(9)**, 1-5.
- QIU, L., CHEN, M. M. & WAN, X. Y. (2018a). Detection and quantification of Shrimp hemocyte iridescent virus by TaqMan probe based real-time PCR. *Journal of Invertebrate Pathology*, **154**: 95-101
- QIU, L., DONG, X., WAN, X.Y. (2018b). Analysis of iridescent viral disease of shrimp (SHID) in 2017. In Analysis of Important Diseases of Aquatic Animals in China in 2017. Fishery and Fishery Administration Bureau under the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fishery Technical Extension Center, Eds., China Agriculture Press, Beijing, pp. 187-204, ISBN 978-7-109-24522-8 (in Chinese).
- QIU, L., CHEN, X. and ZHAO, R.H. (2019a). Description of a Natural Infection with Decapod Iridescent Virus 1 in Farmed Giant Freshwater Prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Viruses*, **11(4)**, 354. doi: 10.3390/v11040354.
- QIU, L., DONG, X., WAN, X.Y. (2019b). Analysis of iridescent viral disease of shrimp (SHID) in 2018. In Analysis of Important Diseases of Aquatic Animals in China in 2018. Fishery and Fishery Administration Bureau under the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fishery Technical Extension Center, Eds., (in press) (in Chinese).
- QIU, L., CHEN, X. and GAO, W. (2020a). Molecular epidemiology and histopathological study of a natural infection with Decapod iridescent virus 1 in farmed white leg shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, In Press.
- QIU, L., CHEN, X., GUO X.M. (2020b). A TaqMan probe based real-time PCR for the detection of Decapod iridescent virus 1, *Journal of Invertebrate Pathology*, **173**, 107367.
- QIU, L., DONG, X., WAN, X.Y. (2020c). Analysis of iridescent viral disease of shrimp (SHID) in 2019. In 2020 Analysis of Important Diseases of Aquatic Animals in China. Fishery and Fishery Administration Bureau under the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fishery Technical Extension Center, Eds., *China Agriculture Press, Beijing*, 187-204, ISBN 978-7-109-27064-0 (in Chinese).
- SANGUANRUT, P., THAIUE, D., THAWONSUWAN, J., FLEGEL, T.W., SRITUNYALUCKSANA, K. (2020). Urgent announcement on usefulness of the lymphoid organ (LO) as an additional prime target for diagnosis of decapod iridescent virus 1 (DIV1) in diseased *P. vannamei*. *NACA Newsletter*, ISSN 0115-8503, 2020, XXXV: 2. <https://enaca.org/?id=1092>.
- SRISALA, J., SANGUANRUT, THAIUE, P.D., LAIPHROM, S., SIRIWATTANO, J., KHUDET, J., POWTONGSOOK, S., FLEGEL, T.W., SRITUNYALUCKSANA, K. (2020). Urgent warning: Positive PCR detection results for infectious myonecrosis virus (IMNV) and decapod iridescent virus 1 (DIV1) in captured *Penaeus monodon* from the Indian Ocean. *NACA Newsletter*, ISSN 0115-8503, 2020, XXXV: 2. <https://enaca.org/?id=1093>.

XU, L., WANG, T. & LI, F. (2016). Isolation and preliminary characterization of a new pathogenic iridovirus from redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **120(1)**, 17.

---

[Retour à l'ordre du jour](#)

## MODÈLE D'ARTICLE 10.X.13. DESTINÉ AUX CHAPITRES 10.5, 10.6 ET 10.10 (ET ARTICLE 10.4.17 DESTINÉ AU CHAPITRE 10.4) - VERSION AVEC LES MARQUES DE RÉVISION

[ ... ]

Article 10.X.13.

**Importation d'œufs désinfectés destinés à l'aquaculture à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]**

- 1) L'*Autorité compétente* du *pays importateur*, lorsqu'elle autorise l'importation d'œufs désinfectés destinés à son *aquaculture* de l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], doit au moins apprécier ~~le risque associé~~ les éléments suivants, conformément au chapitre 4.4. :
  - a) ~~au statut sanitaire au regard de l'infection par l'agent pathogène X de~~ la probabilité que l'eau utilisée pour la désinfection des œufs soit contaminée par [l'agent pathogène X] ;
  - b) à la prévalence de l'infection par [l'agent pathogène X] chez les géniteurs ~~(y compris en testant notamment les résultats des tests pratiqués sur le liquide ovarien et la laitance).~~ et
  - c) à la température et au pH de l'eau utilisées lors de l'opération de désinfection.
- 2) L'*Autorité compétente* du *pays importateur*, si elle arrive à la conclusion que l'importation peut être acceptée, doit ~~exiger alors appliquer les que des mesures d'atténuation du risque suivantes afin de réduire les risques encourus soient appliquées, notamment~~ :
  - a) les œufs doivent être désinfectés préalablement à leur importation selon les recommandations contenues dans le chapitre 4.4. ~~ou celles requises par l'Autorité compétente du pays importateur~~, et
  - b) il est nécessaire que les œufs désinfectés et destinés à l'importation n'entrent pas en contact avec du matériel susceptible de détériorer leur statut sanitaire.

Lorsqu'elle l'estime nécessaire, l'*Autorité compétente* ~~peut~~ doit prendre des mesures au niveau national, telles que ~~le renouvellement de l'~~ que la réalisation d'une opération de désinfection des œufs additionnelle dès l'arrivée dans le *pays importateur*.

- 3) L'*Autorité compétente* du *pays importateur*, lorsqu'elle autorise l'importation d'œufs désinfectés destinés à son *aquaculture* de l'une des espèces visées à l'article 10.X.2. à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], doit exiger qu'ils soient accompagnés d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente* du *pays exportateur* attestant que les mesures prévues ~~aux~~ l'alinéa ~~alinéas~~ a) et b) du point 2) du présent article ont été appliquées.

## MODÈLE D'ARTICLE 10.X.13. DESTINÉ AUX CHAPITRES 10.5, 10.6 ET 10.10 (ET ARTICLE 10.4.17 DESTINÉ AU CHAPITRE 10.4)- VERSION SANS MARQUES DE RÉVISION

[ ... ]

Article 10.X.13.

**Importation d'œufs désinfectés destinés à l'aquaculture à partir d'un pays, d'une zone ou d'un compartiment non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X]**

- 1) L'*Autorité compétente* du *pays importateur*, lorsqu'elle autorise l'importation d'œufs désinfectés destinés à son *aquaculture* de l'une des espèces visées à l'article 10.X.2., à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], doit au moins apprécier les éléments suivants:
  - a) la probabilité que l'eau utilisée pour la *désinfection* des œufs soit contaminée par [l'agent pathogène X] ;
  - b) à la prévalence de l'infection par [l'agent pathogène X] chez les géniteurs (notamment les résultats des tests pratiqués sur le liquide ovarien et la laitance).
- 2) L'*Autorité compétente* du *pays importateur*, si elle arrive à la conclusion que l'importation peut être acceptée, doit exiger que des mesures d'atténuation du *risque* soient appliquées, notamment :
  - a) les œufs doivent être désinfectés préalablement à leur importation selon les recommandations contenues dans le chapitre 4.4., et
  - b) il est nécessaire que les œufs désinfectés et destinés à l'importation n'entrent pas en contact avec du matériel susceptible de détériorer leur statut sanitaire.

Lorsqu'elle l'estime nécessaire, l'*Autorité compétente* doit prendre des mesures au niveau national, telles que la réalisation d'une opération de *désinfection* des œufs additionnelle dès l'arrivée dans le *pays importateur*.

- 3) L'*Autorité compétente* du *pays importateur*, lorsqu'elle autorise l'importation d'œufs désinfectés destinés à son *aquaculture* de l'une des espèces visées à l'article 10.X.2. à partir d'un pays, d'une *zone* ou d'un *compartiment* non déclaré indemne d'infection par [l'agent pathogène X], doit exiger qu'ils soient accompagnés d'un *certificat sanitaire international applicable aux animaux aquatiques* délivré par l'*Autorité compétente* du *pays exportateur* attestant que les mesures prévues aux alinéas a) et b) du point 2) du présent article ont été appliquées.

---

[Retour à l'ordre du jour](#)



## CHAPITRE 10.9.

## INFECTION PAR LE VIRUS DE LA VIRÉMIE PRINTANIÈRE DE LA CARPE

[...]

Article 10.9.2.

**Champ d'application**

Les recommandations de ce chapitre s'appliquent aux espèces ci-après, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5. : ~~toutes les variétés et sous-espèces de la carpe commune (*Cyprinus carpio*), la carpe à grosse tête (*Aristichthys nobilis*), la brème (*Abramis brama*), *Rutilus kutum*, *Pimephales promelas*, *Notemigonus crysoleucas*, le cyprin doré (*Carassius auratus*), la carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idella*), le gardon (*Rutilus rutilus*) et le silure glane (*Silurus glanis*).~~

<u>Famille</u>	<u>Nom scientifique</u>	<u>Nom vernaculaire</u>
Cyprinidae	<i>Abramis brama</i>	Brème
	<i>Aristichthys nobilis</i>	Carpe à grosse tête
	<i>Carassius auratus</i>	Cyprin doré (= poisson rouge; = carpe dorée)
	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpe herbivore (= carpe chinoise; = carpe de roseau)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune (toutes les variétés et sous-espèces)
	<u><i>Danio rerio</i></u>	<u>Poisson zèbre</u>
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	[Golden shiner]
	<i>Pimephales promelas</i>	Vairon à grosse tête (=méné à grosse tête du Nord)
	<i>Rutilus kutum</i>	[Caspian white fish]
	<i>Rutilus rutilus</i>	Gardon
Siluridae	<i>Silurus glanis</i>	Silure glane

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPITRE 10.10.

## INFECTION PAR LE VIRUS DE LA SEPTICÉMIE HÉMORRAGIQUE VIRALE

[...]

Article 10.10.2.

**Champ d'application**

Les recommandations de ce chapitre s'appliquent aux espèces ci-après, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles, conformément au chapitre 1.5. : à la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), à la truite brune (*Salmo trutta*), à l'ombre commun (*Thymallus thymallus*), au corégone (*Coregonus* spp.), au brochet (*Esox lucius*), au turbot (*Scophthalmus maximus*), au hareng (*Clupea* spp.), au saumon du Pacifique (*Oncorhynchus* spp.), à la morue franche (*Gadus morhua*), à la morue du Pacifique (*Gadus macrocephalus*), au haddock (*Gadus aeglefinus*) et à la motelle (*Onos mustelus*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le *Manuel aquatique* lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

<b>Famille</b>	<b>Nom scientifique</b>	<b>Nom vernaculaire</b>	<b>Génotype</b>
<u>Ammodytidae</u>	<i>Ammodytes hexapterus</i>	Lançon du Pacifique	IVa
<u>Aralichthyidae</u>	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Cardeau-hirame	IVa
<u>Carangidae</u>	<i>Trachurus mediterraneus</i>	Chinard à queue jaune	Ie
<u>Centrarchidae</u>	<i>Ambloplites rupestris</i>	Crapet de roche	IVb
	<i>Lepomis gibbosus</i>	Perche-soleil	IVb
	<i>Lepomis macrochirus</i>	Crapet arlequin	IV, IVb
	<i>Micropterus dolomieu</i>	Achigan à petite bouche (= black-bass à petite bouche)	IVb
	<i>Micropterus salmoides</i>	Blackbass à grande bouche (= perche truite)	IVb
	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	Marigane noire	IVb
<u>Clupeidae</u>	<i>Alosa immaculata</i>	Alose de la mer Noire	Ie
	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine européenne (= sardine commune)	
	<i>Clupea harengus</i>	Hareng de l'Atlantique	Ib, III
	<i>Clupea pallasii pallasii</i>	Hareng du Pacifique	IVa
	<i>Dorosoma cepedianum</i>	Alose noyer	IVb
	<i>Sardinops sagax</i>	Pilchard sud-américain	IVa
	<i>Sprattus sprattus</i>	Sprat	Ib
<u>Cyclopteridae</u>	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Lompe	IVd
<u>Cyprinidae</u>	<i>Danio rerio</i>	Poisson zèbre	IVa
	<i>Notropis hudsonius</i>	[Spottail shiner]	IVb
	<i>Notropis atherinoides</i>	[Emerald shiner]	IVb
	<i>Pimephales notatus</i>	[Bluntnose minnow]	IVb
	<i>Pimephales promelas</i>	Vairon à grosse tête (= méné à grosse tête du Nord)	IVb
<u>Embiotocidae</u>	<i>Cymatogaster aggregata</i>	[Shiner perch]	IVa
<u>Engraulidae</u>	<i>Engraulis encrasicolus</i>	Anchois	Ie
<u>Esocidae</u>	<i>Esox lucius</i>	Brochet du Nord (= brochet)	IVb
	<i>Esox masquinongy</i>	[Muskellunge]	IVb
<u>Fundulidae</u>	<i>Fundulus heteroclitus</i>	[Mummichog]	IVc
<u>Gadidae</u>	<i>Gadus macrocephalus</i>	Morue du Pacifique	IVa
	<i>Gadus morhua</i>	Morue (= Morue de l'Atlantique)	Ib, III
	<i>Merlangius merlangus</i>	Merlan	Ie

<u>Gadidae</u>	<u>Micromesistius poutassou</u>	Merlan bleu (= poutassou)	IIb, III
	<u>Trisopterus esmarkii</u>	Tacaud norvégien	IIb, III
<u>Gasterosteidae</u>	<u>Gasterosteus aculeatus</u>	Épinoche à trois épines (= arselet)	IVe
<u>Gobiidae</u>	<u>Neogobius melanostomus</u>	Gobie à tâches noires = gobie rond	IVb
	<u>Pomatoschistus minutus</u>	Gobie des sables	IIb
<u>Ictaluridae</u>	<u>Ictalurus Ameiurus nebulosus</u>	Poisson-chat brun (= ictalure; = barbotte)	IVb
<u>Labridae</u>	<u>Centrolabrus exoletus</u>	Centrolabre	III
	<u>Ctenolabrus rupestris</u>	Rouquié	III
	<u>Labrus bergylta</u>	Vieille	III
	<u>Labrus mixtus</u>	Vieille coquette	III
	<u>Symphodus melops</u>	Crénilabre mélops	III
<u>Lotidae</u>	<u>Gaidropsarus vulgaris</u>	Motelle commune	Ie
<u>Moronidae</u>	<u>Morone americana</u>	Bar blanc d'Amérique	IVb
	<u>Morone chrysops</u>	Bar blanc	IVb
	<u>Morone saxatilis</u>	Bar d'Amérique	IVb, IVe
<u>Mullidae</u>	<u>Mullus barbatus</u>	Rouget de vase (= rouget barbet de vase)	Ie
<u>Osmeridae</u>	<u>Thaleichthys pacificus</u>	Eulakane	IVa
<u>Percidae</u>	<u>Sander vitreus</u>	Sandre américain	IVb
	<u>Perca flavescens</u>	Perche canadienne (= Perche jaune)	IVb
	<u>Paralichthys olivaceus</u>	Cardeau hirame	IVa
<u>Petromyzontidae</u>	<u>Lampetra fluviatilis</u>	Lamproie de rivière	II
<u>Pleuronectidae</u>	<u>Limanda limanda</u>	Limande	IIb
	<u>Platichthys flesus</u>	Flet (= flet d'Europe)	IIb
	<u>Pleuronectes platessus</u>	Plie d'Europe	III
<u>Rajidae</u>	<u>Raja clavata</u>	Raie bouclée	Ie
<u>Salmonidae</u>	<u>Coregonus artedii</u>	Cisco de lac	IVb
	<u>Coregonus clupeaformis</u>	Corégone de lac	IVb
	<u>Coregonus lavaretus</u>	Corégone lavaret	Ia
	<u>Oncorhynchus kisutch</u>	Saumon coho	IVa
	<u>Oncorhynchus mykiss</u>	Truite arc-en-ciel	Ia-e, III, IVb
	<u>Oncorhynchus mykiss X Oncorhynchus kisutch hybrids</u>	Truite arc-en-ciel X hybrides de saumon coho	Ia
	<u>Oncorhynchus tshawytscha</u>	Saumon royal	IVa, IVb
	<u>Salmo marmoratus</u>	[Marble trout]	Ia
	<u>Salmo salar</u>	Saumon de l'Atlantique	Ia, Ib, II, III, IVa
	<u>Salmo trutta</u>	Truite de mer = truite d'Europe = truite brune	Ia, Ib
	<u>Salvelinus namaycush</u>	Touladi = omble du Canada = truite de lac	Ia, IVa, IVb
	<u>Thymallus thymallus</u>	Ombre commun	†
	<u>Scophthalmidae</u>	<u>Scophthalmus maximus</u>	Turbot
<u>Sciaenidae</u>	<u>Aplodinotus grunniens</u>	Malachigan	IVb
<u>Scombridae</u>	<u>Scomber japonicus</u>	Maquereau espagnol du Pacifique	IVa
<u>Soleidae</u>	<u>Solea senegalensis</u>	Sole du Sénégal	III
<u>Uranoscopidae</u>	<u>Uranoscopus scaber</u>	Rascasse blanche	Ie

[...]

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPITRE 11.3

# INFECTION À *BONAMIA OSTREAE*

### Article 11.3.1.

Aux fins du *Code aquatique*, l'expression « infection à *Bonamia ostreae* » désigne une *infection* causée exclusivement par *B. ostreae*. Il s'agit d'un agent pathogène appartenant à la famille des Haplosporidiidae.

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

### Article 11.3.2.

#### Champ d'application

Les recommandations de ce chapitre s'appliquent aux espèces ci-après, satisfaisant aux critères permettant de les lister comme étant sensibles conformément au chapitre 1.5 : à l'huître plate européenne (*Ostrea edulis*), à l'huître plate australienne (*Ostrea angasi*), à l'huître plate argentine (*Ostrea pulchana*), à l'huître plate chilienne (*Ostrea chilensis*), à *Ostrea denselammellosa* et à l'huître de Suminoe (*Crassostrea ariakensis*). Ces recommandations concernent également toutes les autres espèces sensibles visées dans le Manuel aquatique lorsqu'elles font l'objet d'échanges internationaux.

---

## RAPPORT DE RÉUNION DU GROUPE AD HOC SUR LA SENSIBILITÉ DES ESPÈCES DE MOLLUSQUES AUX MALADIES LISTÉES PAR L'OIE

Janvier - juin 2020

Le présent rapport présente les travaux du groupe *ad hoc* sur la sensibilité des espèces de mollusques aux maladies listées par l'OIE (le Groupe *ad hoc*) pendant la période s'étendant de janvier à juin 2020. Durant cette période, les membres du Groupe *ad hoc* se sont réunis à deux reprises (une réunion physique de trois jours suivie d'une série de réunions virtuelles).

La liste des participants ainsi que les termes de référence figurent respectivement aux annexes I et II.

### Méthodologie

Le Groupe *ad hoc* a appliqué l'approche en trois étapes décrite à l'article 1.5.3 du chapitre 1.5 « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un pathogène spécifique » du *Code aquatique* afin d'évaluer la sensibilité des espèces à l'infection à *Bonamia ostreae*. Les critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles sont décrits ci-après :

#### 1) critères permettant de déterminer si la voie de transmission correspond aux voies de transmission naturelle de l'infection (tels que décrits à l'article 1.5.4) :

*Étape 1 : critères permettant de déterminer si les modalités d'exposition sont compatibles avec les voies de transmission naturelles de l'infection (tels que décrits à l'article 1.5.4)*

##### Modalités de la transmission

La question était de savoir si les procédures expérimentales mises en œuvre imitaient les voies naturelles de transmission de la maladie. Il a été également tenu compte des facteurs environnementaux puisque ceux-ci peuvent modifier la réponse de l'hôte ainsi que la virulence et la transmission de l'infection à *B. ostreae*.

Le tableau ci-dessous précise les considérations additionnelles prises en compte par le groupe *ad hoc* à l'étape 1 de l'approche en trois étapes permettant d'évaluer la sensibilité à l'infection à *B. ostreae*.

Étape 1 : origine de l'infection	Commentaire
L'exposition naturelle à l'infection comprend les situations où l'infection est apparue sans intervention expérimentale (par exemple, une infection dans des populations sauvages ou d'élevage).  OU  Les procédures expérimentales non invasives <sup>1</sup> , qui consistent en une induction de l'infection par cohabitation avec des hôtes infectés, par immersion ou par ingestion.	Les essais expérimentaux conduits <i>in vitro</i> (mise en contact des hémocytes et du parasite) ne sont pas considérés comme appropriés pour démontrer la sensibilité, ou son absence, chez une espèce hôte.

#### 2) critères permettant de déterminer si l'agent pathogène a été identifié de façon adéquate (tels que décrits à l'article 1.5.5) :

*Étape 2 : critères permettant de déterminer si l'agent pathogène a été identifié de façon adéquate (tels que décrits à l'article 1.5.5)*

Dans les publications plus anciennes, le Groupe *ad hoc* a noté que l'identification précise de l'agent pathogène n'avait pas toujours pu être établie en raison de la moindre disponibilité, à l'époque, des techniques de séquençage moléculaire. Dans ces circonstances, une approche privilégiant le poids de la

<sup>1</sup> Les procédures expérimentales invasives, et notamment l'injection, ne peuvent être utilisées que pour démontrer l'absence de sensibilité.

preuve, combinant les données recueillies à partir des études successives et des informations fournies par les auteurs a été privilégiée car jugée satisfaisante pour l'identification du pathogène.

Le tableau ci-dessous décrit les méthodes utilisées par le Groupe *ad hoc* pour identifier le pathogène, assorties de plusieurs commentaires.

Stage 2 : Identification du pathogène	Commentaires
<p>Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 18S (qui comporte des régions caractéristiques des espèces)</p> <p>OU</p> <p>Technique PCR-RFLP (telle que décrite par Cochenec et al., 2003)</p> <p>OU</p> <p>Technique qPCR ou PCR classique mettant en œuvre des amorces spécifiques de l'espèce ciblée (utilisée par exemple par Ramilo et al., 2013)</p>	<p>Les données de la caractérisation moléculaire doivent, dans la mesure du possible, être associées à une analyse microscopique afin de confirmer la présence du pathogène.</p> <p>La technique d'hybridation <i>in situ</i> n'est pas suffisamment spécifique pour permettre une identification au niveau de l'espèce.</p> <p>Les premières études ayant été réalisées en l'absence de diagnostic moléculaire, il a été décidé de les compléter par les résultats concordants des études menées plus récemment.</p> <p>L'utilisation de la séquence de l'espaceur interne transcrit de l'ADN ribosomal (ITS rDNA) permet une différenciation plus fine des espèces proches que celle de la séquence de l'ADNr 18S ; en outre, elle peut fournir des informations sur la diversité génétique existant au sein des différentes populations d'une même espèce.</p>

**3) critères permettant de déterminer si les preuves de la présence de l'agent pathogène suffisent pour conclure à l'infection (tels que décrits à l'article 1.5.6.) :**

*Étape 3 : critères permettant de déterminer si les preuves de la présence de l'agent pathogène suffisent pour conclure à l'infection (tels que décrits à l'article 1.5.6)*

Des preuves de l'infection à *B. ostreae* chez les espèces hôtes suspectées d'être sensibles ont été établies, conformément aux critères A à D figurant à l'article 1.5.6. Les éléments de preuve permettant de satisfaire au seul critère A étaient suffisantes pour conclure à l'infection. En l'absence d'éléments permettant de satisfaire au critère A, au moins deux des critères B, C et D devaient être satisfaits pour conclure à l'infection.

- A. l'agent pathogène se multiplie dans l'hôte, ou des stades de développement de l'agent pathogène sont présents dans ou sur l'hôte ;
- B. une forme viable de l'agent pathogène a été isolée chez les espèces sensibles proposées, ou son infectiosité a été démontrée lors de la transmission à des individus naïfs ;
- C. il y a des modifications cliniques ou pathologiques associées à l'infection ;
- D. la localisation spécifique de l'agent pathogène est constatée dans les tissus cibles attendus.

Le tableau ci-dessous décrit les critères utilisés par le Groupe *ad hoc* en étape 3, c'est-à-dire les critères permettant d'évaluer la sensibilité à l'infection à *B. ostreae*.

Étape 3 : critères permettant d'évaluer la sensibilité à l'infection			
A : Réplication	B : Viabilité ou infectiosité	C : Modifications cliniques ou pathologiques*	D : Localisation de l'agent pathogène dans les tissus
<p>1) Présence de nombreux parasites intracellulaires, qui peuvent être ou non multinucléés (notamment les formes plasmodiales), démontrée <b>par</b> :</p> <p>Histopathologie</p> <p>OU</p> <p>Cytologie (usuellement par réalisation d'empreintes de tissus branchiaux ou cardiaques ainsi que par des frottis d'hémolymphe)</p> <p>OU</p> <p>Hybridation <i>in situ</i> (HIS)</p> <p>OU</p> <p>Microscopie en transmission (MET)</p> <p>OU</p> <p>2) Mise en évidence de l'augmentation du nombre de copies des gènes cibles de l'agent pathogène dans le temps par qPCR en temps réel (cible l'ADN) ou par RT-qPCR (cible l'ARN) dans les tissus.</p>	<p>1) Transmission de l'infection, par cohabitation, à des individus sains d'une espèce reconnue comme étant sensible au parasite (par exemple, <i>Ostrea edulis</i>)</p> <p>OU</p> <p>2) Démonstration de la viabilité des cellules isolées des tissus <b>par</b> :</p> <p>Cytométrie en flux</p> <p>OU</p> <p>Colorants vitaux</p> <p>OU</p> <p>Transmission de l'infection à des animaux sains par injection</p>	<p>Mortalité</p> <p>OU</p> <p><u>Lésions macroscopiques</u> telles que :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la décoloration tissulaire</li> <li>- les ulcérations branchiales</li> </ul> <p>OU</p> <p>Dégradation rapide de l'état général</p> <p>OU</p> <p><u>Lésions microscopiques</u> telles que : infiltration généralisée par les hémocytes du tissu conjonctif de plusieurs organes, notamment des branchies et du manteau.</p>	<p>Le pathogène est présent dans les hémocytes circulant dans le tissu conjonctif de différents organes, notamment des branchies** ou du cœur. Il est rarement extracellulaire.</p>

\* Signes cliniques non pathognomoniques et non constants.

\*\* Localisation à l'intérieur des branchies contrairement aux potentiels contaminants externes.

Une évaluation de l'absence de sensibilité, reposant sur de multiples sources d'informations ne se contredisant pas, a été réalisée dès lors qu'aucun autre critère que le critère D était satisfait (c'est-à-dire obtention d'un « Oui » pour le critère D et d'un « Non » pour les critères A, B et C).

Le tableau ci-dessous décrit les catégories de résultats utilisées par le Groupe *ad hoc* aux fins de l'évaluation de la sensibilité des espèces :

1.	Le Groupe <i>ad hoc</i> a proposé d'inclure, dans l'article 11.3.2 du chapitre 11.3 «Infection à <i>Bonamia ostreae</i> » du <i>Code aquatique</i> ainsi que dans la section 2.2.1 du chapitre 2.4.3 «Infection with <i>Bonamia ostraе</i> » du <i>Manuel aquatique</i> , les espèces ayant été évaluées comme étant sensibles (conformément à l'article 1.5.7).
2.	Le Groupe <i>ad hoc</i> a proposé d'inclure, dans le paragraphe 2.2.2 «Species with incomplete evidence for susceptibility» du chapitre 2.4.3 «Infection with <i>Bonamia ostraе</i> » du <i>Manuel aquatique</i> , les espèces pour lesquelles les preuves permettant de démontrer la sensibilité ont été jugées insuffisantes (conformément à l'article 1.5.8 du <i>Code aquatique</i> ).
3.	Le Groupe <i>ad hoc</i> n'a pas proposé d'inclure, que ce soit dans le <i>Code aquatique</i> ou dans le <i>Manuel aquatique</i> , les espèces pour lesquelles la satisfaction des critères n'a pas été démontrée ou pour lesquelles les informations recueillies s'avéraient contradictoires. Toutefois, les espèces pour lesquelles un résultat positif au test PCR spécifique de l'agent pathogène a été rapporté sans preuve de l'infection ont été incluses dans un paragraphe distinct de la section 2.2.2 «Species with incomplete evidence for susceptibility» du chapitre 2.4.3 «Infection with <i>Bonamia ostraе</i> » du <i>Manuel aquatique</i> .
4.	L'application du nouveau modèle de chapitre 2.4.3 du <i>Manuel aquatique</i> a conduit le Groupe <i>ad hoc</i> à proposer l'inclusion des espèces dont l'absence de sensibilité a été démontrée dans la version révisée de la section 2.2.3.
5.	S'agissant des vecteurs, le Groupe <i>ad hoc</i> est en attente de la décision de la Commission des animaux aquatiques concernant la précision/clarification de la définition du terme « vecteur ». Le Groupe <i>ad hoc</i> ne prendra les vecteurs en compte dans les catégories de résultats que lorsque cette décision aura été prise.
NC	Résultat non classé dans une catégorie en raison de l'insuffisance d'information ou de sa non-pertinence.

### Évaluation de la sensibilité des hôtes à l'infection à *B. ostreae*

#### Résumé

Le Groupe *ad hoc* a conclu que trois des six espèces actuellement répertoriées à l'article 11.3.2 comme étant sensibles à l'infection à *B. ostreae*, à savoir *Ostrea angasi*, *Ostrea puelchana* et *Ostrea denselammellosa*, ne satisfaisaient pas aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles. Il a donc proposé leur suppression de cet article.

Aucune nouvelle espèce faisant l'objet de l'évaluation n'a satisfait aux critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à l'infection à *B. ostreae*.

L'analyse, ses résultats ainsi que les références utilisées aux fins de l'évaluation de la sensibilité à l'infection à *B. ostreae* conduite par le Groupe *ad hoc* figurent dans le tableau ci-dessous :



Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire	Étape 1 : Voie de transmission	Étape 2 : Identification de l'agent pathogène	Étape 3 : Preuve de l'infection				Catégorie de résultat	Références
					A	B	C	D		
<b>Catégorie 1</b>										
Ostreidae	<i>Ostrea edulis</i>	Huître plate européenne	ND	Oui	Oui	ND	Oui	Oui	1	Cochennec <i>et al.</i> , 2000
			N	Oui	Oui	ND	Oui	Oui	1	Marty <i>et al.</i> , 2006
Ostreidae	<i>Ostrea chilensis</i>	Huître plate chilienne	N	Oui	Oui	ND	Oui	Oui	1	Lane <i>et al.</i> , 2016
			N	Oui <sup>2</sup>	ND	ND	Oui	Oui	1	Grizel <i>et al.</i> , 1983
Ostreidae	<i>Crassostrea ariakensis</i>	[Suminoe oyster]	N	Oui <sup>3</sup>	Oui	ND	Oui	Oui	1	Cochennec <i>et al.</i> , 1998
			E	Oui	ND	ND	Non	Oui	3	Audemard <i>et al.</i> , 2005 (conference abstract), and personal communication (R. Carnegie)
<b>Catégorie 2</b>										
Ostreidae	<i>Ostrea puelchana</i>	[Argentinean flat oyster]	N	Oui <sup>4</sup>	ND	ND	Non concluant <sup>5</sup>	Oui	2	Pascual <i>et al.</i> , 1991
<b>Catégorie 3</b>										
Ophiotrichidae	<i>Ophiothrix fragilis</i>	[Brittle star]	N et E	Oui	ND	ND	ND	ND	3	Lynch <i>et al.</i> , 2007

<sup>2</sup> Les sites dont il est question dans l'étude de Grizel *et al.* (1983) sont localisés dans des aires où la présence de *B. ostreae* est confirmée (caractérisation initiale par des techniques histologiques ou cytologiques puis, par la suite, par des techniques moléculaires).

<sup>3</sup> L'identité du parasite décrit par Cochennec *et al.* (1998), *B. ostreae*, a été confirmée par la suite par séquençage ADN, réalisé par le laboratoire de référence de l'OIE, comme rapporté par Engelsma *et al.* (2014).

<sup>4</sup> Les sites dont il est question dans l'étude de Pascual *et al.* (1991) sont localisés dans des aires où la présence de *B. ostreae* est confirmée (caractérisation initiale par des techniques histologiques ou cytologiques puis, par la suite, par des techniques moléculaires).

<sup>5</sup> Le critère C a été considéré comme non concluant car la cause de la mortalité n'était pas clairement déterminée [cause parasitaire (*B. ostreae* ou *M. refringens*) et /ou cause environnementale].

Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire	Étape 1 : Voie de transmission	Étape 2 : Identification de l'agent pathogène	Étape 3 : Preuve de l'infection				Catégorie de résultat	Références
					A	B	C	D		
Actiniidae	<i>Actina equina</i>	[Beadlet anemone]	N	Oui	ND	ND	ND	ND	3	Lynch <i>et al.</i> , 2007
Asciidiidae	<i>Asciidiella aspersa</i>	[European sea squirt]	N	Oui	ND	ND	ND	ND	3	Lynch <i>et al.</i> , 2007
		Zooplankton	N	Oui	ND	ND	ND	ND	3	Lynch <i>et al.</i> , 2007
Ostreidae	<i>Crassostrea gigas</i>	Huitre creuse du Pacifique	N et E et EI	Oui <sup>6</sup>	Non	Non	Non	Non	4	Culloty <i>et al.</i> , 1999
			N et E et EI	Oui	Oui	Non concluant <sup>7</sup>	Non	Oui	1	Lynch <i>et al.</i> , 2010
			EI	Oui	Non	ND	Non	Non	4	Gervais, 2016
<b>Catégorie 4</b>										
Veneridae	<i>Ruditapes decussatus</i>	Palourde franche/ Palourde croisée d'Europe	E et EI	Oui	Non	Non	Non	Non	4	Culloty <i>et al.</i> , 1999
Veneridae	<i>Ruditapes philippinarum</i>	Palourde japonaise	E et EI	Oui	Non	Non	Non	Non	4	Culloty <i>et al.</i> , 1999
Mytilidae	<i>Mytilus edulis</i>	Moule commune	E et EI	Oui	Non	Non	Non	Non	4	Culloty <i>et al.</i> , 1999
Mytilidae	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Moule méditerranéenne	E et EI	Oui	Non	Non	Non	Non	4	Culloty <i>et al.</i> , 1999

<sup>6</sup> Les sites dont il est question dans l'étude de Culloty *et al.* (1999) sont localisés dans des aires où la présence de *B. ostreae* est confirmée (caractérisation initiale par des techniques histologiques ou cytologiques puis, par la suite, par des techniques moléculaires).

<sup>7</sup> Le critère B a été considéré comme non concluant car les parasites *B. ostreae* détectés dans les huitres *C. gigas* exposées étaient localisés le liquide intervalvaire et non dans les tissus.

Famille	Nom scientifique	Nom vernaculaire	Étape 1 : Voie de transmission	Étape 2 : Identification de l'agent pathogène	Étape 3 : Preuve de l'infection				Catégorie de résultat	Références
					A	B	C	D		
<b>Espèces non classées dans une catégorie en raison de l'absence d'identification précise du pathogène</b>										
Ostreidae	<i>Ostrea angasi</i>	[Australian mud oyster]	N	Non	ND	ND	Non concluant <sup>8</sup>	Oui	NS	Bougrier <i>et al.</i> , 1986
Ostreidae	<i>Ostrea denselamellosa</i>	[Lamellated oyster]	ND	Non	ND	ND	ND	ND	NS	Le Borgne and le Pennec, 1983
Ostreidae	<i>Ostrea lurida</i> ( <i>O. conchaphila</i> )	Huître plate indigène	N	Non	Oui	ND	Oui	Oui	NS	Farley, 1988
Ostreidae	<i>Crassostrea angulata</i>	Huître portugaise	ND	Non	ND	ND	ND	ND	NS	Katkansky <i>et al.</i> , 1969, Engelsma <i>et al.</i> , 2014

Les noms scientifiques des espèces figurant dans le tableau ci-dessus sont ceux de la base de données World Register of Marine Species (WoRMS) <https://www.marinespecies.org/index.php> (dans le cas de *Crassostrea gigas*, voir la note explicative ci-dessous).

Les noms vernaculaires des espèces de mollusques figurant dans le tableau ci-dessus sont ceux de la base de données FAOTERM (<http://www.fao.org/faoterm/collection/faoterm/en/>) et celle de Sealifebase (<https://www.sealifebase.ca>). Lorsque le nom vernaculaire d'une espèce n'est pas répertorié dans FAOTERM, c'est celui de la base de données FISHBASE qui est utilisé.

<sup>8</sup> Le critère C a été considéré comme non concluant car la mortalité observée pouvait possiblement avoir été causée par un parasite du genre *Haplosporidium* non identifié.

## Commentaires sur la démarche entreprise par le Groupe *ad hoc* et son processus décisionnel

- Le Groupe *ad hoc* a pris la décision de sélectionner les études publiées à partir de l'an 2000, les techniques moléculaires étant alors disponibles. Il s'est référé à des articles plus anciens lorsque ceux-ci étaient nécessaires au renforcement de la fiabilité des résultats de l'évaluation ou lorsqu'aucune publication récente n'était disponible pour permettre de réaliser l'évaluation de la sensibilité d'une espèce hôte spécifique.
- Le Groupe *ad hoc* a estimé que, pour conclure à la sensibilité d'une espèce, il était suffisant de disposer soit de deux publications permettant de classer l'espèce dans la catégorie 1, soit d'une seule étude permettant de classer l'espèce dans la catégorie 1, sous réserve qu'elle soit complétée par une seconde étude la corroborant. Les études additionnelles ont été systématiquement examinées afin de déterminer si leurs résultats étaient contradictoires.
- S'agissant d'*Ophiothrix fragilis*, le Groupe *ad hoc* a relevé que seul un résultat positif au test PCR avait été rapporté : il a donc classé cette espèce dans la catégorie 3 (Lynch *et al.*, 2007). Bien que la transmission naturelle de *B. ostrae* ait été observée et que des essais de transmission de l'infection par ingestion aient été conduits, les informations relatives à sa viabilité et aux manifestations pathologiques associées n'ont pas été concluantes. En outre, aucune information sur la localisation du pathogène n'était fournie. S'agissant d'*Actina equina*, *Asciidiella aspersa* et du zooplancton, le Groupe *ad hoc* a relevé que seul un résultat positif au test PCR avait été rapporté : il a donc classé cette espèce dans la catégorie 3 (Lynch *et al.*, 2007).
- *Crassostrea ariakensis* : dans l'article de Cochenne *et al.* (1998), l'identification du parasite reposait sur l'histologie et la présence d'un nucléole excentré. Cette identification a été par la suite confirmée par le séquençage de l'ADN, réalisé par Engelsma *et al.* (2014). Le résumé de conférence d'Audemard (2005) ainsi que les communications personnelles avec son co-auteur concernant un essai expérimental d'induction de l'infection par cohabitation (1/30 des animaux ont donné un résultat positif au test PCR après 6 mois d'exposition), n'ont pas permis de corroborer suffisamment les résultats des autres études.
- *Ostrea puelchana* est actuellement incluse dans la liste des espèces sensibles à *B. ostrae* du *Code aquatique*. Toutefois, le Groupe *ad hoc* a considéré que cette huître faisait partie des espèces pour lesquelles les preuves permettant de démontrer sa sensibilité étaient insuffisantes (ce qui se traduit par un classement dans la catégorie 2). L'étude rapportant l'apparition de l'infection (Pascual *et al.*, 1991) n'a pas permis de satisfaire aux critères permettant de déterminer si les preuves de la présence de l'agent pathogène suffisent pour conclure à l'infection (étape 3) : en effet, seul le critère D était satisfait (attribution d'un « Oui » dans la colonne D sur la localisation du pathogène).
- *Ostrea angasi* est actuellement incluse dans la liste des espèces sensibles à *B. ostrae* du *Code aquatique*. Toutefois, le Groupe *ad hoc* n'a pas été en mesure de classer cette espèce hôte dans une des catégories de résultats car l'identification du pathogène n'était pas précise ; en outre, il n'était pas indiqué s'il avait été vérifié que les huîtres utilisées expérimentalement étaient indemnes de l'infection préalablement l'essai de cohabitation en claires. Enfin, ces huîtres provenaient d'une localité australienne où le parasite *B. exitiosa* n'est pas endémique.
- *Ostrea denselamellosa* est actuellement incluse dans la liste des espèces sensibles à *B. ostrae* du *Code aquatique*. Toutefois, le Groupe *ad hoc* n'a pas été en mesure de classer cette espèce hôte dans une des catégories de résultats car la littérature (Le Borgne & Le Pennec, 1983) ne fournissait aucune information sur l'infection à *B. ostreae* chez cette espèce hôte.
- *Crassostrea gigas* est actuellement listée comme un « porteur » dans le *Manuel aquatique*. Toutefois, le Groupe *ad hoc* a indiqué que cette huître faisait partie des espèces hôtes pour lesquelles les informations recueillies étaient contradictoires (elle est classée dans la catégorie 3). Les résultats de deux études formelles (Culloty *et al.*, 1999 ; Renault *et al.*, 1995), dans leur intégralité ou de façon partielle, satisfont aux critères permettant de conclure à l'absence de sensibilité. Cette conclusion est d'ailleurs corroborée par l'absence de détection du parasite par les laboratoires de référence, et ce malgré une surveillance continue effectuée par le Laboratoire de référence de l'Union européenne (EURL) (données recueillies sur le site internet de l'EURL, les résultats partiels de l'étude indiquent que plus de 7200 animaux, appartenant à plus de 359 lots provenant d'aires où la présence de *Bonamia* sp. est reconnue, avaient été testés). A contrario, Gervais (2016) a rapporté avoir mis en évidence la présence de l'ARN de *Bonamia* sp. Dans une étude de Lynch *et al.* (2010), la présence du parasite à l'histologie a été observée pour trois animaux, ce qui questionne clairement l'assertion selon laquelle *Crassostrea gigas* ne serait pas sensible. Il est toutefois difficile de savoir si ces observations en histologie correspondent à un stade précoce de la phagocytose du parasite par l'hôte ou confèrent à cette espèce d'huître un statut de vecteur. Par conséquent, le Groupe *ad hoc* recommande que *C. gigas* fasse l'objet d'une nouvelle évaluation. Sa conduite sera conditionnée à la disponibilité d'informations additionnelles sur la viabilité des organismes détectés et/ou la finalisation d'une définition du terme « vecteur ».
- Le Groupe *ad hoc* a pris en considération l'article 1.5.9 du *Code aquatique* (relatif à l'inclusion d'un échelon taxonomique équivalent ou supérieur à celui du genre dans la liste des espèces sensibles) mais a estimé qu'il n'était pas applicable aux hôtes de *B. ostrae* identifiés à ce jour.
- Le Groupe *ad hoc* a estimé que la définition actuelle du terme « vecteur » n'était pas adaptée et a demandé que la Commission des animaux aquatiques discute d'une nouvelle proposition et décide en conséquence ;

- Le Groupe *ad hoc* a demandé que les incohérences entre les listes d'espèces sensibles à l'infection à *B. ostreae* figurant respectivement dans le *Code aquatique* (chapitre 11.3) et le *Manuel aquatique* (chapitre 2.4.3) soient supprimées conformément à ses recommandations. À titre d'exemple, le Groupe *ad hoc* a indiqué que l'espèce *O. denselamellosa* figurait dans la liste des espèces sensibles du *Code aquatique* mais pas dans celle du *Manuel aquatique*.
- Selon la base de données WoRMS, le nom scientifique de *Crassostrea gigas* devrait être *Magallana gigas*. Toutefois, Baynes et al. (2017) ont considéré que les résultats de la publication de Salvi & Mariottini (2017) n'étaient pas suffisamment robustes pour étayer la proposition de modification de la classification taxonomique de cette espèce.

## Références

- AUDEMARD, C., CARNEGIE, R. B., STOKES, N., BURRESON, E. M. & BISHOP, M. (2005). Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamia* sp. in *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Shellfish Research*, **24**(2), 639.
- BOUGRIER, S., TIGE, G., BACHERE, E. & GRIZEL, H. (1986). *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture*, **58**(1–2), 151–154. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90165-1)
- COCHENNEC, N., LE ROUX, F., BERTHE, F. & GERARD, A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(1), 26–32. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4939>
- COCHENNEC, N., RENAULT, T., BOUDRY, P., CHOLLET, B. & GERARD, A. (1998). *Bonamia*-like parasite found in the Suminoe oyster *Crassostrea rivularis* reared in France. *Diseases of Aquatic Organisms*, **34**(3), 193–197. <https://doi.org/10.3354/dao034193>
- CULLOTY, S. C., NOVOA, B., PERNAS, M., LONGSHAW, M., MULCAHY, M. F., FEIST, S. W. & FIGUERAS, A. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, **37**(1), 73–80. <https://doi.org/10.3354/dao037073>
- ENGELSMA, M. Y., CULLOTY, S. C., LYNCH, S. A., ARZUL, I. & CARNEGIE, R. B. (2014). *Bonamia* parasites: A rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110**(1–2), 5–23. <https://doi.org/10.3354/dao02741>
- FARLEY, C. A., WOLF, P. H. & ELSTON, R. A. (1988). A long-term study of “microcell” disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (G.N.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.)” *Fishery Bulletin*, **86**(3), 581–593.
- GERVAIS, O., CHOLLET, B., RENAULT, T. & ARZUL, I. (2016). Flat oyster follows the apoptosis pathway to defend against the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology*, **56**, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.021>
- GRIZEL H., COMPS M., RAGUENES D., LEBORGNE Y., TIGE G. & MARTIN A.G. (1983). Results of the acclimatization experiments of *Ostrea chilensis* on the Brittany coasts. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes Nantes* **46**(3), 209–225.
- KATKANSKY S.C., DAHLSTROM W.A. & WARNER R.W. (1969). Observations on survival and growth of the European flat oyster *Ostrea edulis* in California. *Calif. Fish. Game*, **55**, 69–74.
- LANE, H. S., WEBB, S. C. & DUNCAN, J. (2016). *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: A new host and geographic record for this haplosporidian parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, **118**(1), 55–63. <https://doi.org/10.3354/dao02960>
- LE BORGNE, Y. & LE PENNEC, M. (1983). Experimental rearing of the Asiatic oyster *Ostrea denselamellosa* (Lischke). *Vie Marine*, **5**, 23–28.
- LYNCH, S. A., ABOLLO, E., RAMILO, A., CAO, A., CULLOTY, S. C. & VILLALBA, A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137**(10), 1515–1526. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000326>
- LYNCH, S. A., ARMITAGE, D. V., COUGHLAN, J., MULCAHY, M. F. & CULLOTY, S. C. (2007). Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Experimental Parasitology*, **115**(4), 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.021>

MARTY, G. D., BOWER, S. M., CLARKE, K. R., MEYER, G., LOWE, G., OSBORN, A. L., CHOW, E. P., HANNAH, H., BYRNE, S., SOJONKY, K. & ROBINSON, J. H. (2006). Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture*, **261(1)**, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.024>

PASCUAL, M., MARTIN, A. G., ZAMPATTI, E., COATANEA, D., DEFOSSEZ, J. & ROBERT, R. (1991). Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. *Mariculture Commitee*, CM-K:30.

**Autres références examinées par le Groupe ad hoc mais auxquelles il n'est pas fait référence dans le tableau d'évaluation ci-dessus**

ABOLLO, E., RAMILO, A., CASAS, S. M., COMESAÑA, P., CAO, A., CARBALLAL, M. J. & VILLALBA, A. (2008). First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. *Aquaculture*, **274(2–4)**, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.037>

ANONYMOUS (1987). New Zealand oysters under threat. (1987). *Parasitology Today*, **3(2)**, 36. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90208-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90208-0)

ARZUL, I. (2018). Situation of European mollusc production regarding diseases. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **38(3)**, 130–139.

ARZUL, I. & CARNEGIE, R. B. (2015). New perspective on the haplosporidian parasites of molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*, **131**, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.014>

ARZUL, I., CHOLLET, B., GARCIA, C., ROBERT, M., JOLY, J.-P., MIOSSEC, L. & BERTHE, F. (2005). *Ostrea conchaphila*: a natural host of *Bonamia ostreae*? *Journal of Shellfish Research*, **24(1)**, 638–639.

ARZUL, I., CHOLLET, B., ROBERT, M., FERRAND, S., OMNES, E., LEROND, S., COUALEAU, Y., JOLY, J.-P., FRANÇOIS, C. & GARCIA, C. (2011). Can the protozoan parasite *Bonamia ostreae* infect larvae of flat oysters *Ostrea edulis*? *Veterinary Parasitology*, **179**, 69–76.

ARZUL, I., GAGNAIRE, B., BOND, C., CHOLLET, B., MORGA, B., FERRAND, S., ROBERT, M. & RENAULT, T. (2009). Effects of temperature and salinity on the survival of *Bonamia ostreae*, a parasite infecting flat oysters *ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85(1)**, 67–75. <https://doi.org/10.3354/dao02047>

AUDEMARD, C., CARNEGIE, R. B., STOKES, N., BURRESON, E. M. & BISHOP, M. (2005). Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamia* sp. in *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Shellfish Research*, **24(2)**, 639.

AUDEMARD, C., CARNEGIE, R. B., BISHOP, M. J., PETERSON, C. H. & BURRESON, E. M. (2008). Interacting effects of temperature and salinity on *Bonamia* sp. parasitism in the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **98(3)**, 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.010>

AUDEMARD, C., CARNEGIE, R. B., HILL, K. M., PETERSON, C. H. & BURRESON, E. M. (2014). *Bonamia exitiosa* transmission among, and incidence in, Asian oyster *Crassostrea ariakensis* under warm euhaline conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110(1–2)**, 143–150. <https://doi.org/10.3354/dao02648>

BACHERE, E. & GRIZEL, H. (1983). Receptivite de trois populations naturelles d'huitres plates *Ostrea edulis* L. au protozoaire *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1980). *Revue Des Travaux de l'Institut Des Pêches Maritimes*, **47(3–4)**, 237–240. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1827/>

BARBER, B. J. & DAVIS, C. B. (1994). Disease studies in Maine - 1993. *Journal of Shellfish Research*, **13(1)**, 311.

BATISTA, F. M., LÓPEZ-SANMARTÍN, M., GRADE, A., NAVAS, J. I. & RUANO, F. (2016). Detection of *Bonamia exitiosa* in the European flat oyster *Ostrea edulis* in southern Portugal. *Journal of Fish Diseases*, **39(5)**, 607–611. <https://doi.org/10.1111/jfd.12396>

- BAUD, J. P., GÉRARD, A. & NACIRI-GRAVEN, Y. (1997). Comparative growth and mortality of *Bonamia ostreae*-resistant and wild flat oysters, *Ostrea edulis*, in an intensive system. I. First year of experiment. *Marine Biology*, **130**(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s002270050226>
- BAYNE B. L., AHRENS M., ALLEN S. K., D'AURIAC M. ANGLES, BACKELJAU T., BENINGER P., BOHN R., BOUDRY PIERRE, DAVIS J., GREEN T., GUO X., HEDGECOCK D., IBARRA A., KINGSLEY-SMIT P., KRAUSE M., LANGDON C., LAPEGUE SYLVIE, LI C., MANAHAN D., MANN R., PEREZ-PARALLE L., POWELL E. N., RAWSON P. D., SPEISER D., SANCHEZ J. -L., SHUMWAY S. & WANG H. (2017). The Proposed Dropping of the Genus *Crassostrea* for All Pacific Cupped Oysters and Its Replacement by a New Genus *Magallana*: A Dissenting View. *Journal of Shellfish Research*, **36**(3), 545-547. Publisher's official version <https://doi.org/10.2983/035.036.0301> , Open Access version <https://archimer.ifremer.fr/doc/00418/52944/>
- BEARE, W. E., CULLOTY, S. C. & BURNELL, G. (1998). Some observations on spatial and temporal variation in prevalence of infection of *Bonamia ostreae* (Pichot et al, 1980) in the native flat oyster *Ostrea edulis* (L.) in Galway Bay, Ireland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*.
- BERTHE, F. C. J. & HINE, P. M. (2003). *Bonamia exitiosa* Hine et al., 2001 is proposed instead of *B. exitiosus* as the valid name of *Bonamia* sp. infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **57**(1–2), 181. <https://doi.org/10.3354/dao057181>
- BISHOP, M. J., CARNEGIE, R. B., STOKES, N. A., PETERSON, C. H. & BURRESON, E. M. (2006). Complications of a non-native oyster introduction: Facilitation of a local parasite. *Marine Ecology Progress Series*, **325** (November), 145–152. <https://doi.org/10.3354/meps325145>
- BODOY, A., BOUGRIER, S., GEAIRON, P., GARNIER, J., BOULO, V. & HEURTEBISE, S. (1991). Does the prevalence of *Bonamia* and *Marteilia* diseases be reduced on flat oysters (*Ostrea edulis*) of Atlantic and Mediterranean origin, when they are reared together with the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) in tidal ponds? *Ices Cm*, **K**(28), 1–9. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3049/>
- BOUGRIER, S., TIGE, G., BACHERE, E. & GRIZEL, H. (1986). *Ostrea angasi* acclimatization to French coasts. *Aquaculture*, **58**(1–2), 151–154. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(86\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(86)90165-1)
- BREHELIN, M., BONAMI, J. R., COUSSERANS, F. & VIVARES, C. P. (1982). True plasmodial forms exist in *Bonamia ostreae*, a pathogen of the European flat oyster, *Ostrea edulis* (n.d.). *Comptes rendus des seances de l'Academie des Sciences. Serie III. Sciences de la Vie*, **295** (1), 45–48.
- BUCKE, D., & HEPPEL, B. (1985). *Bonamia ostreae* infecting *Ostrea lutaria* in the U.K. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **7**(3), 79–80.
- BURRESON, E. M., STOKES, N. A., CARNEGIE, R. B. & BISHOP, M. J. (2004). *Bonamia* sp. (Haplosporidia) found in nonnative oysters *Crassostrea ariakensis* in Bogue Sound, North Carolina. *Journal of Aquatic Animal Health*, **16**(1), 1–9. <https://doi.org/10.1577/H03-008.1>
- BUSS, J. J., HARRIS, J. O., ELLIOT TANNER, J., HELEN WILTSHIRE, K. & DEVENEY, M. R. (2020). Rapid transmission of *Bonamia exitiosa* by cohabitation causes mortality in *Ostrea angasi*. *Journal of Fish Diseases*, **43**(2), 227–237. <https://doi.org/10.1111/jfd.13116>
- BUSS, J. J., WILTSHIRE, K. H., PROWSE, T. A. A., HARRIS, J. O. & DEVENEY, M. R. (2019). *Bonamia* in *Ostrea angasi*: Diagnostic performance, field prevalence and intensity. *Journal of Fish Diseases*, **42**(1), 63–74. <https://doi.org/10.1111/jfd.12906>
- CÁCERES-MARTÍNEZ, J., ROBLEDO, J. A. F. & FIGUERAS, A. (1995). Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rates and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ría de Vigo, Galicia (NW Spain). *Aquaculture*, **130**(1), 15–23. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00152-E](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00152-E)
- CAMPALANS, M. & LOHRMANN, K. B. (2009). Histological survey of four species of cultivated molluscs in Chile susceptible to OIE notifiable diseases. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, **44**(3), 561–569. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572009000300004>

- CAO, A., FUENTES, J., COMESAÑA, P., CASAS, S. M. & VILLALBA, A. (2009). A proteomic approach envisaged to analyse the bases of oyster tolerance/resistance to bonamiosis. *Aquaculture*, **295**(3–4), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.044>
- CARNEGIE, R. B. & ENGELSMA, M. Y. (2014a). Microcell parasites of molluscs: Introduction to DAO Special 7. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110**(1–2), 1–4. <https://doi.org/10.3354/dao02787>
- CARNEGIE, R. B., HILL, K. M., STOKES, N. A. & BURRESON, E. M. (2014b). The haplosporidian *Bonamia exitiosa* is present in Australia, but the identity of the parasite described as *Bonamia* (formerly *Mikrocytos*) *roughleyi* is uncertain. *Journal of Invertebrate Pathology*, **115**(1), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.017>
- CARNEGIE, R. B., STOKES, N. A., AUDEMARD, C., BISHOP, M. J., WILBUR, A. E., ALPHIN, T. D., POSEY, M. H., PETERSON, C. H. & BURRESON, E. M. (2008). Strong seasonality of *Bonamia* sp. infection and induced *Crassostrea ariakensis* mortality in Bogue and Masonboro Sounds, North Carolina, USA. *Journal of Invertebrate Pathology*, **98**(3), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.009>
- CARNEGIE, R. B., BURRESON, E. M., MIKE HINE, P., STOKES, N. A., AUDEMARD, C., BISHOP, M. J. & PETERSON, C. H. (2006). *Bonamia perspora* n. sp. (Haplosporidia), a parasite of the oyster *Ostreola equestris*, is the first *Bonamia* species known to produce spores. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **53**(4), 232–245. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00100.x>
- CARNEGIE, R. B. & COCHENNEC-LAUREAU, N. (2004). Microcell parasites of oysters: Recent insights and future trends. *Aquatic Living Resources*, **17**(4), 519–528. <https://doi.org/10.1051/alr:2004055>
- CARNEGIE, R. B. & BARBER, B. J. (2001). Growth and mortality of *Ostrea edulis* at two sites on the Damariscotta river estuary, Maine, USA. *Journal of the World Aquaculture Society*, **32**(2), 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb01099.x>
- CARNEGIE, R. B., BARBER, B. J. & DISTEL, D. L. (1998). *Bonamia* research in Maine: an update. *Journal of shellfish research*, **1**, 350.
- CARRASCO N., VILLALBA A., ANDREE K.B., ENGELSMA M.Y., LACUESTA B., RAMILO A., GAIRIN I. & FURONES M.D. (2012). *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) observed infecting the European flat oyster *Ostrea edulis* cultured on the Spanish Mediterranean coast. *Journal of Invertebrate Pathology*, **110**(3), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.015>
- CHAGOT, D., BOULO, V., HERVIO, D., MIALHE, E., BACHERE, E., MOURTON, C., & GRIZEL, H. (1992). Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): Entry mechanisms. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(3), 241–249. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90128-Q](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90128-Q)
- CIGARRIA, J., & ELSTON, R. (1997). Independent introduction of *Bonamia ostreae*, a parasite of *Ostrea edulis*, to Spain. *Disease of Aquatic Organisms*, **29**(2), 157–158. <https://doi.org/10.3354/dao029157>
- COCHENNEC-LAUREAU, N. (2002). Analyse bibliographique : historique de l’huître plate, *Ostrea edulis*, et la Bonamiose, maladie due au protozoaire *Bonamia ostreae*. Rapport IFREMER., **51**.
- COCHENNEC, N., LE ROUX, F., BERTHE, F. & GERARD, A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(1), 26–32. <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4939>
- COCHENNEC, N., RENAULT, T., BOUDRY, P., CHOLLET, B. & GERARD, A. (1998). *Bonamia*-like parasite found in the Suminoe oyster *Crassostrea rivularis* reared in France. *Diseases of Aquatic Organisms*, **34**(3), 193–197. <https://doi.org/10.3354/dao034193>
- COCHENNEC, N., HERVIO, D., PANATIER, B., BOULO, V., MIALHE, E., ROGIER, H., GRIZEL, H & PAOLUCCI, F. (1992). A direct monoclonal-antibody sandwich immunoassay for detection of *Bonamia ostreae* (Ascetospora) in hemolymph samples of the flat oyster *Ostrea edulis* (Mollusca, Bivalvia). *Diseases of Aquatic Organisms*, **12**, 129–134.



- COCHENNEC-LAUREAU, N., AUFFRET, M., RENAULT, T. & LANGLADE, A. (2003a). Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **83**(1), 23–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(03\)00015-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(03)00015-6)
- COCHENNEC-LAUREAU, N., REECE, K. S., BERTHE, F. C. J. & HINE, P. M. (2003b). *Mikrocytos roughleyi* taxonomic affiliation leads to the genus *Bonamia* (Haplosporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, **54**(3), 209–217. <https://doi.org/10.3354/dao054209>
- COMESAÑA, P., CASAS, S. M., CAO, A., ABOLLO, E., ARZUL, I., MORGA, B. & VILLALBA, A. (2012). Comparison of haemocytic parameters among flat oyster *Ostrea edulis* stocks with different susceptibility to bonamiosis and the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **109**(3), 274–286. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.007>
- COMPS, P. M. (1985). Haemocytic disease of flat oyster. *International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen (Denmark)*, **18**, 4–8. <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5192>
- CONCHAS, R. F., SANTAMARINA, J., LAMA, A., LONGA, M. A. & MONTES, J. (2003). Evolution of Bonamiosis in Galicia (NW Spain). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **23**(6), 265–272.
- CORBEIL, S., ARZUL, I., ROBERT, M., BERTHE, F. C. J., BESNARD-COCHENNEC, N. & CRANE, M. S. J. (2006). Molecular characterisation of an Australian isolate of *Bonamia exitiosa*. *Diseases in aquatic organisms*, **71**, 81–85.
- CRANFIELD, H. J., DUNN, A., DOONAN, I. J. & MICHAEL, K. P. (2005). *Bonamia exitiosa* epizootic in *Ostrea chilensis* from Foveaux Strait, southern New Zealand between 1986 and 1992. *ICES Journal of Marine Science*, **62**(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.06.021>
- CULLOTY, S. C. & MULCAHY, M. F. (1996). Season-, age-, and sex-related variation in the prevalence of bonamiosis in flat oysters (*Ostrea edulis* L.) on the south coast of Ireland. *Aquaculture*, **144**, 53–63.
- CULLOTY, S. C., CRONIN, M. A. & MULCAHY, M. F. (2004). Potential resistance of a number of populations of the oyster *Ostrea edulis* to the parasite *Bonamia ostreae*. *Aquaculture*, **237**(1–4), 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.04.007>
- CULLOTY, S. C., CRONIN, M. A. & MULCAHY, M. F. (2001). An investigation into the relative resistance of Irish flat oysters *Ostrea edulis* L. to the parasite *Bonamia ostreae* (Pichot *et al.*, 1980). *Aquaculture*, **199**(3–4), 229–244. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00569-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00569-5)
- CULLOTY, S. C. & MULCAHY, M. F. (2001). Living with bonamiasis: Irish research since 1987. *Hydrobiologia*, **465**, 181–186. <https://doi.org/10.1023/A:1014553227974>
- CULLOTY, S. C., NOVOA, B., PERNAS, M., LONGSHAW, M., MULCAHY, M. F., FEIST, S. W. & FIGUERAS, A. (1999). Susceptibility of a number of bivalve species to the protozoan parasite *Bonamia ostreae* and their ability to act as vectors for this parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, **37**(1), 73–80. <https://doi.org/10.3354/dao037073>
- DA SILVA, P., COMESAÑA, P., FUENTES, J. & VILLALBA, A. (2008). Variability of haemocyte and haemolymph parameters in European flat oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins and relation with infection by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology*, **24**(5), 551–563. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.11.003>
- DA SILVA, P. M., FUENTES, J. & VILLALBA, A. (2009). Differences in gametogenic cycle among strains of the European flat oyster *Ostrea edulis* and relationship between gametogenesis and bonamiosis. *Aquaculture*, **287**(3–4), 253–265. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.055>
- DA SILVA, P. M., FUENTES, J. & VILLALBA, A. (2005). Growth, mortality and disease susceptibility of oyster *Ostrea edulis* families obtained from brood stocks of different geographical origins, through on-growing in the Ría de Arousa (Galicia, NW Spain). *Marine Biology*, **147**(4), 965–977. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1627-4>

- DA SILVA, P. M. & VILLALBA, A. (2004). Comparison of light microscopic techniques for the diagnosis of the infection of the European flat oyster *Ostrea edulis* by the protozoan *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**(2), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.12.010>
- DA SILVA, P. M., VILLALBA, A. & FUENTES, J. (2003). Growth and mortality of different *Ostrea edulis* stocks cultured in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain). *Journal of Shellfish Research*, **22**(1), 326.
- DE LA BALLINA, N. R., VILLALBA, A. & CAO, A. (2018). Proteomic profile of *Ostrea edulis* haemolymph in response to bonamiosis and identification of candidate proteins as resistance markers. *Diseases of Aquatic Organisms*, **128**(2), 127–145. <https://doi.org/10.3354/dao03220>
- DE LA BALLINA, N. R., RAMILO, A., VILLALBA, A. & CAO, A. (2013). Proteomic approach to identify markers of resistance to bonamiosis in the proteins of the oyster *Ostrea edulis* haemolymph. *Fish & Shellfish Immunology*, **34**(6), 1703. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.03.203>
- DES CLERS, S. (1991). Models for a *Bonamia ostreae* epidemic in a cohort of cultured European flat oysters, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **93**(3), 253–262. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90237-2)
- DINAMANI, P., HINE, P. M. & JONES, J. B. (1987). Occurrence and characteristics of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in the New Zealand dredge oyster *Tiostrea lutaria*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **3**, 37–44.
- DOLDAN, M. S., MORSAN, E. M., ZAIDMAN, P. C. & KROECK, M. A. (2014). Analysis of large-scale spatio-temporal trends of *Ostrea puelchana* beds in Northern Patagonian Gulfs, Argentina. *Marine Environmental Research*, **101**(1), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.003>
- DOONAN, I. J., CRANFIELD, H. J. & MICHAEL, K. P. (1994). Catastrophic reduction of the oyster, *Ostrea chilensis* (Bivalvia: Ostreidae), in Foveaux Strait, New Zealand, due to infestation by the protistan *Bonamia* sp. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **28**(4), 335–344. <https://doi.org/10.1080/00288330.1994.9516623>
- DUNGAN, C. F., CARNEGIE, R. B., HILL, K. M., MCCOLLOUGH, C. B., LARAMORE, S. E., KELLY, C. J., STOKES, N. A. & SCARPA, J. (2012). Diseases of oysters *Crassostrea ariakensis* and *C. virginica* reared in ambient waters from the Choptank River, Maryland and the Indian River Lagoon, Florida. *Diseases of Aquatic Organisms*, **101**(3), 173–183. <https://doi.org/10.3354/dao02531>
- DUNN, A., CRANFIELD, H. J., DOONAN, I. J. & MICHAEL, K. P. (2000). Revised estimates of natural mortality for the Foveaux Strait oyster (*Ostrea chilensis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **34**(4), 661–667. <https://doi.org/10.1080/00288330.2000.9516967>
- EFSA-Q-, Q. N. (2008). Possible vector species and live stages of susceptible species not transmitting disease as regards certain mollusc diseases - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA Journal*, **6**(1), 1–117. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.597>
- ELSTON, R. & HOLSINGER, L. (1988). Resistant flat oysters offer hope against Bonamiasis. *Parasitology Today*, **4**(5), 120–121. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90182-2](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90182-2)
- ELSTON, R. A., KENT, M. L. & WILKINSON, M. T. (1987). Resistance of *Ostrea edulis* to *Bonamia ostreae* infection. *Aquaculture*, **64**(3), 237–242. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90328-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90328-0)
- ELSTON R. A., FARLEY C. A. & KENT M.L. (1986). Occurrence and significance of bonamiosis in European flat oysters *Ostrea edulis* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms*, **2**(1), 49–54.
- ENGELSMA, M. Y., CULLOTY, S. C., LYNCH, S. A., ARZUL, I. & CARNEGIE, R. B. (2014). *Bonamia* parasites: A rapidly changing perspective on a genus of important mollusc pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110**(1–2), 5–23. <https://doi.org/10.3354/dao02741>
- ENGELSMA, M. Y., KERKHOFF, S., ROOZENBURG, I., HAENEN, O. L. M., VAN GOOL, A., SISTERMANS, W., WIJNHOFEN, S. & HUMMEL, H. (2010). Epidemiology of *Bonamia ostreae* infecting European flat Oysters *Ostrea edulis* from Lake Grevelingen, The Netherlands. *Marine Ecology Progress Series*, **409**, 131–142. <https://doi.org/10.3354/meps08594>

- FARLEY, C. A., WOLF, P. H. & ELSTON, R. A. (1988). A long-term study of “microcell” disease in oysters with a description of a new genus, *Mikrocytos* (G.N.), and two new species, *Mikrocytos mackini* (sp.n.) and *Mikrocytos roughleyi* (sp.n.).” *Fishery Bulletin*, **86**(3), 581–593.
- FENG, C., LIN, X., WANG, F., ZHANG, Y., LV, J., WANG, C., DENG, J., MEI, L., WU, S. & LI, H. (2013). Detection and characterization of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* imported to China. *Diseases of Aquatic Organisms*, **106**(1), 85–91. <https://doi.org/10.3354/dao02631>
- FIGUERAS, A. & ROBLEDO, J. A. F. (1994). *Bonamia ostreae* present in flat oysters (*Ostrea edulis*) does not infect mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Bulletin European Association of Fish Pathologists*, **14**(3), 98. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/256548188>
- FIGUERAS, A. J. (1991). *Bonamia* status and its effects in cultured flat oysters in the Ria de Vigo, Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, **93**(3), 225–233. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90234-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90234-X)
- FLANNERY, G., LYNCH, S. A. & CULLOTY, S. C. (2016). Investigating the significance of the role of *Ostrea edulis* larvae in the transmission and transfer of *Bonamia ostreae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **136**, 7–9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.02.001>
- FLANNERY, G., LYNCH, S. A., CARLSSON, J., CROSS, T. F. & CULLOTY, S. C. (2014a). Assessment of the impact of a pathogen, *Bonamia ostreae*, on *Ostrea edulis* oyster stocks with different histories of exposure to the parasite in Ireland. *Aquaculture*, **432**, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.038>
- FLANNERY, G., LYNCH, S. A., LONGSHAW, M., STONE, D., MARTIN, P., RAMILO, A., VILLALBA, A. & CULLOTY, S. C. (2014b). Interlaboratory variability in screening for *Bonamia ostreae*, a protistan parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110**(1–2), 93–99. <https://doi.org/10.3354/dao02717>
- FRIEDMAN, C. S., BROWN, H. M., EWING, T. W., GRIFFIN, F. J. & CHERR, G. N. (2005). Pilot study of the Olympia oyster *Ostrea conchaphila* in the San Francisco Bay estuary: Description and distribution of diseases. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65**(1), 1–8. <https://doi.org/10.3354/dao065001>
- FRIEDMAN, C. S. & PERKINS, F. O. (1994). Range extension of *Bonamia ostreae* to Maine, U.S.A. *Journal of Invertebrate Pathology*, **64**(3), 179–181. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(94)90075-2)
- FRIEDMAN, C. S., MCDOWELL, T., GROFF, J. M., HOLLIBAUGH, J. T., MANZER, D. & HEDRICK, R. P. (1989). Presence of *Bonamia ostreae* among populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis* Linne, in California, USA. *Journal of Shellfish Research*, **8**(1), 133–137.
- FU, D., DUNN, A., MICHAEL, K. P. & HILLS, J. (2016). The development and performance of a length-based stock assessment of Foveaux Strait oysters (*Ostrea chilensis*, OYU 5) in southern New Zealand, and application to management. *Fisheries Research*, **183**(May), 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.05.003>
- GAGNÉ, N., COCHENNEC, N., STEPHENSON, M., MCGLADDERY, S., MEYER, G. R. & BOWER, S. M. (2008). First report of a *Mikrocytos*-like parasite in European oysters *Ostrea edulis* from Canada after transport and quarantine in France. *Diseases of Aquatic Organisms*, **80**(1), 27–35. <https://doi.org/10.3354/dao01922>
- GARCIA, C., HAOND, C., CHOLLET, B., NERAC, M., OMNES, E., JOLY, J. P., DUBREUIL, C., SERPIN, D., LANGLADE, A., LE GAL, D., TERRE-TERRILLON, A., CUTOIS, O. & ARZUL, I. (2018). Descriptions of *Mikrocytos veneroïdes* n. sp. and *Mikrocytos donaxi* n. sp. (Ascetosporea: Mikrocytida: Mikrocytiidae), detected during important mortality events of the wedge clam *Donax trunculus* Linnaeus (*Veneroïda: Donacidae*), in France between 2008 and 2011. *Parasites and Vectors*, **11**(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2692-0>
- GERVAIS, O., CHOLLET, B., DUBREUIL, C., DURANTE, S., FENG, C., HÉNARD, C., LECADÉ, C., SERPIN, D., TRISTAN, R. & ARZUL, I. (2019). Involvement of apoptosis in the dialogue between the parasite *Bonamia ostreae* and the flat oyster *Ostrea edulis*. *Fish and Shellfish Immunology*, **93**, 958–964. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.035>

- GERVAIS, O., RENAULT, T. & ARZUL, I. (2018). Molecular and cellular characterization of apoptosis in flat oyster a key mechanisms at the heart of host-parasite interactions. *Scientific Reports*, **8(1)**, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29776-x>
- GERVAIS, O., CHOLLET, B., RENAULT, T. & ARZUL, I. (2016). Flat oyster follows the apoptosis pathway to defend against the protozoan parasite *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology*, **56**, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.07.021>
- GONZALEZ, M., ROJAS, P. & CAMPALANS, M. (2000). Haemocytic parasitosis in the farmed oyster *Tiostrea chilensis*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **20(1)**, 31. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/235921813>
- GRIZEL, H. (1983). Impact de *Marteilia refringens* et de *Bonamia ostreae* sur l'ostreiculture Bretonne. *CIEM Conseil International Pour l'Exploration de La Mer*. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/5924/>
- GRIZEL H., COMPS M., RAGUENES D., LEBORGNE Y., TIGE G. & MARTIN A.G. (1983). Results of the acclimatization experiments of *Ostrea chilensis* on the Brittany coasts. *Revue des Travaux de l'Institut des Peches Maritimes Nantes* **46(3)**, 209–225.
- GRIZEL, H., BACHERE, E., MIALHE, E. & TIGE, G. (1987). Solving parasite-related problems in cultured molluscs. *International Journal for Parasitology*, **17(2)**, 301–308. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90104-4](https://doi.org/10.1016/0020-7519(87)90104-4)
- HARRANG, E., HEURTEBISE, S., FAURY, N., ROBERT, M., ARZUL, I. & LAPÈGUE, S. (2015). Can survival of European flat oysters following experimental infection with *Bonamia ostreae* be predicted using QTLs? *Aquaculture*, **448**, 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.019>
- HARTIKAINEN, H., ASHFORD, O. S., BERNEY, C., OKAMURA, B., FEIST, S. W., BAKER-AUSTIN, C., STENTIFORD, G. D. & BASS, D. (2014). Lineage-specific molecular probing reveals novel diversity and ecological partitioning of haplosporidians. *ISME Journal*, **8(1)**, 177–186. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.136>
- HERVIO, D., BACHERE, E., BOULO, V., COCHENNEC, N., VUILLEMIN, V., LE COGUIC, Y., CAILLETAUX, G., MAZURIE, J. & MIALHE, E. (1995). Establishment of an experimental infection protocol for the flat oyster, *Ostrea edulis*, with the intrahaemocytic protozoan parasite, *Bonamia ostreae*: application in the selection of parasite-resistant oysters. *Aquaculture*, **132(3–4)**, 183–194. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00342-L](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00342-L)
- HICKMAN, B. & JONES, B. (1986). Foveaux Strait oyster disease survey. *Shellfisheries Newsletter*, **32**, 1–3.
- HILL-SPANIK, K. M., MCDOWELL, J. R., STOKES, N. A., REECE, K. S., BURRESON, E. M. & CARNEGIE, R. B. (2015). Phylogeographic perspective on the distribution and dispersal of a marine pathogen, the oyster parasite *Bonamia exitiosa*. *Marine Ecology Progress Series*, **536**, 65–76. <https://doi.org/10.3354/meps11425>
- HILL, K. M., STOKES, N. A., WEBB, S. C., HINE, P. M., KROECK, M. A., MOORE, J. D., MORLEY, M. S., REECE, K. S., BURRESON, E. M. & CARNEGIE, R. B. (2014). Phylogenetics of *Bonamia* parasites based on small subunit and internal transcribed spacer region ribosomal DNA sequence data. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110(1–2)**, 33–54. <https://doi.org/10.3354/dao02738>
- HILL, K. M., CARNEGIE, R. B., ALOUI-BEJAOU, N., GHARSALLI, R. EL, WHITE, D. M., STOKES, N. A. & BURRESON, E. M. (2010). Observation of a *Bonamia* sp. infecting the oyster *Ostrea stentina* in Tunisia, and a consideration of its phylogenetic affinities. *Journal of Invertebrate Pathology*, **103(3)**, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.12.011>
- HINE, P. M. (1991a). Ultrastructural observations on the annual Infection pattern of *Bonamia* sp. in flat oysters *Tiostrea chilensis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **11**, 163–171. <https://doi.org/10.3354/dao011163>
- HINE, P. M. (1991b). The annual pattern of infection by *Bonamia* sp. in New Zealand flat oysters, *Tiostrea chilensis*. *Aquaculture*, **93(3)**, 241–251. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90236-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90236-Z)

- HINE, P. M., CARNEGIE, R. B., KROECK, M. A., VILLALBA, A., ENGELSMA, M. Y. & BURRESON, E. M. (2014). Ultrastructural comparison of *Bonamia* spp (Haplosporidia) infecting ostreid oysters. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110(1–2)**, 55–63. <https://doi.org/10.3354/dao02747>
- HINE, P. M., DIGGLES, B. K., PARSONS, M. J. D., PRINGLE, A. & BULL, B. (2002). The effects of stressors on the dynamics of *Bonamia exitiosus* Hine, Cochenec-Laureau & Berthe, infections in flat oysters *Ostrea chilensis* (Philippi). *Journal of Fish Diseases*, **25(9)**, 545–554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2002.00410.x>
- HINE, P. M., COCHENEC-LAUREAU, N. & BERTHE, F. C. J. (2001). *Bonamia exitiosus* n.sp. (Haplosporidia) infecting flat oysters *Ostrea chilensis* in New Zealand. *Diseases of Aquatic Organisms*, **47(1)**, 63–72. <https://doi.org/10.3354/dao047063>
- HINE, P. M. & JONES, J. B. (1994). *Bonamia* and other aquatic parasites of importance to New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, **21(1)**, 49–56. <https://doi.org/10.1080/03014223.1994.9517975>
- HUDSON, E. B. & HILL, B. J. (1991). Impact and spread of bonamiosis in the UK. *Aquaculture*, **93(3)**, 279–285. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90240-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90240-8)
- HUGH-JONES, D. (2007). Further *Bonamia* research in Cork. *Shellfish News*, **24**, 6–9.
- KATKANSKY S.C., DAHLSTROM W.A. & WARNER R.W. (1969). Observations on survival and growth of the European flat oyster *Ostrea edulis* in California. *Calif. Fish. Game*, **55**, 69–74.
- KISSNER, E. M. O., DEL SOCORRO DOLDAN, M., ZAIDMAN, P. C., MORSAN, E. M. & KROECK, M. A. (2014). Bonamiosis status in natural *Ostrea puelchana* beds in San Matías Gulf (Patagonia, Argentina), 14 years after an epizootic. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110(1–2)**, 135–142. <https://doi.org/10.3354/dao02707>
- KROECK, M. A. (2010). Gross signs and histopathology of *Ostrea puelchana* infected by a *Bonamia exitiosa*-like parasite (Haplosporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, **89(3)**, 229–236. <https://doi.org/10.3354/dao02186>
- KROECK, M. A., SEMENAS, L. & MORSAN, E. M. (2008). Epidemiological study of *Bonamia* sp. in the native flat oyster, *Ostrea puelchana* from San Matías Gulf (NW Patagonia, Argentina). *Aquaculture*, **276(1–4)**, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.013>
- KROECK, M. A. & MONTES, J. (2005). Occurrence of the haemocyte parasite *Bonamia* sp. in flat oysters *Ostrea puelchana* farmed in San Antonio Bay (Argentina). *Diseases of Aquatic Organisms*, **63(2–3)**, 231–235. <https://doi.org/10.3354/dao063231>
- LAFFERTY, K. D., PORTER, J. W. & FORD, S. E. (2004). Are diseases increasing in the ocean? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 31–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.35.021103.105704>
- LAING, I., DUNN, P., PEELER, E. J., FEIST, S. W. & LONGSHAW, M. (2014). Epidemiology of *Bonamia* in the UK, 1982 to 2012. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110(1–2)**, 101–111. <https://doi.org/10.3354/dao02647>
- LALLIAS, D., ARZUL, I., HEURTEBISE, S., FERRAND, S., CHOLLET, B., ROBERT, M., BEAUMONT, A. R., BOUDRY, P., MORGA, B. & LAPÈGUE, S. (2008). *Bonamia ostreae*-induced mortalities in one-year old European flat oysters *Ostrea edulis*: Experimental infection by cohabitation challenge. *Aquatic Living Resources*, **21(4)**, 423–439. <https://doi.org/10.1051/alr:2008053>
- LANE, H. S., JONES, B. & POULIN, R. (2018). Comparative population genetic study of an important marine parasite from New Zealand flat oysters. *Marine Biology*, **165(1)**, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3260-4>
- LANE, H. S., WEBB, S. C. & DUNCAN, J. (2016). *Bonamia ostreae* in the New Zealand oyster *Ostrea chilensis*: A new host and geographic record for this haplosporidian parasite. *Diseases of Aquatic Organisms*, **118(1)**, 55–63. <https://doi.org/10.3354/dao02960>
- LE BORGNE, Y. & LE PENNEC, M. (1983). Experimental rearing of the Asiatic oyster *Ostrea denselamellosa* (Lischke). *Vie Marine*, **5**, 23–28.

- LARAMORE, S. E., KREBS, W., LAVE, A. L. & GALLAGHER, K. (2017). Survey of Bivalve Molluscs for *Bonamia* spp. and Other Parasitic Pathogens in Florida East Coast Lagoons. *Journal of Shellfish Research*, **36(2)**, 379–390. <https://doi.org/10.2983/035.036.0211>
- LOHRMANN, K. B., HINE, P. M. & CAMPALANS, M. (2009). Ultrastructure of *Bonamia* sp. in *Ostrea chilensis* in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, **85(3)**, 199–208. <https://doi.org/10.3354/dao02093>
- LONGSHAW, M., STONE, D. M., WOOD, G., GREEN, M. J. & WHITE, P. (2013). Detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) in European flat oysters *Ostrea edulis* cultivated in mainland Britain. *Diseases of Aquatic Organisms*, **106(2)**, 173–179. <https://doi.org/10.3354/dao02643>
- LÓPEZ-FLORES, I., SUÁREZ-SANTIAGO, V. N., LONGET, D., SAULNIER, D., CHOLLET, B. & ARZUL, I. (2007). Characterization of actin genes in *Bonamia ostreae* and their application to phylogeny of the Haplosporidia. *Parasitology*, **134(14)**, 1941–1948. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003307>
- LYNCH, S. A., FLANNERY, G., HUGH-JONES, T., HUGH-JONES, D. & CULLOTY, S. C. (2014). Thirty-year history of Irish (Rossmore) *Ostrea edulis* selectively bred for disease resistance to *Bonamia ostreae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110(1–2)**, 113–121. <https://doi.org/10.3354/dao02734>
- LYNCH, S. A., ABOLLO, E., RAMILO, A., CAO, A., CULLOTY, S. C. & VILLALBA, A. (2010). Observations raise the question if the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, can act as either a carrier or a reservoir for *Bonamia ostreae* or *Bonamia exitiosa*. *Parasitology*, **137(10)**, 1515–1526. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000326>
- LYNCH, S. A., ARMITAGE, D. V., COUGHLAN, J., MULCAHY, M. F. & CULLOTY, S. C. (2007). Investigating the possible role of benthic macroinvertebrates and zooplankton in the life cycle of the haplosporidian *Bonamia ostreae*. *Experimental Parasitology*, **115(4)**, 359–368. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.09.021>
- LYNCH, S. A., ARMITAGE, D. V., WYLDE, S., MULCAHY, M. F. & CULLOTY, S. C. (2006). Inventory of benthic macroinvertebrates and zooplankton in several European *Bonamia ostreae*-endemic areas and their possible role in the life cycle of this parasite. *Marine Biology*, **149(6)**, 1477–1487. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0312-6>
- LYNCH, A. S. A., ARMITAGE, D. V., WYLDE, S., MULCAHY, M. F. & CULLOTY, S. C. (2005). The Susceptibility of young prespawning oysters, *Bonamia Ostreae*. *Journal of Shellfish Research*, **24(4)**, 1019–1025. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2005\)24\[1019:tsoypo\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[1019:tsoypo]2.0.co;2)
- MADSEN, L., KAMP, J. & MELLERGAARD, S. (2013). What can the Limfjord tell us about limiting factors for *Bonamia ostreae* in northern Europe? *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **33(5)**, 165–169.
- MARTY, G. D., BOWER, S. M., CLARKE, K. R., MEYER, G., LOWE, G., OSBORN, A. L., CHOW, E. P., HANNAH, H., BYRNE, S., SOJONKY, K. & ROBINSON, J. H. (2006). Histopathology and a real-time PCR assay for detection of *Bonamia ostreae* in *Ostrea edulis* cultured in western Canada. *Aquaculture*, **261(1)**, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.024>
- MCARDLE, J. F., MCKIERNAN, F., FOLEY, H. & JONES, D. H. (1991). The current status of *Bonamia* disease in Ireland. *Aquaculture*, **93(3)**, 273–278. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90239-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90239-4)
- MEYER, G. R., LOWE, G. J., KIM, E., ABBOTT, C. L., JOHNSON, S. C. & GILMORE, S. R. (2010). Health Status of Olympia Oysters (*Ostrea lurida*) in British Columbia, Canada. *Journal of Shellfish Research*, **29(1)**, 181–185. <https://doi.org/10.2983/035.029.0112>
- MICHAEL, K. P., DUNN, A. & FORMAN, J. (2006). A survey of *Bonamia exitiosa* infection, and oyster density and recruitment in Foveaux Strait dredge oyster (*Ostrea chilensis*). *New Zealand Fisheries Assessment Report*, **40**.
- MONTES, J. (1991). Lag time for the infestation of flat oyster (*Ostrea edulis* L.) by *Bonamia ostreae* in estuaries of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, **93(3)**, 235–239. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90235-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90235-Y)
- MONTES, J., CARBALLAL, M., LOPEZ, M. & MOURELLE, S. (1992). Incidence of bonamiasis in flat oyster, *Ostrea edulis* L., cultured in Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture*, **107**, 189–192.

- MONTES, J., FERRO-SOTO, B., CONCHAS, R. F. & GUERRA, A. (2003). Determining culture strategies in populations of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, affected by bonamiosis. *Aquaculture*, **220**(1–4), 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00628-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00628-2)
- MONTES, J., LONGA, M. A. & LAMA, A. (1996). Prevalence of *Bonamia ostreae* in Galicia (NW Spain) during 1994. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **16**(1), 27–29.
- MONTES, J., ANADÓN, R. & AZEVEDO, C. (1994). A possible life cycle for *Bonamia ostreae* on the basis of electron microscopy studies. *Journal of Invertebrate Pathology*, **63**, 1-6. <https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1001>
- MONTES, J., VILLALBA, A., LOPEZ, M. C., CARBALLAL, M. J. & MOURELLE, S. G. (1991). Bonamiosis in native flat oysters (*Ostrea edulis* L.) from two intertidal beds of the Ortigueira estuary (Galicia, N.W. Spain) with different histories of oyster culture. *Aquaculture*, **93**(3), 213–224. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90233-W](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90233-W)
- MONTES, J. & MELENDEZ, M. I. (1987). Données sur la parasitose de *Bonamia ostreae* chez l’huître plate de Galice, côte nord-ouest de l’Espagne. *Aquaculture*, **67**(1–2), 195–198. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90026-3)
- MOORE, J. D., JUHASZ, C. I. & ROBBINS, T. T. (2011). A histopathology survey of California oysters. *California Fish and Game*, **97**(2), 68–83.
- MORGA, B., RENAULT, T., FAURY, N., LEROND, S., GARCIA, C., CHOLLET, B., JOLY, J.-P., LAPEGUE, S., HARRANG, E. & ARZU, I. (2017). Contribution of in vivo experimental challenges to understanding flat oyster *Ostrea edulis* resistance to *Bonamia ostreae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **7**, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00433>
- MOURTON, C., BOULO, V., CHAGOT, D., HERVIO, D., BACHERE, E., MIALHE, E. & GRIZEL, H. (1992). Interactions between *Bonamia ostreae* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): in vitro system establishment. *Journal of Invertebrate Pathology*, **59**(3), 235–240. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(92\)90127-P](https://doi.org/10.1016/0022-2011(92)90127-P)
- MURRAY, A. G., MARCOS-LOPEZ, M., COLLET, B. & MUNRO, L. A. (2012). A review of the risk posed to Scottish mollusc aquaculture from *Bonamia*, *Marteilia* and oyster herpesvirus. *Aquaculture*, **370–371**, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.033>
- NARCISI, V., ARZUL, I., CARGINI, D., MOSCA, F., CALZETTA, A., TRAVERSA, D., ROBERT, M., JOLY, P.P., CHOLLET, B., RENAULT, T. & TISCAR, P. G. (2010). Detection of *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* (haplosporidia) in *Ostrea edulis* from the Adriatic Sea (Italy). *Diseases of Aquatic Organisms*, **89**(1), 79–85. <https://doi.org/10.3354/dao02167>
- NELL, J. A. & PERKINS, B. (2006). Evaluation of the progeny of third-generation Sydney rock oyster *Saccostrea glomerata* (Gould, 1850) breeding lines for resistance to QX disease *Marteilia sydneyi* and winter mortality *Bonamia roughleyi*. *Aquaculture Research*, **37**(7), 693–700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2006.01482.x>
- PASCUAL, M., MARTIN, A. G., ZAMPATTI, E., COATANEA, D., DEFOSSEZ, J. & ROBERT, R. (1991). Testing of the Argentina oyster, *Ostrea puelchana*, in several French oyster farming sites. *Mariculture Commitee*, CM-K:30.
- PEELER, E. J., OIDTMANN, B. C., MIDTLYNG, P. J., MIOSSEC, L. & GOZLAN, R. E. (2011). Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biological Invasions*, **13**(6), 1291–1303. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9890-9>
- PÊKALA, A. (2007). Infection of flat oysters (*Ostrea edulis*) with *Bonamia ostreae*. *Medycyna Weterynaryjna*, **63**(5), 519–521.
- PICHOT, Y., COMPS, M., TIGE, G., GRIZEL, H. & RABOUIN, M.-A. (1979). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l’huître plate *Ostrea edulis* L. *Revue Des Travaux de l’Institut Des Pêches Maritimes*, **43**(1), 131–140. Retrieved from <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1833/>

- PODER, M., AUFFRET, M. & BALOUET, G. (1983). Etudes pathologiques et épidémiologiques des lésions parasitaires chez *Ostrea edulis* L. – Premiers résultats d’une recherche prospective comparative chez les principales espèces de mollusques des zones ostréicoles de Bretagne nord. *Bases Biologiques de l’aquaculture, Montpellier*, 125–138.
- PRADO-ALVAREZ, M., LYNCH, S. A., KANE, A., DARMODY, G., PARDO, B. G., MARTINEZ, P., COTTERILL, J., WONTNER-SMITH, T. & CULLOTY, S. C. (2015). Oral immunostimulation of the oyster *Ostrea edulis*: Impacts on the parasite *Bonamia ostreae*. *Fish and Shellfish Immunology*, **45**(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.019>
- PRADO-ALVAREZ, M., CHOLLET, B., COURALEAU, Y., MORGA, B. & ARZUL, I. (2013). Heat shock protein 90 of *Bonamia ostreae*: Characterization and possible correlation with infection of the flat oyster, *Ostrea edulis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **60**(3), 257–266. <https://doi.org/10.1111/jeu.12031>
- RAMILO, A., GONZÁLEZ, M., CARBALLAL, M. J., DARRIBA, S., ABOLLO, E. & VILLALBA, A. (2014a). Oyster parasites *Bonamia ostreae* and *B. Exitiosa* co-occur in Galicia (NW Spain): Spatial distribution and infection dynamics. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110**(1–2), 123–133. <https://doi.org/10.3354/dao02673>
- RAMILO, A., VILLALBA, A. & ABOLLO, E. (2014b). Species-specific oligonucleotide probe for detection of *Bonamia exitiosa* (Haplosporidia) using in situ hybridisation assay. *Diseases of Aquatic Organisms*, **110**(1–2), 81–91. <https://doi.org/10.3354/dao02646>
- RAMILO, A., NAVAS, J. I., VILLALBA, A. & ABOLLO, E. (2013). Species-specific diagnostic assays for *Bonamia ostreae* and *B. exitiosa* in European flat oyster *Ostrea edulis*: Conventional, real-time and multiplex PCR. *Diseases of Aquatic Organisms*, **104**(2), 149–161. <https://doi.org/10.3354/dao02597>
- RENAULT, T., COCHENNEC, N. & GRIZEL, H. (1995). *Bonamia ostreae*, parasite of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, does not experimentally infect the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathology*, **15**(3), 78–80.
- ROBERT, R., BOREL, M., PICHOT, Y. & TRUT, G. (1991). Growth and mortality of the European oyster *Ostrea edulis* in the Bay of Arcachon (France). *Aquatic Living Resources*, **4**(4), 265–274. <https://doi.org/10.1051/alr:1991028>
- ROGAN, E., CULLOTY, S. C., CROSS, T. F. & MULCAHY, M. F. (1991). The detection of *Bonamia ostreae* (Pichot et al. 1980) in frozen oysters (*Ostrea edulis* L.) and the effect of the parasite on condition. *Aquaculture*, **97**(4), 311–315. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90323-Y](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90323-Y)
- RONZA, P., CAO, A., ROBLEDO, D., GÓMEZ-TATO, A., ÁLVAREZ-DIOS, J. A., HASANUZZAMAN, A. F. M., QUIROGA, M. I., VILLALBA, A., PARDO, B. G. & MARTÍNEZ, P. (2018). Long-term affected flat oyster (*Ostrea edulis*) haemocytes show differential gene expression profiles from naïve oysters in response to *Bonamia ostreae*. *Genomics*, **110**(6), 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.04.002>
- SALVI, D. & P. MARIOTTINI. (2017). Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS 2 rRNA sequence structure approach guides the description of the oysters subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **179**:263–276.
- SCHOTT, E. J., FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A., ALAVI, M. R. & VASTA, G. R. (2008). Susceptibility of *Crassostrea ariakensis* (Fujita 1913) to *Bonamia* and *Perkinsus* spp. Infections: Potential for Disease Transmission Between Oyster Species. *Journal of Shellfish Research*, **27**(3), 541–549. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[541:socaft\]2.0.co;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[541:socaft]2.0.co;2)
- SÜHNEL, S., JOHNSON, S. C., GURNEY-SMITH, H. J., IVACHUK, C. D. S., SCHAEFER, A. L. C., THOMSON, C. A., MACIEL, M. L. T., MARTINS, M. L., ARANGUEREN, R., FIGUERAS, A. & MAGALHÃES, A. R. M. (2016). A Status Assessment of Perkinsiosis, Bonamiosis, and Mateiliosis in Commercial Marine Bivalves from Southern Brazil. *Journal of Shellfish Research*, **35**(1), 143–156. <https://doi.org/10.2983/035.035.0116>



- SUONG, N. T., BANKS, J. C., FIDLER, A., JEFFS, A., WAKEMAN, K. C. & WEBB, S. (2019). PCR and histology identify new bivalve hosts of Apicomplexan-X (APX), a common parasite of the New Zealand flat oyster *Ostrea chilensis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **132(3)**, 181–189. <https://doi.org/10.3354/dao03318>
- TIGÉ, G., DE KERGARIOU, G., COCHENNEC, N. & RABOUIN, M. A. (1986). Epidemiology of *Bonamia ostreae* and *Marteilia refringens* in Brittany 1984–1985: situation and evolution. *ICES Copenhagen*.
- TIGE, G. & GRIZEL, H. (1982a). Essai de contamination d'*Ostrea edulis* Linne par *Bonamia ostreae* (Pichot et al., 1979) en rivière de Crach (Morbihan). *Revue Des Travaux de l'Institut Des Pêches Maritimes*, **46(4)**, 307–314.
- TIGE, G., GRIZEL, H. & RABOUIN, M. (1982b). Hemogtary disease of the common oyster caused by *Bonamia ostreae*: evolution of the epizootologic state during 1981. *Sci. Peche*, **328**, 3–13.
- VAN BANNING, P. (1991). Observations on bonamiasis in the stock of the European flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Netherlands, with special reference to the recent developments in Lake Grevelingen. *Aquaculture*, **93(3)**, 205–211. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90232-V](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90232-V)
- VAN BANNING, P. (1990). The life cycle of the oyster pathogen *Bonamia ostreae* with a presumptive phase in the ovarian tissue of the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, **84(2)**, 189–192. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90348-Q](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90348-Q)
- VAN BANNING, P. (1987). Further results of the *Bonamia ostreae* challenge tests in Dutch oyster culture. *Aquaculture*, **67(1–2)**, 191–194. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90025-1)
- VÁZQUEZ, N. & CREMONTE, F. (2017). Review of Parasites and Pathologies of the Main Bivalve Species of Commercial Interest of Argentina and Uruguay, Southwestern Atlantic Coast. *Archives of Parasitology*, **1(2)**, 1–12.
- VERA, M., PARDO, B. G., CAO, A., VILAS, R., FERNÁNDEZ, C., BLANCO, A., GUTIERREZ, A. P., BEAN, T. P., HOUSTON, R. D., VILLALBA, A. & MARTÍNEZ, P. (2019). Signatures of selection for bonamiosis resistance in European flat oyster (*Ostrea edulis*): New genomic tools for breeding programs and management of natural resources. *Evolutionary Applications*, **12(9)**, 1781–1796. <https://doi.org/10.1111/eva.12832>
- ZABALETA A. I. & BARBER B.J. (1996). Commercial Interest of Argentina and Uruguay, Southwestern Atlantic Coast. *Journal of Shellfish Research*, **15(2)**, 395–400.
-

**RAPPORT DE RÉUNION DU GROUPE AD HOC  
SUR LA SENSIBILITÉ DES ESPÈCES DE MOLLUSQUES  
AUX MALADIES LISTÉES PAR L'OIE**

**Janvier - juin 2020**

**Liste des participants**

**MEMBRES DU GROUPE AD HOC**

---

**Dr Isabelle Arzul (Chair)**  
IFREMER  
Laboratoire de Génétique Aquaculture et  
Pathologie de Mollusques Marins  
17390 La Tremblade  
FRANCE  
Tél. : +33 5 46 76 2610  
iarzul@ifremer.fr  
[isabelle.arzul@ifremer.fr](mailto:isabelle.arzul@ifremer.fr)

**Dr Robert Adlard**  
Marine Biodiversity at  
Queensland Museum Network  
PO Box 3300, South Brisbane  
BC  
Queensland 4101  
AUSTRALIE  
[robert.adlard@gm.qld.gov.au](mailto:robert.adlard@gm.qld.gov.au)

**Dr Changming Bai**  
Yellow Sea Fisheries Research  
Institute, CAFS  
Division of Maricultural  
Organism Disease control and  
Molecular Pathology  
No. 106 Nanjing Road  
Qingdao, 266071  
RÉPUBLIQUE POPULAIRE DE  
CHINE  
[baicm@ysfri.ac.cn](mailto:baicm@ysfri.ac.cn)

**Dr Lori Gustafson**  
Surveillance Design and Analysis  
USDA/APHIS/VS/CEAH  
2150 Centre Ave, Bldg B  
Mail Stop 2E6  
Fort Collins, CO 80526-8117  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE  
[lori.l.gustafson@aphis.usda.gov](mailto:lori.l.gustafson@aphis.usda.gov)

**Dr Karin B. Lohrmann**  
Departamento de Biología  
Marina  
Facultad de Ciencias del Mar,  
Universidad Católica del Norte,  
Larrondo 1281, Coquimbo  
CHILI  
[klohrman@ucn.cl](mailto:klohrman@ucn.cl)

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

---

**Dr Kevin William Christison**  
Department of Environment Forestry and Fisheries  
Directorate: Aquaculture Research and Development  
Private Bag X 2V  
Vlaeberg, 8018  
SOUTH AFRICA  
[KChristison@environment.gov.za](mailto:KChristison@environment.gov.za)

**SIÈGE DE L'OIE**

---

**Jeannine Fischer**  
Chargée de mission  
Service des Normes  
[j.fischer@oie.int](mailto:j.fischer@oie.int)

**Dr Stian Johnsen**  
Chargé de mission  
Service des Normes  
[s.johnsen@oie.int](mailto:s.johnsen@oie.int)

**RAPPORT DE RÉUNION DU GROUPE AD HOC SUR  
LA SENSIBILITÉ DES ESPÈCES DE MOLLUSQUES  
AUX MALADIES LISTÉES PAR L'OIE**

**Janvier - juin 2020**

---

**Termes de référence**

**Contexte**

Un nouveau chapitre 1.5 « Critères d'inclusion dans la liste des espèces sensibles à une infection par un agent pathogène spécifique » a été ajouté dans l'édition de 2014 du *Code aquatique*. Ce chapitre a pour objet de fournir des critères permettant de déterminer les espèces hôtes devant être incluses dans la liste des espèces sensibles de l'article X.X.2 de chacun des chapitres spécifiques aux maladies listées du *Code aquatique*. Les critères seront progressivement appliqués à chacun des chapitres spécifiques aux maladies listées du *Code aquatique*.

Avant d'introduire la moindre modification dans la liste des espèces sensibles figurant dans les articles X.X.2 des chapitres spécifiques aux maladies du *Code aquatique*, les Groupes *ad hoc* communiqueront les évaluations réalisées par leurs soins aux États membres pour avis.

Les espèces, dont la sensibilité est démontrée par un certain nombre d'éléments, sans toutefois que ces éléments soient suffisamment probants au sens de l'approche décrite dans l'article 1.5.3 du *Code aquatique*, seront incluses dans le chapitre spécifique à la maladie concernée du *Manuel aquatique*, accompagnée des justifications nécessaires.

**Objectif**

Le Groupe *ad hoc* de l'OIE sur la sensibilité des espèces de mollusques aux maladies de la liste de l'OIE sera chargé de réaliser les évaluations pour les sept maladies des mollusques listées par l'OIE.

**Termes de référence**

- 1) Prendre en compte les éléments probants requis pour satisfaire aux critères décrits dans le chapitre 1.5.
- 2) Étudier la littérature scientifique consacrée à la sensibilité des espèces aux maladies des mollusques listées par l'OIE.
- 3) Proposer les espèces sensibles aux maladies des mollusques listées par l'OIE, en vertu de l'article 1.5.7.
- 4) Proposer les espèces sensibles aux maladies des mollusques listées par l'OIE, en vertu de l'article 1.5.8.

**Résultats attendus du Groupe *ad hoc***

- 1) Établir la liste des espèces sensibles destinée à figurer dans l'article X.X.2 de chacun des chapitres spécifiques aux maladies du *Code aquatique*.
- 2) Établir la liste des espèces pour lesquelles la sensibilité n'a pu être explicitement démontrée, destinée à figurer dans le paragraphe 2.2.2 de chacun des chapitres spécifiques aux maladies du *Manuel aquatique*.
- 3) Rédiger un rapport et le soumettre à la Commission des animaux aquatiques afin que celle-ci l'examine lors de sa réunion de septembre 2020.

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPTER 2.3.3.

# INFECTION WITH *GYRODACTYLUS SALARIS*

---

## 1. Scope

For the purpose of this chapter, Infection with *Gyrodactylus salaris* means infection with the pathogenic agent *Gyrodactylus salaris*, a viviparous freshwater ectoparasite (*G. salaris*) of the Genus *Gyrodactylus* and Family *Gyrodactylidae*, Order *Gyrodactylida*, and Class *Monogenea*.

## 2. Disease information

### 2.1. Agent factors

#### 2.1.1. Aetiological agent

Several strains or clades of *G. salaris* have been identified on the basis of genotyping with the mitochondrial cytochrome oxidase 1 (CO1) marker (Hansen *et al.*, 2003; 2007b; Meinilä *et al.*, 2002; 2004; Mieszkowska *et al.*, 2018). Although there does not seem to be an unambiguous correspondence between parasite strains as identified by CO1 and pathogenicity (Hansen *et al.*, 2007a), all strains recovered from Atlantic salmon (*Salmo salar*) that have been studied in laboratory experiments, so far, are highly pathogenic to strains of Atlantic salmon. Strains non-pathogenic to Atlantic salmon have been recovered from non-anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in Norway (Olstad *et al.*, 2007a; Robertsen *et al.*, 2007) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Denmark (Jørgensen *et al.*, 2007; Lindenstrøm *et al.*, 2003).

There has been a long taxonomic/scientific debate on whether *Gyrodactylus thymalli*, a species described from grayling (*Thymallus thymallus*), is a junior synonym of *G. salaris* (see e.g. Hansen *et al.*, 2003; 2007a, 2007b; Meinilä *et al.*, 2004; Fromm *et al.*, 2014), and most evidence favours such a synonymisation. The National Center for Biotechnology Information (NCBI) has accepted the a synonymisation of *G. salaris* and *G. thymalli* with the result that all accessions of DNA sequences previously assigned to *G. thymalli* are now assigned to *G. salaris*. Irrespective of this debate, strains isolated from grayling have never been found to be pathogenic to Atlantic salmon in experimental trials (see e.g. Sterud *et al.*, 2002), and have not been observed do not seem to occur on Atlantic salmon when in sympatry with grayling (Anttila *et al.*, 2008). ~~In~~ For the purpose of this chapter, it is assumed that *G. salaris* and *G. thymalli* are treated as two separate species.

#### 2.1.2. Survival and stability off the host or in processed or stored samples

Survival of detached *G. salaris* is temperature dependent: approximately 24 hours at 19°C, 54 hours at 13°C, 96 hours at 7°C and 132 hours at 3°C (Olstad *et al.*, 2006). *Gyrodactylus salaris* is known to survive between temperatures of 0°C to 25°C. Tolerance to temperatures above 25°C is unknown. *Gyrodactylus salaris* is sensitive to freezing and desiccation. It dies after a few days at pH≤5. It is more sensitive to low pH (5.1<pH<6.4) in association with aluminium and zinc than the host Atlantic salmon (Poleo *et al.*, 2004; Soleng *et al.*, 1999). ~~and recently, it was also found that *G. salaris* is sensitive to low doses of chlorine (Hagen *et al.*, 2014).~~ For inactivation methods, see Section 2.4.5.

#### 2.1.3. Survival and stability on host tissues

Survival of *G. salaris* attached to a dead host is temperature dependent: maximum survival times for *G. salaris* on dead Atlantic salmon are 72, 142 and 365 hours at 18°C, 12°C and 3°C, respectively (Olstad *et al.*, 2006).

## 2.2. Host factors

### 2.2.1. Susceptible host species

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with *G. salaris* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* ~~include are:~~ Arctic char (*Salvelinus alpinus*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), ~~North American brook trout (*Salvelinus fontinalis*), brown trout (*Salmo trutta*), grayling (*Thymallus thymallus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).~~

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

None known.

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

In addition, pathogen-specific positive polymerase chain reaction (PCR) results have identified *G. salaris* on the following organisms, but a long-term active infection has not been demonstrated: [Under study].

### 2.2.3. Non-susceptible species

Species that have been found non-susceptible to infection with *G. salaris* according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: none known [under study].

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

The prevalence and abundance of *G. salaris* on Atlantic strains of Atlantic salmon (*Salmon S. salar*) are higher than in on other susceptible species and Baltic strains of *S. salar*. All life stages are susceptible, but prevalence and abundance in on Atlantic salmon are highest in fry and parr stages, where mortality is also most likely to be observed.

For the purposes of Table 4.1 Atlantic salmon alevins and fry (e.g. up to approximately 1 g in weight) may be considered early life stages, parr and smolts can be considered as juveniles and all fish post smoltification as adults.

### 2.2.5. Distribution of the pathogen on the host

*Gyrodactylus salaris* usually occurs on the fins of infected Atlantic salmon, but the parasite distribution on the host may vary depending on intensity of infection (Jensen & Johnsen, 1992; Mo, 1992; Paladini *et al.*, 2014). Parasites are also commonly found on the body but less commonly on the gills. On other hosts, the distribution may be different, but in general the parasite is relatively less abundant on the fins and relatively more common on the body compared with Atlantic salmon.

### 2.2.6. Aquatic animal reservoirs of infection

There are a number of combinations of host species and *G. salaris* strains which do not result in clinical signs of disease and may, therefore, act as reservoirs of infection. ~~Some~~ Several stocks of Atlantic salmon in the Baltic region are infected with *G. salaris* but do not generally show clinical signs or suffer mortality (Anttila *et al.*, 2008). *Gyrodactylus salaris* has been found in wild Arctic char without any observable signs or mortality (Robertsen *et al.*, 2007). Rainbow trout can be infected with some strains of *G. salaris* at a very low prevalence and abundance without observable signs (Paladini *et al.*, 2014).

### 2.2.7. Vectors

*Gyrodactylus salaris* parasites may attach themselves to any fish species not considered a susceptible species, for short periods of time. On some species limited reproduction takes place, but insufficient for the parasite to maintain a persistent infection (Paladini *et al.*, 2014). Thus, whilst any fish species could act as a vector, those on which reproduction occurs, are more likely to act as vectors. However, there is no evidence from the published literature that fish vectors they are important in the epidemiology of have transmitted *G. salaris*.

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Mortality in farmed Atlantic salmon fry and parr can be 100% if not treated. Mortality in wild Atlantic salmon fry and parr in Norwegian rivers can be as high as 98%, with an average of about 85% (Johnsen *et al.*, 1999). Mortality in other susceptible species is usually low to negligible.

Prevalence in susceptible strains of Atlantic salmon reaches close to 100% in wild parr in rivers (Appleby & Mo, 1997); similarly, prevalence in farmed Atlantic salmon (in freshwater) rises to close to 100% within a short time after introduction of the parasite. Prevalence in resistant strains of Atlantic salmon in rivers and farms is unknown likely to be low, but has not been well documented (Bakke *et al.*, 2007) and highly variable depending on season, location and age of the fish (Anttila *et al.*, 2008). Prevalence in other susceptible species is usually much lower than in Atlantic salmon and can be below 10% (e.g. in farmed rainbow trout; Buchmann & Bresciani, 1997).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Usually there are no clinical signs in Wild Atlantic salmon with low infections intensities (one or up to a few tens) of *G. salaris* parasites usually do not exhibit any clinical signs. Increased parasite mean intensity over time often leads to increased flashing (fish scratch their skin on the substrate), increased mucous production (giving the fish a greyish appearance) and erosion of the fins. In the early disease phase in susceptible stocks of wild Atlantic salmon, increased flashing (fish scratch their skin on the substrate) is typical. Later, fish may become greyish because of increased mucous production and the fins may be eroded. Diseased fish are lethargic and are usually found in slower moving water.

Flashing is common among moderate to heavily infected farmed Atlantic salmon as they scratch their skin on the bottom or wall of a tank or pond. Heavily infected fish may have reduced activity and stay in low current areas.

Susceptible species other than Atlantic salmon usually only carry low numbers of *G. salaris* parasites and do not show clinical signs. Rainbow trout usually only carry low numbers of *G. salaris* parasites and do not show clinical signs.

### 2.3.3 Gross pathology

Heavily infected Atlantic salmon may become greyish as a result of increased mucification, and at a later stage the dorsal and pectoral fins may become whitish as a result of increased thickness (mainly hypertrophy hyperplasia) of the epidermis. As the infestation continues, fish may have eroded fins, especially dorsal, tail and pectoral fins, because of parasite feeding. Secondary fungal infections (*Saprolegnia* spp.) are commonly observed in fish with infection with *G. salaris*.

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

*Gyrodactylus salaris* is an obligate parasite with a direct life cycle. Parasites give birth to live offspring, and there are no other life stages. *Gyrodactylus salaris* can transfer to a new host via contact with live hosts, dead hosts, detached parasites drifting in the water column, or parasites attached to the substrate.

*Gyrodactylus salaris* has spread between rivers and farms mainly by the translocation of live fish. Fish migrating through brackish water can also spread the parasite between neighbouring rivers (see also Section 2.3.5). The risk of transmission is greater between rivers located within the same brackish water system.

### 2.3.5. Environmental and management factors

*Gyrodactylus salaris* is a cold-water-adapted parasite and mainly lives in freshwater, reproducing normally at salinities up to 5–6 ppt (Malmberg, 1973; 1988). The average number of offspring per parasite peaks between 6.5°C and 13.0°C (Jansen & Bakke *et al.*, 1991). At lower temperatures, *Gyrodactylus salaris* can survive longer in higher salinities at lower temperatures (Soleng & Bakke, 1997). For example at 1.4°C, *G. salaris* may survive for 240 hours, 78 hours and 42 hours at 10 ppt, 15 ppt and 20 ppt salinity, respectively, while at 12°C it may survive for 72 hours, 24 hours and 12 hours at the same three salinities, respectively (Soleng & Bakke, 1997).

Although *G. salaris* mainly lives in freshwater, it reproduces normally at salinities up to 5–6 ppt. Survival at higher salinities is temperature dependent. For example at 1.4°C, *G. salaris* may survive for 240 hours, 78 hours and 42 hours at 10 ppt, 15 ppt and 20 ppt salinity, respectively, while at 12°C it may survive for 72 hours, 24 hours and 12 hours at the same three salinities, respectively (Soleng & Bakke, 1997).

*Gyrodactylus salaris* is sensitive to changes in the chemical composition of the water. It is sensitive to the most commonly used chemicals for bath treatment of farmed salmon parr and eggs (e.g. high salinity salt water, formaldehyde and compounds containing chlorine and iodine). Furthermore, *G. salaris* is sensitive to acidic solutions (pH 5.0–6.0) of aluminium sulphate ( $[Al_2(SO_4)_3]$ ) and zinc (Zn) (Poleo *et al.*, 2004; Soleng *et al.*, 1999). As aluminium sulphate is less toxic to fish than to *G. salaris* in moderately acidified waters, and this chemical has been used to eradicate the parasite from one river system in Norway (Petterson *et al.*, 2007). *Gyrodactylus salaris* is sensitive to low doses of chlorine (Hagen *et al.* 2014).

### 2.3.6. Geographical distribution

The original distribution of *Gyrodactylus salaris* is considered to be within the eastern parts of the Baltic area including the drainages of the Russian lakes Onega and Ladoga (Ergens, 1983; Malmberg & Malmberg, 1993). From these areas, the parasite has spread and it has been reported from several countries in Europe (Paladini *et al.*, 2021-in press) in both wild and farmed populations. *Gyrodactylus salaris* is restricted in its distribution

to Europe. It has been recovered from farmed Atlantic salmon or farmed rainbow trout in several (mainly northern) European countries. In the wild, The parasite has been found on

wild salmonids, mainly Atlantic salmon parr, in rivers in Finland, Norway, Russia and Sweden, ~~Finland and Norway~~. In some areas, the parasite continues to spread, and in 2015 it was detected on salmon parr in a new area in the north of Russia. In 2006, Infection with *G. salaris* was reported from fish farms in Italy (Paladini *et al.*, 2009) and, in 2007, from fish farms in Poland (Rokicka *et al.*, 2007) and Macedonia (Zietara *et al.*, 2007). In 2009, *G. salaris* was identified from fish farms in Romania (Hansen *et al.*, 2014). The parasite has never been detected in the United Kingdom or in the Republic of Ireland.

For recent information on distribution at the country level consult the WAHIS interface ([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en)).

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

Vaccines are not available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Not applicable.

### 2.4.3. Immunostimulation

Immunostimulation is not available.

### 2.4.4. Breeding resistant strains

In laboratory experiments, selected breeding of Atlantic salmon has resulted in increased survival among the offspring (Salte *et al.*, 2010). However, stocking rivers with resistant strains has not been attempted because the stock will remain infected and thus the parasite may spread to other rivers with susceptible hosts. In addition, stocking with resistant strains of Atlantic salmon (e.g. Baltic Neva strain) in affected rivers is not considered compatible with existing strain management of Atlantic salmon (i.e. preservation of the genetic integrity of wild stocks) (Karlsson *et al.*, 2019).

### 2.4.5. Inactivation methods

~~Not applicable. *Gyrodactylus salaris* is killed by exposure to water at 40°C for 5 minutes (Koski *et al.*, 2016) and by a commonly used oxidising to disinfectant (e.g. 1% Virkon S for 15 minutes) (Koski *et al.*, 2016), which may be used to eliminate transfer of the parasite with and can be used to disinfect equipment.~~

### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Eggs that are transferred from infected farms should be disinfected (iodine-containing compounds have been used).

### 2.4.7. General husbandry

*Gyrodactylus salaris* is sensitive to changes in the chemical composition of the water. It is killed by sensitive to the most commonly used chemicals for bath treatment of farmed salmon parr and eggs (e.g. high salinity salt water, formaldehyde and compounds containing chlorine or iodine) (Thrush *et al.*, 2019). Treatment of farmed salmonid populations with formaldehyde or other bath treatments will reduce the prevalence and abundance of *G. salaris* and may therefore render detection more difficult.

*Gyrodactylus salaris* is sensitive to acidic solutions (pH 5.0–6.0) of aluminium sulphate ( $[Al_2(SO_4)_3]$ ) and zinc (Zn) (Poleo *et al.*, 2004; Soleng *et al.*, 1999). Aluminium sulphate is less toxic to fish than to *G. salaris* in moderately acidified waters, and has been used to eradicate the parasite from one river system in Norway (Pettersen *et al.*, 2007). Recently, it was also found that *G. salaris* is sensitive to low doses of chlorine (Hagen *et al.*, 2014).

~~The spread of *G. salaris* between freshwater fish farms and between rivers may be avoided by disinfection of equipment (e.g. fish nets) before translocation (see section 2.4.5).~~

~~Restocking with resistant strains of Atlantic salmon (e.g. Baltic Neva strain) in affected rivers is not considered compatible with existing strain management of Atlantic salmon (i.e. preservation of the genetic integrity of wild stocks) (Karlsson *et al.*, 2019).~~

### 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

Sampling wild healthy populations should take place during the late summer or autumn or when the prevalence is known to be at its highest. Atlantic salmon should be targeted. In farms, fish showing clinical signs of infection (as described in Section 2.3.1) should be selected. Sampling should be avoided for a period after treatment for ectoparasites. In the absence of clinical signs, sampling in of wild Atlantic salmon populations should target year class 1+ and 2+ as these are more likely of being infected than 0+ parr. Grayling should not be sampled as they are not highly susceptible to *G. salaris*, and the possible detection of *G. thymalli* will create unnecessary diagnostic investigations.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

Detection of *Gyrodactylus* and identification of *G. salaris* is a two-step process. Firstly, gyrodactylid parasite specimens are detected (e.g. on fish or fins) using optical equipment and picked out of, and Individual parasites are identified to species level using other equipment and methods.

Fish should be examined as whole specimens either live under anaesthesia (for example, with MS222), freshly killed, or preserved. In addition, fresh or preserved fins can be examined. Examination of live, anaesthetised fish is very time-consuming and not recommended. When Atlantic strains of Atlantic salmon parr are infected, almost all fish have at least one *G. salaris* on one of the fins. On some fish, *G. salaris* specimens may occur on the body or head, including the nostrils, the gills and the mouth cavity. The distribution of *G. salaris* on fins and other parts of the fish varies among fish species and strains of Atlantic salmon. For all hosts the examination of whole fish is recommended as it will increase the likelihood of detecting low intensity infections.

Live anaesthetised fish, freshly cut fins or EtOH preserved fish or fins should be examined under a binocular dissecting microscope with good illumination. The fish should be placed in a box and completely covered in freshwater. Preserved fish can also be examined in EtOH. Living parasites are more easily detected by their movements, thus disturbing light refraction on the skin of the fish should be avoided. Live *Gyrodactylus* are colourless while EtOH preserved *Gyrodactylus* specimens are usually slightly opaque. Dark field illumination microscopy will increase the contrast and the parasites will be detected more easily. The whole surface of the fish, including gills and mouth cavity, must be examined. It is best to use two forceps for this process. The fins of relatively small fish, usually less than 10 cm, can also be studied using illumination through the bottom of the microscope stage, which makes *Gyrodactylus* specimens easy to observe.

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Dead fish, stored on ice, are not acceptable for *Gyrodactylus* examination, even if the fish are kept separately in plastic bags, etc. The parasites die quickly if not covered in water and rapidly disintegrate.

#### 3.4. Non-lethal sampling

Fish can be examined as live specimens under anaesthesia (for example, with MS222). Recently, a non-lethal method for isolating specimens of gyrodactylid parasites from fish was developed and tested on brown trout (Thrush *et al.*, 2019). The method was shown to have a higher parasite recovery rate compared to whole body examination of killed fish (84.6% and 51.9%, respectively). The method has not yet been used on fish infected with *G. salaris*, but it is likely to be effective.

In addition, environmental DNA (eDNA) methods have been developed for detection of *G. salaris*, and its two main hosts, Atlantic salmon and rainbow trout, in water samples have been developed (Rusch *et al.*, 2018). However, detection limits have not been established for these analyses.

#### 3.5. Preservation of samples for submission

Fish should be killed immediately and should not be allowed to dry out before preservation. Whole fish should be preserved in 80–100% EtOH in bottles large enough to provide excess space and preservative. The concentration of EtOH after preservation should not be below 70%. As a rule of thumb this concentration is obtained if the proportion of fish tissue to EtOH does not exceed 1:9. If the concentration is lower, the mucous and epidermis may disintegrate and *Gyrodactylus* specimens, even if they are preserved, may drop off. Bottles should have an opening wide enough to avoid the possibility of scraping off *Gyrodactylus* specimens when fish are put into the bottle or when taken out for examination. Bottles should be stored in a horizontal position until the tissue is fixed/preserved to prevent the fish curling. When preservation of the fish is complete, the bottles can be stored in a vertical position.

As *G. salaris* is common on fins of Atlantic salmon, fins cut off from the body and stored in EtOH as described above can also be submitted. This is especially suitable for larger fish and under field conditions where, for example, transport is limited.



Formaldehyde-fixed *Gyrodactylus* specimens are difficult to identify morphologically and are also often unsuitable for DNA analysis.

### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

Not applicable.

### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Tissue samples, i.e. isolated parasites, whole fish or fins, for PCR testing should be preserved in 70–90% (v/v) analytical/reagent-grade (absolute) ethanol. The recommended ratio of ethanol to tissue is 9:1 based on studies in terrestrial animal and human health. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended.

Template DNA should be prepared from live/fresh or EtOH-preserved specimens using a suitable DNA preparation protocol. DNA extraction kits may be used according to the manufacturers' instructions.

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

Not applicable.

### 3.5.4. Fixed Samples for electron microscopy

Not applicable.

### 3.5.5. Samples for other tests

*Preservation of samples for environmental DNA (eDNA) analyses*

Several methods for filtering water for eDNA analyses exist and the method has also been developed for use on the detection of *G. salaris* and its hosts, Atlantic salmon *Salmo salar* and *Oncochynchus mykiss* rainbow trout (Rusch *et al.*, 2018). In this method, duplicate water samples of 5 litres (2 x 5 litres) should be are collected and filtered on site on to glass fibre filters (47 mm AP25 Millipore, 2 µm pore size, Millipore, Billerica, USA) using a suitable pump, tubing and filter holder. Filters should be placed in separate zip-lock plastic bags containing silica gel and stored dry and dark until further analysis in the laboratory.

## 3.6. Pooling of samples

Sampled fish can be pooled, although each fish should subsequently be examined and analysed separately. Fins of fish from a farm or a river can be pooled and are should also be examined and analysed separately, but in this instance each fin cannot be related to a certain individual fish host. Similarly, if fish are pooled for parasite removal using non-lethal bath methods (e.g. Thrush *et al.*, 2019), the parasites recovered cannot be related to individual fish.

Material from parasites should not be pooled for molecular diagnostic methods as data on the impact on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity are not currently available.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection for surveillance (in healthy populations), presumptive and confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage. The designations used in the Table indicate:

Key:

- +++ = Recommended method(s) validated for the purpose shown and usually to stage 3 of the OIE Validation Pathway; OIE recommended method(s) will be mentioned in the text;
- ++ = Suitable method(s) but may need further validation;
- + = May be used in some situations, but cost, reliability, lack of validation or other factors severely limits its application;

Shaded boxes = Not appropriate for this purpose.

The selection of a test for a given purpose depends on sensitivity, specificity, repeatability and reproducibility. OIE Reference Laboratories welcome feedback on diagnostic performance for assays, in particular PCR methods, for factors affecting assay sensitivity or specificity, such as tissue components inhibiting amplification, nonspecific or uncertain bands, etc., and any assays that are in the +++ category.

1

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

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Morphological examination		+	+	1		+	+	1				
Histopathology <sup>3</sup>												
Cytopathology <sup>3</sup>												
Cell culture												
Real-time PCR (using parasite sample)		+	+	1		+	+	1				
ddPCR/Real-time PCR (using environmental sample)		+		1								
Conventional PCR		±	±	<u>1</u>		±	±	<u>1</u>		++	++	2
Amplicon sequencing <sup>4</sup>										++	++	2
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA												
Ag-ELISA												

2

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; ddPCR = droplet digital PCR;

3

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

4

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Early and juvenile life stages have been defined in Section 2.2.3.

5

<sup>3</sup>Histopathology and cytopathology can be validated if the results from different operators has been statistically compared. <sup>4</sup>Sequencing of the PCR product.

6

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

#### 4.1. Parasite detection

Live anaesthetised fish, freshly cut fins or EtOH-preserved fish or fins should be examined under a binocular dissecting microscope with good illumination. The fish should be placed in a box and completely covered in freshwater. Preserved fish can also be examined in EtOH. Living parasites are more easily detected by their movements, thus disturbing light refraction on the skin of the fish should be avoided. Live *Gyrodactylus* are colourless while EtOH-preserved *Gyrodactylus* specimens are usually slightly opaque. Dark field illumination microscopy will increase the contrast and the parasites will be detected more easily. The whole surface of the fish, including gills and mouth cavity, must be examined. It is best to use two forceps for this process. The fins of relatively small fish, usually less than 10 cm, can also be studied using illumination through the bottom of the microscope stage, which makes *Gyrodactylus* specimens easy to observe.

A non-lethal method (Thrush *et al.*, 2019) results in the collection of ectoparasites from the treated fish on filter paper. The filter can then be screened for the presence of parasites using a stereomicroscope.

Once individual gyrodactylid parasites have been visualised, they can be removed from the fish, fins or filter paper using a pipette. The species of gyrodactylid can be determined using one of the tests described in this section.

#### 4.2. Morphological examination

Morphological identification of *Gyrodactylus* species is based on the morphology and morphometry of marginal hooks anchors (hamuli) and bars in the episthaptor (the attachment organ). Good preparation of specimens is a prerequisite for species identification. Morphological identification is only recommended for preliminary diagnosis of *G. salaris* and should not be used for confirmation, for which molecular methods are recommended.

Digestion of the soft tissue, leaving the hard parts only, is recommended when high-resolution morphometrics is required for reliable morphometric diagnosis. The soft tissue can be digested in a solution (approx. 1 µl) of 75 mM Tris, 10 mM EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid), 5% SDS (sodium dodecyl sulphate) and 100 mg ml<sup>-1</sup> proteinase K, pH 8.0. After adding the digestion solution, the reaction should be ~~inspected~~ monitored in the microscopically until completion and then ended by adding a stop solution (1:1 glycerol and 10% neutral buffered formalin). The procedure for digestion is described in detail in Harris *et al.*, 1999. Identification of *G. salaris* should be in accordance with references: Cunningham *et al.*, 2001; Malmberg, 1957; 1970; McHugh *et al.*, 2000; Olstad *et al.*, 2007b; Shinn *et al.*, 2004.

The size of the ~~episth~~ episthaptoral hard parts in *Gyrodactylus* varies extensively with, for example, temperature, whereas shape is more stable (see e.g. Mo, 1991a). The capability of linear measurements to capture morphology might therefore not always be sufficient for reliable diagnosis (Olstad *et al.*, 2007b).

*Gyrodactylus salaris* can be differentiated from other *Gyrodactylus* species by trained morphologists on the basis of morphology but not from *G. thymalli* (Olstad *et al.*, 2007b; and see Section 2.1.1). In addition, *G. salaris* is morphologically similar to *Gyrodactylus teuchis* from brown trout, Atlantic salmon, and rainbow trout, but can be differentiated by trained morphologists on the basis of the shape of the marginal hook sickle. *Gyrodactylus teuchis* has a longer and more constantly curved sickle blade (see Cunningham *et al.*, 2001).

#### 4.3. Histopathology and cytopathology

Not applicable.

#### 4.4. Cell ~~or artificial media~~ culture for isolation

Not applicable.

#### 4.5. Nucleic acid amplification

For all molecular tests below DNA can be extracted using standard DNA extraction kits.

#### 4.5.1. Real-time PCR

Both real-time PCR (Collins *et al.*, 2010) and digital droplet (dd) PCR (Rusch *et al.*, 2018) have been developed for *G. salaris*. Real-time PCR has not been widely applied for diagnostics of *G. salaris*, and ddPCR is developed for use in connection with eDNA-methods. Both these methods target the ribosomal internal transcribed spacers region (ITS) and have the same diagnostic limitations (see below and Section 4.5.2) as described in Sections 4.5.1 and 4.5.2. However, real-time PCR is faster than conventional PCR and DNA sequencing (Section 4.4.2) and can be applied as a fast means to exclude species other than *G. salaris*/*G. thymalli*, and the method is therefore mentioned briefly here. Conventional PCR and sequencing of the mitochondrial cytochrome oxidase I (CO1) gene (Sections 4.4.2 and 4.5.2), which is necessary for species confirmation and haplotype identification, can then be performed on those species with a positive result from real-time PCR to which is necessary for species confirmation and haplotype identification, which will allow *G. salaris* to be differentiated from *G. thymalli* (4.6.2).

The real-time PCR assay of Collins *et al.* (2010) is a TaqMan minor groove binder (MGB) real-time PCR assay that targets a 60 bp unique sequence motif in the ITS1 region of *G. salaris*/*G. thymalli*. It applies the forward primer F (5'-CGA-TCG-TCA-CTC-GGA-ATC-G-3'), reverse primer R (5'-GGT-GGC-GCA-CCT-ATT-CTA-CA-3') and TaqMan MGB probe Gsal2 (5'-FAM-TCT-TAT-TAA-CCA-GTT-CTG-C-3') labelled with the fluorescent reporter dye FAM at the 5'-end and a non-fluorescent quencher MGBNFQ at the 3'-end. Amplifications were performed in a total volume of 20 µl containing TaqMan Universal PCR Master mix (with UNG; Applied Biosystems), 0.9 µM of each forward and reverse primer and 0.25 µM of each probe and dH<sub>2</sub>O (Sigma) to a final volume of 20 µl. One µl of lysate from a parasite specimen was added to the each test tube. The cycling conditions were 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes followed by 35 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute and run in an ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The efficiency of the singleplex assay was reported as ranging from 93.1% to 101.1% and the limit of detection (dilution of the crude *Gyrodactylus spp. lysate*) was as 10<sup>-4</sup>. Further details can be found in Collins *et al.* (2010). **Note:** Low level cross-amplification of *Gyrodactylus derjavinoideus* DNA has been observed using the real-time PCR set-up described here (Rusch *et al.*, 2018).

#### 4.5.2. Conventional PCR

*Analysis of the ribosomal RNA gene internal transcribed spacer region (ITS)*

For amplification of a 1300 base pair product of the ITS-region, covering ITS1, 5.8S, and ITS2, primers, such as 5'-TTT-CCG-TAG-GTG-AAC-CT-3' and 5'-TCC-TCC-GCT-TAG-TGA-TA-3', may be used. The cycling conditions for PCR are as follows, initial denaturation at 95°C for 5 minutes; 30 cycles of 94°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; final extension at 72°C for 7 minutes (Cunningham, 1997). If partially degraded material is analysed or if the PCR above does not give a positive result, the ITS1 and ITS2 spacers can be amplified in two separate reactions using primer sets and PCR conditions described in Matejusová *et al.*, 2001. The amplification of ITS2 alone, using the primers 5'-CAT-CGG-TCT-CTC-GAA-CG-3' and 5'-TCC-TCC-GCT-TAG-TGA-TA-3' and using the same protocol as above is sufficient.

The primers for amplification of ITS are not specific to *G. salaris* and will amplify all or most species of *Gyrodactylus*. Positive PCR products should thus be sequenced to identify the haplotype, which can be used for species confirmation (see Section 4.5).

*Analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase I (CO1) gene*

For amplification of the CO1-gene, the primers 5'-ATA-TAG-ACG-ATT-TGT-TTT-CA-3' and 5'-ACA-GAT-TAC-TTG-GTA-TTA-CA-3' (Kuusela *et al.*, 2009) may be used to amplify the full-length gene (1600 base pairs) which is recommended. The primers 5'-TAA-TCG-GCG-GGT-TCG-GTA-A-3' and 5'-GAA-CCA-TGT-ATC-GTG-TAG-CA-3' (Meinilä *et al.*, 2002) may be used to amplify a 800 base pairs fragment if the first PCR is unsuccessful. The cycling conditions for both PCRs are as follows, initial denaturation at 95°C for 5 minutes; 35 cycles of 95°C for 1 minute, 50°C for 1 minute, 72°C for 2 minutes; final extension at 72°C for 7 minutes. Additional primer sets for amplification of CO1 can be found in references: Hansen *et al.*, 2003; Kuusela *et al.*, 2009; Meinilä *et al.*, 2002; 2004.

Primers recommended for amplification of CO1 may not be specific for *G. salaris* and may not amplify all isolates. Positive PCR products should thus be sequenced to identify the haplotype for species confirmation (Section 4.6).

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

#### 4.5.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable.

### 4.6. Amplicon sequencing

#### 4.6.1. ITS sequencing and sequence analysis

Amplified ITS fragments prepared as in Section 4.4.2 should be sequenced using the PCR primers and, in addition, internal sequencing primers (Cunningham, 1997; Matejusová *et al.*, 2001) should be used to obtain overlapping reads of each nucleotide. The resulting ITS sequences should be subjected to a BLAST search in GenBank/EMBL to establish identity with known sequences. Several sequences of other species infecting salmonids, e.g. *G. derjavini*, *G. derjavinoides*, *G. truttae*, and *G. teuchis* are available in GenBank/EMBL. *G. thymalli* cannot be distinguished from *G. salaris* by this method, but sequences of ITS distinguishes *G. salaris* from all other known species. GenBank has synonymised *G. salaris* and *G. thymalli* and Host identity of sequences in GenBank/EMBL should thus always be checked, however, GenBank has synonymised *G. salaris* and *G. thymalli*. Therefore, if the BLAST search of the ITS sequences identifies the parasite as *G. salaris*, CO1 sequencing and sequence analysis should be performed are recommended to identify the haplotype in question (Section 4.6.2).

#### 4.6.2. CO1 sequencing and sequence analysis

Amplified CO1 fragments prepared as described in Section 4.5.2 should be sequenced using the PCR primers and, in addition, internal sequencing primers (Kuusela *et al.*, 2009; Meinilä *et al.*, 2002) should be used to obtain overlapping reads of each nucleotide. The resulting CO1 sequences should be subjected to a BLAST search in GenBank/EMBL to identify the haplotype.

If the obtained sequence does not have a 100% match in GenBank/EMBL, a phylogenetic analysis can be performed to establish the relationship to other available sequences. Different haplotypes and clades of *G. salaris* and *G. thymalli* can be distinguished with this method. CO1 sequences can be used to assign specimens to a haplotype or clade and thus infer the identity as *G. salaris* or *G. thymalli*. Clades (haplogroups i.e. groups of haplotypes with a common ancestor) of *G. salaris* generally correspond well to host preferences and/or the geographical distribution of the parasites, with a few exceptions, and some strains, as defined by CO1-sequences (haplotypes), are known to be pathogenic to Atlantic salmon. Host identity can be used to infer potential pathogenicity of a certain strain and thus host identity of sequence hits in GenBank/EMBL should always be checked when BLAST results are returned.

GenBank has synonymised *G. salaris* and *G. thymalli*, with the result that all accessions previously listed as *G. thymalli* are now *G. salaris*; the haplotypes in Table 4.6.2 can be retrieved from GenBank. Table 4.6.2 assigns the haplotypes to either *G. salaris* or *G. thymalli*, to support identification of *G. salaris* based on CO1 sequencing (new haplotypes should be compared to the nearest known relative). In rivers where both grayling and Atlantic salmon are found, establishing the *G. thymalli* haplotypes present on grayling will support any subsequent monitoring for *G. salaris* on Atlantic salmon.

**Table 4.6.2** *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* GenBank accession numbers for CO1 nucleotide sequences

<i>G. salaris</i> *							<i>G. thymalli</i> *		
<a href="#">AF479750</a>	<a href="#">AY146602</a>	<a href="#">AY258354</a>	<a href="#">AY486492</a>	<a href="#">AY486517</a>	<a href="#">AY486542</a>	<a href="#">EU186166</a>	<a href="#">AF540893</a>	<a href="#">AY486545</a>	<a href="#">DQ159928</a>
<a href="#">AF540891</a>	<a href="#">AY146603</a>	<a href="#">AY258355</a>	<a href="#">AY486493</a>	<a href="#">AY486518</a>	<a href="#">AY486543</a>	<a href="#">EU186167</a>	<a href="#">AF540894</a>	<a href="#">AY486546</a>	<a href="#">DQ180333</a>
<a href="#">AF540892</a>	<a href="#">AY146604</a>	<a href="#">AY258356</a>	<a href="#">AY486494</a>	<a href="#">AY486519</a>	<a href="#">AY840222</a>	<a href="#">EU186168</a>	<a href="#">AF540895</a>	<a href="#">AY486547</a>	<a href="#">DQ993195</a>
<a href="#">AF540904</a>	<a href="#">AY146605</a>	<a href="#">AY258357</a>	<a href="#">AY486495</a>	<a href="#">AY486520</a>	<a href="#">AY840223</a>	<a href="#">EU186169</a>	<a href="#">AF540896</a>	<a href="#">AY486548</a>	<a href="#">EF495063</a>
<a href="#">AF540905</a>	<a href="#">AY146606</a>	<a href="#">AY258358</a>	<a href="#">AY486496</a>	<a href="#">AY486521</a>	<a href="#">DQ468128</a>	<a href="#">EU186170</a>	<a href="#">AF540897</a>	<a href="#">AY486549</a>	<a href="#">EF527269</a>
<a href="#">AF540906</a>	<a href="#">AY146607</a>	<a href="#">AY258359</a>	<a href="#">AY486497</a>	<a href="#">AY486522</a>	<a href="#">DQ517533</a>	<a href="#">EU186171</a>	<a href="#">AF540898</a>	<a href="#">AY486550</a>	<a href="#">EF612464</a>
<a href="#">AF542161</a>	<a href="#">AY146614</a>	<a href="#">AY258360</a>	<a href="#">AY486498</a>	<a href="#">AY486523</a>	<a href="#">DQ778628</a>	<a href="#">EU186172</a>	<a href="#">AF540899</a>	<a href="#">AY486551</a>	<a href="#">MG273445</a>
<a href="#">AF542162</a>	<a href="#">AY258336</a>	<a href="#">AY258361</a>	<a href="#">AY486499</a>	<a href="#">AY486524</a>	<a href="#">DQ923578</a>	<a href="#">EU186173</a>	<a href="#">AF540900</a>	<a href="#">AY486552</a>	<a href="#">MG273446</a>
<a href="#">AF542163</a>	<a href="#">AY258337</a>	<a href="#">AY258362</a>	<a href="#">AY486500</a>	<a href="#">AY486525</a>	<a href="#">DQ988931</a>	<a href="#">EU186174</a>	<a href="#">AF540901</a>	<a href="#">AY486553</a>	<a href="#">MG273447</a>
<a href="#">AF542164</a>	<a href="#">AY258338</a>	<a href="#">AY258363</a>	<a href="#">AY486501</a>	<a href="#">AY486526</a>	<a href="#">DQ993189</a>	<a href="#">EU186175</a>	<a href="#">AF540902</a>	<a href="#">AY840224</a>	<a href="#">MG273448</a>
<a href="#">AF542165</a>	<a href="#">AY258339</a>	<a href="#">AY258364</a>	<a href="#">AY486502</a>	<a href="#">AY486527</a>	<a href="#">DQ993190</a>	<a href="#">EU186176</a>	<a href="#">AF540903</a>	<a href="#">DQ159913</a>	=
<a href="#">AF542166</a>	<a href="#">AY258340</a>	<a href="#">AY258365</a>	<a href="#">AY486503</a>	<a href="#">AY486528</a>	<a href="#">DQ993191</a>	<a href="#">EU186177</a>	<a href="#">AF542167</a>	<a href="#">DQ159914</a>	=
<a href="#">AY146589</a>	<a href="#">AY258341</a>	<a href="#">AY258366</a>	<a href="#">AY486504</a>	<a href="#">AY486529</a>	<a href="#">DQ993192</a>	<a href="#">EU223246</a>	<a href="#">AF542168</a>	<a href="#">DQ159915</a>	=
<a href="#">AY146590</a>	<a href="#">AY258342</a>	<a href="#">AY258367</a>	<a href="#">AY486505</a>	<a href="#">AY486530</a>	<a href="#">DQ993193</a>	<a href="#">EU304825</a>	<a href="#">AF542169</a>	<a href="#">DQ159916</a>	=
<a href="#">AY146591</a>	<a href="#">AY258343</a>	<a href="#">AY258368</a>	<a href="#">AY486506</a>	<a href="#">AY486531</a>	<a href="#">DQ993194</a>	<a href="#">GQ129460</a>	<a href="#">AF542170</a>	<a href="#">DQ159917</a>	=

<i>G. salaris</i> *							<i>G. thymalli</i> *		
<a href="#">AY146592</a>	<a href="#">AY258344</a>	<a href="#">AY258369</a>	<a href="#">AY486507</a>	<a href="#">AY486532</a>	<a href="#">EF117889</a>	<a href="#">GQ129461</a>	<a href="#">AF542171</a>	<a href="#">DQ159918</a>	=
<a href="#">AY146593</a>	<a href="#">AY258345</a>	<a href="#">AY258370</a>	<a href="#">AY486508</a>	<a href="#">AY486533</a>	<a href="#">EF524576</a>	<a href="#">GQ129462</a>	<a href="#">AY146608</a>	<a href="#">DQ159919</a>	=
<a href="#">AY146594</a>	<a href="#">AY258346</a>	<a href="#">AY258371</a>	<a href="#">AY486509</a>	<a href="#">AY486534</a>	<a href="#">EF524577</a>	<a href="#">GQ129463</a>	<a href="#">AY146609</a>	<a href="#">DQ159920</a>	=
<a href="#">AY146595</a>	<a href="#">AY258347</a>	<a href="#">AY258372</a>	<a href="#">AY486510</a>	<a href="#">AY486535</a>	<a href="#">EF524578</a>	<a href="#">GQ370816</a>	<a href="#">AY146610</a>	<a href="#">DQ159921</a>	=
<a href="#">AY146596</a>	<a href="#">AY258348</a>	<a href="#">AY258373</a>	<a href="#">AY486511</a>	<a href="#">AY486536</a>	<a href="#">EF570120</a>	<a href="#">GU187354</a>	<a href="#">AY146611</a>	<a href="#">DQ159922</a>	=
<a href="#">AY146597</a>	<a href="#">AY258349</a>	<a href="#">AY258374</a>	<a href="#">AY486512</a>	<a href="#">AY486537</a>	<a href="#">EU186161</a>	<a href="#">KJ941020</a>	<a href="#">AY146612</a>	<a href="#">DQ159923</a>	=
<a href="#">AY146598</a>	<a href="#">AY258350</a>	<a href="#">AY486488</a>	<a href="#">AY486513</a>	<a href="#">AY486538</a>	<a href="#">EU186162</a>	<a href="#">KT344124</a>	<a href="#">AY146613</a>	<a href="#">DQ159924</a>	=
<a href="#">AY146599</a>	<a href="#">AY258351</a>	<a href="#">AY486489</a>	<a href="#">AY486514</a>	<a href="#">AY486539</a>	<a href="#">EU186163</a>	<a href="#">KT344125</a>	<a href="#">AY472084</a>	<a href="#">DQ159925</a>	=
<a href="#">AY146600</a>	<a href="#">AY258352</a>	<a href="#">AY486490</a>	<a href="#">AY486515</a>	<a href="#">AY486540</a>	<a href="#">EU186164</a>	<a href="#">KT344126</a>	<a href="#">AY472085</a>	<a href="#">DQ159926</a>	=
<a href="#">AY146601</a>	<a href="#">AY258353</a>	<a href="#">AY486491</a>	<a href="#">AY486516</a>	<a href="#">AY486541</a>	<a href="#">EU186165</a>	<a href="#">KT344127</a>	<a href="#">AY486544</a>	<a href="#">DQ159927</a>	=
						<a href="#">KT344128</a>			=

\*Note: *G. salaris* and *G. thymalli* have been synonymised by NCBI GenBank, i.e. all accessions previously listed as *G. thymalli* are now *G. salaris*.

Where the sequence is not assigned to one of the recognised haplotypes (CO1 sequences) of *G. salaris* or *G. thymalli* advice should be sought from the OIE Reference Laboratory. The OIE Reference Laboratory will keep an updated database of CO1-sequences and will assist in the diagnosis. It is recommended that the OIE Reference Laboratory is informed of any significant detections of *G. salaris* and *G. thymalli* in order to confirm the cases.

#### 4.7. *In-situ* hybridisation

Not applicable.

#### 4.8. Immunohistochemistry

Not applicable.

#### 4.9. Bioassay

Not applicable.

#### 4.10. Antibody- or antigen-based detection methods (ELISA, etc.)

Not applicable.

#### 4.11. Other methods

Not applicable.

## 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 disease in apparently healthy populations. Sequencing of the amplified CO1 amplicon is required for confirmation of infection in any parasite that identified as positive by PCR.

## 6. Corroborative diagnostic criteria

All suspect positive samples of *G. salaris* from country or zone or compartment considered free from infection with *G. salaris* should be referred immediately to the OIE Reference Laboratory ~~for confirmation, to definitively identify the parasite based on the most up-to-date information (see Section 4.6). Submissions should be made~~ whether or not clinical signs ~~are associated with the case have been observed~~.

This section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the absence (Section 6.1) or 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.

### 6.1. Detection in apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>9</sup>

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 will be sampled in surveys to demonstrate disease freedom.

#### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

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

- i) Identification of *G. salaris* by morphological examination;
- ii) A positive result by real-time PCR;
- iii) A positive result by ddPCR or real-time-PCR ~~from using~~ an environmental sample.

#### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with *G. salaris* is considered to be confirmed if, ~~in addition to the criteria in Section 6.1.1,~~ the following criterion is met:

- i) A positive result ~~from by conventional PCR testing of parasite samples and sequencing of one or both of the ITS fragments and the CO1 fragment. The ITS sequences obtained are then analysed according to Section 4.6.1 and the CO1+ sequences according to Table 4.6.2 (see Section 4.6.2) amplified CO1+ fragments obtained by conventional PCR.~~

## 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 *G. salaris* 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;

---

<sup>9</sup> For example, transboundary commodities.

- ii) Identification of *G. salaris* by morphological examination;
- iii) A positive result by conventional PCR;
- iv) A positive result by real-time PCR.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with *G. salaris* is considered to be confirmed if, ~~in addition to the criteria in section 6.2.1,~~ the following criterion is met:

- i) ~~A positive result from sequencing amplified CO1 fragments obtained by conventional PCR~~
- ii) A positive result by conventional PCR testing of parasite samples and sequencing of one or both of the amplified ITS fragments and the CO1 fragment. The ITS sequences obtained are then analysed according to Section 4.6.1 and the CO1 sequences according to Table 4.6.2 (see Section 4.6.2).

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests: under study

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with *G. salaris* is provided in Table 6.3. (note: no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with *G. salaris*, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

**Table 6.3.1.** Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis

Test type	Test purpose	Source population	Tissue/sample type	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Real-time PCR	Surveillance	–	Parasites	–	Not yet available	Not yet available	–	–
Amplicon sequencing	Diagnosis	–	Parasites	–	Not yet available	Not yet available	–	–
<u>Morphological examination</u>	<u>Diagnosis</u>	<u>–</u>	<u>Parasites</u>	<u>–</u>	<u>Not yet available</u>	<u>Not yet available</u>	<u>–</u>	<u>–</u>

DSe = diagnostic sensitivity; DSp = diagnostic specificity; n = number of samples used in the study.

## 7. References

- ANTTILA P., ROMAKKANIEMI A., KUUSELA J. & KOSKI P. (2008). Epidemiology of *G. salaris* (Monogenea) in the River Tornionjoki, a Baltic wild salmon river. *J. Fish Dis.*, **31**, 373–382.
- APPLEBY C. & MO T.A. (1997). Population Dynamics of *G. salaris* (Monogenea) Infecting Atlantic salmon, *Salmo salar*, parr in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Parasitol.*, **83**, 23–30
- BAKKE T.A., CABLE J. & HARRIS P.D. (2007) The biology of gyrodactylid monogeneans: The “Russian-Doll Killers”. *Adv. Parasitol.*, **64**, 161–460.
- BUCHMANN K. & BRESCIANI J. (1997). Parasitic infections in pond-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Denmark. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 125–138.
- COLLINS C.M., KERR R., MCINTOSH R. & SNOW M. (2010). Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 135–142.
- CUNNINGHAM C.O. (1997). Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *J. Parasitol.*, **83**, 215–219.



CUNNINGHAM C.O., MO T.A., COLLINS C.M., BUCHMANN K., THIERY R., BLANC G. & LAUTRAITE A. (2001). Redescription of *Gyrodactylus teuchis* Lutraite, Blanc, Thiery, Daniel & Vigneulle, 1999 (Monogenea: Gyrodactylidae), a species identified by ribosomal RNA sequence. *Syst. Parasitol.*, **48**, 141–150.

ERGENS R. (1983). *Gyrodactylus* from Eurasian freshwater Salmonidae and Thymallidae. *Folia Parasitol.*, **30**, 15–26.

HAGEN A.G., HYTTERØD S. & OLSTAD K. (2014). Low concentrations of sodium hypochlorite affect population dynamics in *Gyrodactylus salaris* (Malmberg, 1957): practical guidelines for the treatment of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. parasite. *J. Fish Dis.*, **37**, 1003–1011. <https://doi.org/10.1111/jfd.12218>

HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2003). Mitochondrial DNA variation of *Gyrodactylus* spp. (Monogenea, Gyrodactylidae) populations infecting Atlantic salmon, grayling, and rainbow trout in Norway and Sweden. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1471–1478.

HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007a). DNA taxonomy and barcoding of monogenean parasites: lessons from *Gyrodactylus*. *Trends Parasitol.*, **23**, 363–367.

HANSEN H., BAKKE T.A. & BACHMANN L. (2007b). Mitochondrial haplotype diversity of *Gyrodactylus thymalli* (Platyhelminthes; Monogenea): extended geographic sampling in United Kingdom, Poland, and Norway reveals further lineages. *Parasitol. Res.*, **100**, 1389–1394.

HARRIS P.D., CABLE J., TINSLEY R.C. & LAZARUS C.M. (1999). Combined ribosomal DNA and morphological analysis of individual gyrodactylid monogeneans. *J. Parasitol.*, **85**, 188–191.

JANSEN P.A. & BAKKE T.A. (1991). Temperature-dependent reproduction and survival of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes: Monogenea) on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Parasitology*, **102**, 105–112.

JENSEN A.J. & JOHNSEN B.O. (1992). Site specificity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea) on Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in the River Lakselva, northern Norway. *Can. J. Zool.*, **41**, 264–267.

JOHNSEN B.O., MØKKELGJERD P. & JENSEN A.J. (1999). The parasite *Gyrodactylus salaris* on salmon parr in Norwegian rivers, status report at the beginning of year 2000. In: NINA Oppdragsmelding, p. 1–129 (In Norwegian with English summary).

JØRGENSEN T.R., LARSEN T.B., JØRGENSEN L.G., BRESCIANI J., KANIA P. & BUCHMANN K. (2007). Characterisation of a low pathogenic strain of *Gyrodactylus salaris* from rainbow trout. *Dis. Aquat. Org.*, **73**, 235–244.

KARLSSON S., BOLSTAD G.H., HANSEN H., JANSEN P.A., MOEN T. & NOBLE LR. (2019). The potential for evolution of resistance to *Gyrodactylus salaris* in Norwegian Atlantic salmon. Norwegian Institute for Nature Research (NINA) Report 1812. Norwegian Institute for Nature Research. ISSN: 1504-3312 ISBN: 978-82-426-4570-8.

KOSKI P., ANTTILA P. & KUUSELA J. (2016). Killing of *Gyrodactylus salaris* by heat and chemical disinfection. *Acta Vet. Scand.*, **58**, 21.

KUUSELA J., ZIETARA M.S. & LUMME J. (2009). Description of three new European cryptic species of *Gyrodactylus* Nordmann, 1832 supported by nuclear and mitochondrial phylogenetic characterization. *Acta Parasitol.*, **53**, 120–126.

LINDENSTRØM T., COLLINS C.M., BRESCIANI J., CUNNINGHAM C.O. & BUCHMANN K. (2003). Characterization of a *Gyrodactylus salaris* variant: infection biology, morphology and molecular genetics. *Parasitology*, **127**, 165–177.

MALMBERG G. (1957). Om förekomsten av *Gyrodactylus* på svenska fiskar. *Skr. söd. Sver. Fisk För.*, (Årsskr.) 1956, 19–76. (In Swedish, species descriptions and summary in English).

MALMBERG G. (1970). The excretory systems and the marginal hooks as a basis for the systematics of *Gyrodactylus* (Trematoda, Monogenea). *Ark. Zool.* [Ser. 2], **23**, 1–235.

MALMBERG G. (1973). *Gyrodactylus* infestations on species of *Salmo* in Danish and Swedish hatcheries. *Norwegian J. Zool.*, **21**, 325–326.

- MALMBERG G. (1988). *Gyrodactylus salaris*-infektioner, laxfisk-transporter och odling i Norden. *Vattenbruk*, **2**, 22–29
- MALMBERG G. & MALMBERG M. (1993). Species of *Gyrodactylus* (Platyhelminthes, Monogenea) on salmonids in Sweden. *Fish. Res.*, **17**, 59–68.
- MATEJUSOVÁ I., GELNAR M., McBEATH A.J.A., COLLINS C.M. & CUNNINGHAM C.O. (2001). Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *Int. J. Parasitol.*, **31**, 738–745.
- McHUGH E.S., SHINN A.P. & KAY J.W. (2000). Discrimination of the notifiable pathogen *Gyrodactylus salaris* from *G. thymalli* (Monogenea) using statistical classifiers applied to morphometric data. *Parasitology*, **121**, 315–323.
- Meinilä M., KUUSELA J., ZIĘTARA M. & LUMME J. (2002) Primers for amplifying approximately 820 bp of highly polymorphic mitochondrial COI gene of *Gyrodactylus salaris*. *Hereditas*, **137**, 72–74.
- Meinilä M., KUUSELA J., ZIĘTARA M.S. & LUMME J. (2004). Initial steps of speciation by geographic isolation and host switch in salmonid pathogen *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Int. J. Parasitol.*, **34**, 515–526.
- MIESZKOWSKA A., GORNIAK M., JURCZAK-KUREK A. & ZIĘTARA M.S. (2018). Revision of *Gyrodactylus salaris* phylogeny inspired by new evidence for Eemian crossing between lineages living on grayling in Baltic and White sea basins. *PeerJ.*, 6:e5167. doi:10.7717/peerj.5167
- Mo T.A. (1991). Variations of opisthaptor hard parts of *Gyrodactylus salaris* Malmberg 1957 Monogenea Gyrodactylidae on parr of Atlantic salmon *Salmo salar* L. in laboratory experiments. *Syst. Parasitol.*, **20**, 11–19.
- Mo T.A. (1992). Seasonal variations in the prevalence and infestation intensity of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea: Gyrodactylidae) on Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., in the River Batnfjordselva, Norway. *J. Fish Biol.*, **41**, 697–707.
- OLSTAD K., CABLE J., ROBERTSEN G. & BAKKE T. A. (2006). Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. *Parasitology*, **133**, 33–41.
- OLSTAD K., ROBERTSEN G., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007a). Variation in host preference within *Gyrodactylus salaris* (Monogenea): an experimental approach. *Parasitology*, **134**, 589–597.
- OLSTAD K., SHINN A.P., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2007b). Host-based identification is not supported by morphometrics in natural populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Platyhelminthes, Monogenea). *Parasitology*, **134**, 2041–2052.
- PALADINI G., GUSTINELLI A., FIORAVANTI M.L., HANSEN H. & SHINN A.P. (2009). The first report of *Gyrodactylus salaris* Malmberg 1957 (Platyhelminthes, Monogenea) on Italian cultured stocks of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Vet. Parasitol.*, **165**, 290–297.
- PALADINI G., HANSEN H., WILLIAMS C.F., TAYLOR N.G.H., RUBIO-MEJÍA O.L., DENHOLM S., HYTTERØD S., BRON J.E. & SHINN A.P. (2014). Reservoir hosts for *Gyrodactylus salaris* may play a more significant role in epidemics than previously thought. *Parasit. Vectors*, **7**, 576.
- PALADINI G., SHINN A.P., TAYLOR N.G.H., BRON J.E. & HANSEN H. (2020-2021). Geographical distribution of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Monogenea, Gyrodactylidae) throughout Europe. *Parasite Vector*, **14**, 34 (accepted).
- PETTERSEN R.T., HYTTERØD S., MO T.A., HAGEN A.G., FLODMARK L.E.W., HØGBERGET R., OLSEN N., KJØSNES A.J., ØXNEVAD S., HÅVARDSTUN J., KRISTENSEN T., SANDODDEN R., MOEN A. & LYDERSEN E. (2007). Kjemisk behandling mot *G. salaris* i Lærdalselva 2005/2006 – Sluttrapport. NIVA-rapport 5349-2007. 27 pp. (in Norwegian).
- POLEO A.B.S., SCHJOLDEN J., HANSEN H., BAKKE T.A., MO T.A., ROSSELAND B.O. & LYDERSEN E. (2004). The effect of various metals on *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Parasitology*, **128**, 169–177.
- ROBERTSEN G., HANSEN H., BACHMANN L. & BAKKE T. A. (2007). Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is a suitable host for *Gyrodactylus salaris* (Monogenea, Gyrodactylidae) in Norway. *Parasitology*, **134**, 257–267.

~~ROKICKA M., LUMME J. & ZIETARA M. (2007). Identification of *Gyrodactylus* ectoparasites in Polish salmonid farms by PCR-RFLP of the nuclear ITS segment of ribosomal DNA (Monogenea, Gyrodactylidae). *Acta Parasitologica*, **52**, 185–195.~~

RUSCH J.C., HANSEN H., STRAND D.A., MARKUSSEN T., HYTTERØD S. & VRÅLSTAD T. (2018). Catching the fish with the worm: a case study on eDNA detection of the monogenean parasite *G. salaris* and two of its hosts, Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Parasit. Vectors*, **11**, 333. doi:10.1186/s13071-018-2916-3

SALTE R., BENTSEN H.B., MOEN T., TRIPATHY S., BAKKE T.A., ØDEGÅRD J., OMHOLT S. HANSEN L.P. (2010). Prospects for a genetic management strategy to control *Gyrodactylus salaris* infection in wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **67**, 121–129.

SHINN A.P., HANSEN H., OLSTAD K., BACHMANN L. & BAKKE T.A. (2004). The use of morphometric characters to discriminate specimens of laboratory-reared and wild populations of *Gyrodactylus salaris* and *G. thymalli* (Monogenea). *Folia Parasitol.*, **51**, 239–252.

SOLENG A. & BAKKE T.A. (1997). Salinity tolerance of *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea): laboratory studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **55**, 1837–1845.

SOLENG A., POLEO A.B.S., ALSTAD N.E.W. & BAKKE T. A. (1999). Aqueous aluminium eliminates *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea) infections in Atlantic salmon. *Parasitology*, **119**, 19–25.

STERUD E., MO T.A., COLLINS C. M. & CUNNINGHAM C.O. (2002). The use of host specificity, pathogenicity, and molecular markers to differentiate between *G. salaris* Malmberg, 1957 and *G. thymalli* Žitňan, 1960 (Monogenea: Gyrodactylidae). *Parasitology*, **124**, 203–213.

THRUSH M.A., HILL T. & TAYLOR N.G.H. (2019). Development of a non-lethal hydrogen peroxide treatment for surveillance of *Gyrodactylus salaris* on trout farms and its application to testing wild salmon populations. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi:10.1111/tbed.13263.

~~ZIETARA M.S., ROKICKA, M., STOJANOVSKI S., SKORKOWSKI E.F. & LUMME J. (2007). Alien mitochondrial DNA in variant clones of *Gyrodactylus salaris* indicates a complex hybrid history in salmonid farms. 7th International Symposium on Fish Parasites, Viterbo, Italy. *Parassitologia*, **49**, 119.~~

\*  
\*\*

**NB:** There is an OIE Reference Laboratory for infection with *G. salaris*  
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:  
<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).  
Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with *G. salaris*.

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPTER 2.3.6.

## INFECTION WITH SALMONID ALPHAVIRUS

## 1. Scope

Infection with salmonid alphavirus (SAV) means infection with any genotype of the pathogenic agent SAV, Genus *Alphavirus* and Family *Togaviridae*.

## 2. Disease information

## 2.1. Agent factors

## 2.1.1. Aetiological agent

SAV is an enveloped, spherical, single-stranded, positive-sense RNA virus, approximately 60–70 nm in diameter, with a genome of ~12 kb. The genome codes for eight proteins: four capsid glycoproteins (E1, E2, E3 and 6K) and four nonstructural proteins (nsP1–4). Glycoprotein E2 is considered to be the site of most neutralising epitopes, while E1 contains more conserved, cross-reactive epitopes (McLoughlin & Graham, 2007). SAV is considered to belong to the Genus *Alphavirus* of the Family *Togaviridae*. ~~This is based on nucleotide sequence studies of SAV isolates, and is also supported by biological properties of the virus, including cross-infection and neutralisation trials. In addition, four conserved nucleotide sequence elements (CSEs) and a conserved motif (GDD), characteristic of alphaviruses, are present in the SAV genome (McLoughlin & Graham, 2007).~~

SAV has been divided into six genotypes (SAV 1–SAV 6) based solely on nucleic acid sequences for the proteins E2 and nsP3 (Fringuelli *et al.*, 2008). The level of antigenic variation among genotypes is considered low as monoclonal antibodies (MAbs) raised against a specific SAV genotype are likely to cross react with other SAV isolates (Graham *et al.*, 2014; Jewhurst *et al.*, 2004). ~~The genotype groups by susceptible species and environment are presented in Table 2.1.~~

Infection with SAV causes pancreas disease (PD) or sleeping disease (SD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), common dab (*Limanda limanda*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (McLoughlin & Graham, 2007) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) (Lewisch *et al.*, 2018). ~~The disease is systemic, characterised microscopically by necrosis and loss of exocrine pancreatic tissue, and heart and skeletal muscle necrosis and atrophy. The genotypes SAV 1 and SAV 2 cause disease in fish both in freshwater and seawater, while the four genotypes SAV 3 – SAV 6 have only been reported from disease outbreaks in seawater.~~

**Table 2.1.** SAV genotypes by susceptible host species and environment

SAV genotype	Fresh water	Sea water
SAV 1	Rainbow trout	Atlantic salmon
SAV 2	Rainbow trout; Atlantic salmon; Arctic charr	Atlantic salmon
SAV 3		Rainbow trout; Atlantic salmon
SAV 4		Atlantic salmon
SAV 5		Atlantic salmon; Common dab
SAV 6		Atlantic salmon

### 2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

There are no published scientific data specifically on the survival and stability of SAV in processed or stored samples. The OIE Reference Laboratory has found that SAV in serum/plasma samples and virus isolated from cell culture can be stored for many years at  $-80^{\circ}\text{C}$  without significant decline in virus titre. This observation is consistent with research on other alphaviruses.

### 2.1.3. Survival and stability outside the host

Laboratory tests suggest that SAV would survive for extended periods in the aquatic environment. In these tests, virus could be detected at the end of the test period of 65 days in a majority of the trials. Virus survival was inversely related to temperature; at  $20^{\circ}\text{C}$  virus was not detectable beyond 35 days, and at  $4^{\circ}\text{C}$  was still present after 65 days. In general, survival time was reduced by the presence of organic matter, markedly longer survival times were observed in sea water compared with fresh water in the water, this effect being most prominent at low water temperatures (Graham et al., 2007b).

The half-life of SAV in serum has been found to be inversely related to temperature, being up to 7 times longer at  $4^{\circ}\text{C}$  than at  $20^{\circ}\text{C}$ , emphasising the need for rapid shipment of samples at  $4^{\circ}\text{C}$  to laboratories for virus isolation. For long-term conservation of SAV-positive samples and cultured virus, storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  is recommended (Graham et al., 2007b).

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 SAV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* include are: Arctic char (*Salvelinus alpinus*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), common dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>	<u>Genotype</u>
<u>Pleuronectidae</u>	<u><i>Limanda limanda</i></u>	<u>Common dab</u>	<u>SAV 5</u>
<u>Salmonidae</u>	<u><i>Oncorhynchus mykiss</i></u>	<u>Rainbow trout</u>	<u>SAV 1, 2, 3</u>
	<u><i>Salmo salar</i></u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>SAV 1, 2, 3, 4, 5, 6</u>
	<u><i>Salvelinus alpinus</i></u>	<u>Arctic charr</u>	<u>SAV 2</u>

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* include are: long rough dab (*Hippoglossoides platessoides*), plaice (*Pleuronectes platessa*) and Ballan wrasse (*Labrus bergylta*).

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: Argentine hake (*Merluccius hubbsi*), brown trout (*Salmo trutta*), cod (*Gadus morhua*), European flounder (*Platichthys flesus*), haddock (*Melanogrammus aeglefinus*), horring (*Clupea harengus*), Norway pout (*Trisopterus esmarkii*), saithe (*Pollachius virens*), longhorn sculpin (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) and whiting (*Merlangius merlangus*).

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Clupeidae</u>	<u><i>Clupea harengus</i></u>	<u>herring</u>
<u>Cottidae</u>	<u><i>Myoxocephalus octodecemspinosus</i></u>	<u>longhorn sculpin</u>
<u>Gadidae</u>	<u><i>Melanogrammus aeglefinus</i></u>	<u>haddock</u>
	<u><i>Trisopterus esmarkii</i></u>	<u>Norway pout</u>
	<u><i>Pollachius virens</i></u>	<u>saithe</u>
	<u><i>Merlangius merlangus</i></u>	<u>whiting</u>
	<u><i>Gadus morhua</i></u>	<u>Atlantic cod</u>
<u>Merlucciidae</u>	<u><i>Merluccius hubbsi</i></u>	<u>Argentine hake</u>
<u>Pleuronectidae</u>	<u><i>Platichthys flesus</i></u>	<u>European flounder</u>
<u>Salmonidae</u>	<u><i>Salmo trutta</i></u>	<u>brown trout</u>

### 2.2.3. Non-susceptible species

Species that have been found non-susceptible to infection with SVCV SAV according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: None known. No species are listed as non-susceptible.

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

Farmed Atlantic salmon and rainbow trout are the species with the highest likelihood of infection with SAV. Experimental studies have demonstrated that all life stages are susceptible to infection (Taksdal & Sindre, 2016). SAV 1–SAV 6 have been detected in Atlantic salmon. SAV 1, SAV 2 and SAV 3 have been detected in rainbow trout.

For the purposes of Table 4.1, Atlantic salmon alevins and fry (e.g. up to approximately 1 g in weight) may be considered early life stages, parr and smolts can be considered as juveniles and all fish post smoltification as adults.

### 2.2.5. Distribution of the pathogen in the host

The heart and the pancreas are main target organs for infection with SAV. Necrosis and loss of exocrine pancreatic tissue, myocarditis and skeletal myositis are typical histopathological findings. During the viraemic stage, substantial amounts of virus are also found in serum, and during the infection virus can also be found in brain, kidney, spleen, gills, mucous and faeces (Taksdal & Sindre, 2016).

### 2.2.6. Aquatic animal reservoirs of infection

There is evidence that some survivors of outbreaks will become long-term carriers of the virus (Graham *et al.*, 2010–2009) and thus farmed Atlantic salmon and rainbow trout can be considered the main reservoir of SAV (Taksdal & Sindre, 2016). Infection with SAV has been detected in some wild flatfish species in Scotland (Bruno *et al.*, 2014; Snow *et al.*, 2010) which could also act as a reservoir of infection.

### 2.2.7. Vectors

Although most alphaviruses are transmitted by arthropod vectors, vector transmission of SAV has not yet been demonstrated. SAV has been detected by reverse-transcription (RT) PCR in salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*) collected during acute outbreaks of pancreas disease in Atlantic salmon, but transfer to susceptible fish species has not been reported (Petterson *et al.*, 2009).

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Mortality rates due to infection with SAV may vary with genotype, season, year, use of biosecurity measures and species of fish (Bang Jensen *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2011; Rodger & Mitchell, 2007; Stormoen *et al.*, 2013). The cumulative mortality at the farm level ranges from negligible to over 50% in severe cases (Bang Jensen *et al.*, 2012; Graham *et al.*, 2003; Rodger & Mitchell, 2007; Ruane *et al.*, 2008; Stene *et al.*, 2014). Experimental studies have demonstrated that SAV 2 infection in marine fish causes lower mortality than SAV 3 (Taksdal *et al.*, 2015).

Duration of disease outbreaks, defined as the period with increased mortality, may vary from 1 to 32 weeks (Jansen *et al.* 2010a; 2014; Ruane *et al.*, 2008).

The prevalence of infection with SAV may vary is variable. During disease outbreaks, the prevalence is usually high; prevalences of 70–100% have been reported in Atlantic salmon farming sites (Graham *et al.*, 2010). Prevalences in wild fish are largely unknown. SAV has been detected by RT-PCR in some marine flatfish species in Scottish waters at prevalences ranging from 0% to 18%, depending on species and location (Snow *et al.*, 2010). A serological survey of wild salmonids in fresh water river systems in Northern Ireland did not detect virus neutralisation antibodies against SAV in any of 188 sera tested, whereas the majority of sera from farmed salmon in sea water in the same area tested positive (Graham *et al.*, 2003).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

A sudden drop in appetite may be observed 1–2 weeks before the detection of elevated mortality. Clinically diseased fish may be observed swimming slowly at the water surface. In some cases, extremely weak (“sleeping”) fish can be found at the bottom of tanks or in net-cages. An increased number of faecal casts may also be observed. However, it is important to note that clinical signs are not pathognomonic.

Initially, nutritional status is usually normal, but in the months after an outbreak or in the later stages of disease, long slender fish (‘runts’) with poor body condition are typically observed. However, the presentation of long, slender fish can be caused by factors other than SAV.

### 2.3.3 Gross pathology

Yellow mucoid gut contents is a usual post-mortem finding, typically seen in inappetent fish. Occasionally, signs of circulatory disturbances, such as petechial haemorrhages, ~~small mild~~ ascites or reddening of the pancreatic region between the pyloric caeca may be seen. Some diseased fish may ~~show~~ have pale or ruptured hearts ~~or heart ruptures~~. It is important to note that post-mortem findings are not pathognomonic.

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Horizontal transmission of SAV is demonstrated by a range of evidence including: phylogenetic studies, successful transmission among cohabiting fish, proven transmission between farming sites, studies on survival of SAV in sea water and the spread via water currents (Graham *et al.*, 2007b; 2011; Jansen *et al.*, 2010a; Kristoffersen *et al.*, 2009; Stene *et al.*, 2013; Viljugrein *et al.*, 2009).

Long-distance transmission, ~~and thus introduction~~ of SAV into a previously uninfected area is most likely due to movement of infected live fish (Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007). SAV has been detected in fat leaking from dead fish which accumulates at the sea water surface, contributing to long distance spread of the virus by water currents (Stene *et al.*, 2013-2016). Once SAV has been introduced into an area, farm proximity and water currents influence local transmission (Aldrin *et al.*, 2010; Kristoffersen *et al.*, 2009; Viljugrein *et al.*, 2009).

Vertical transmission of SAV has been suggested (Bratland & Nylund, 2009), but not demonstrated (Kongtorp *et al.*, 2010; McLoughlin & Graham, 2007). The Norwegian Scientific Committee for Food Safety, (2010), carried out a risk assessment and concluded that the risk of vertical transmission of SAV is negligible.

### 2.3.5. Environmental ~~and management~~ factors

Clinical outbreaks and mortality are influenced by water temperature and season (McLoughlin & Graham, 2007; Rodger & Mitchell, 2007; Stene *et al.*, 2014; Stormoen *et al.*, 2013). ~~Stressing the fish by movement, crowding or treatment may initiate disease outbreaks on infected farms.~~

~~Risk factors for outbreaks on a farming site include a previous history of infection with SAV, high feeding rate, high sea lice burden, the use of autumn smolts and previous outbreaks of infectious pancreatic necrosis (IPN) (Bang Jensen *et al.*, 2012; Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007).~~

### 2.3.6. Geographical distribution

Infection with SAV has been reported from several countries in Europe. See WAHIS ([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en)) for recent information on distribution at the country level.

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

DNA-based and cell-culture-based virus-inactivated vaccines against SAV are both commercially available. ~~The vaccines may cause a risk of false positives, both in serological and PCR-based tests, according to data presented by vaccine companies. However, reports from the field indicates that false positives to serological tests do not occur after sea transfer. To prevent false positives by RT-PCR, sampling from vaccinated individuals should use heart tissue to avoid opening the abdominal cavity.~~

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No chemotherapy is available.

#### 2.4.3. Immunostimulation

No immunostimulation is available.

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

Differences in susceptibility among different family groups of Atlantic salmon have been observed in challenge experiments and in the field, indicating the potential for breeding for resistance (Norris *et al.*, 2008; Gonen *et al.*, 2015). Breeding programmes in Ireland and Norway have successfully produced fish with increased resistance to disease caused by SAV, which are now commercially available.

#### 2.4.5. Inactivation methods

SAV is rapidly inactivated in the presence of high levels of organic matter at 60°C, pH 7.2, and at 4°C, pH 4 and pH 12, suggesting that composting, ensiling and alkaline hydrolysis would all be effective at inactivating virus in fish waste (Graham *et al.*, 2007a). The virus is also readily inactivated by UV-light, but is more resistant to chlorine and ozone treatment at pH 4 and pH 12, and after heating to 60°C (Graham *et al.*, 2007b). The virus is also readily inactivated by UV-light (Anon). A range of commercially available disinfectants have been tested for efficacy against salmonid alphavirus under different conditions, all being found to be effective under at least some of the conditions tested. The presence of organic matter was shown to decrease the effectiveness of disinfectants be detrimental in some cases (Graham *et al.* 2007a).

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Standard disinfection procedures are considered sufficient to prevent surface contamination of eggs by SAV (Graham *et al.*, 2007a).

#### 2.4.7. General husbandry

Stressing the fish by movement, crowding or treatment may initiate disease outbreaks on infected farms. Risk factors for outbreaks on a farming site include a previous history of infection with SAV, high feeding rate, high sea lice burden, the use of autumn smolts and previous outbreaks of infectious pancreatic necrosis (Bang Jensen *et al.*, 2012; Kristoffersen *et al.*, 2009; Rodger & Mitchell, 2007).

To avoid infection with SAV, good husbandry practices should be applied such as use of appropriate sites for farming, segregation of generations, stocking with good quality fish, removal of dead fish, regular cleaning of tanks and pens, control of parasites and other pathogens, as well as careful handling of fish. Once an outbreak has started, mortality may be reduced by minimising handling and ceasing feeding.

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

~~Clinical inspections should be carried out during a period when the water temperature is below XX°C. All production units (ponds, tanks, net-cages, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. Extremely weak ('sleeping') fish may be found at the bottom of a tank or in the net-cages. If the number of clinically diseased fish is low, samples from long, thin fish ('runts') may be added (Jansen *et al.*, 2010b). If moribund or thin fish or runts are sampled, the probability of detecting SAV is higher than if randomly selected, apparently healthy fish are sampled (Jansen *et al.*, 2010b). Prevalence estimates will also vary with the diagnostic method used.~~

Fish to be sampled are selected as follows:

- i) Susceptible species should be sampled proportionally or following risk-based criteria for targeted selection of lots or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. via untreated surface water, wild harvest or replacement with stocks of unknown disease status).



- ii) If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.
- iii) ~~Weak, abnormally behaving or freshly dead (not decomposed) fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the selected fish selected~~ should include normal appearing, apparently healthy fish collected in such a way that all parts of the farm, as well as all year classes, are proportionally represented in the sample.

### 3.2. Selection of organs or tissues

Heart and mid-kidney are the recommended organs for detection of SAV either by molecular biological methods or by cell culture. During ~~the course of the disease, an outbreak~~, the heart usually contains more SAV than other tissues and should always be sampled. After disease outbreaks, gill and heart tissue (Graham *et al.*, 2010) and pools of heart and mid-kidney tissue (Jansen *et al.*, 2010b) remained positive by real time RT-PCR for months after initial detection.

~~For sampling from vaccinated fish, For vaccinated fish, the heart should be sampled, from vaccinated fish without and mid-kidney, spleen or other internal organs should not be sampled, because opening the abdominal cavity. Sampling of mid-kidney, spleen or other internal organs is not recommended, to avoid may cause contamination of with viral RNA/DNA from the vaccine (See Section 2.4).~~

During the initial viraemic phase, serum samples are also suitable for detection of SAV either by molecular biological methods or by cell culture, which can provide an early warning of disease outbreaks (Graham *et al.*, 2010). From approximately 3 weeks after SAV infection, blood serum or plasma is suitable for a virus neutralisation test (Graham *et al.*, 2003).

Tissues suitable for histological examinations ~~should~~ include gill, heart, pyloric caeca with attached pancreatic tissue, liver, kidney, spleen and skeletal muscle containing both red (aerobic) and white (anaerobic) muscle. Skin with associated skeletal muscle should be sampled at the lateral line level and deep enough to include both red and white muscle.

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Pancreas, although a target organ for the virus, is not suitable for RT-PCR detection of SAV, as it is impossible to separate this organ from the intestine of the fish during sampling, and in addition loss of pancreas is common in infected fish. Organs other than those recommended in Section 3.2 should not be used for the detection of SAV, as the sensitivity of the diagnostic methods might be reduced.

### 3.4. Non-lethal sampling

There are investigations into using non-lethal sampling methods for surveillance of SAV in fish farms, including detection of virus in water (Bernhard *et al.*, 2021). However, no validated methods are currently available. Serum samples may be collected via non-lethal sampling methods and considered suitable for some SAV test methods as described in Section 3.2.

### 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).

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

Before transfer to the laboratory, pieces of the organs to be examined for virus isolation should be removed from the fish with sterile dissection tools and transferred to sterile plastic tubes containing at least 4 ml transport medium, i.e. cell culture medium with 10% fetal calf bovine serum (FCS FBS) and antibiotics. The combination of 200 International Units (IU) penicillin, 200 µg streptomycin, and 200 µg kanamycin per ml are recommended, although other antibiotics of proven efficiency may also be used. The tissue in each sample should be larger than the analytical unit size required for initial laboratory testing (e.g. between 0.5 and 2 g) and taken in duplicate if retesting may be required. To prepare duplicates (for retesting) it is recommended to aliquot the organ material after homogenisation.

Tubes containing fish tissues in transport medium for cell cultivation should be placed in insulated containers, such as thick-walled polystyrene boxes, together with sufficient ice or an alternative cooling medium with the similar cooling effect to ensure chilling of the samples during transportation to the laboratory. However, freezing of the samples should be avoided. The temperature of a sample during transit must never exceed 10°C.

Whole fish may be sent to the laboratory if the temperature requirements referred to in the first paragraph during transportation can be fulfilled. Whole fish should be wrapped up in paper with absorptive capacity and enclosed in a plastic bag. Live fish may also be transported to the laboratory.

The virological examination for isolation in cell culture should be started as soon as possible and no later than 48 hours after the collection of the samples. In exceptional cases, the virological examination may be started at the latest within 72 hours after the collection of the material, provided that the material to be examined is protected by a transport medium and that the temperature requirements during transportation can be fulfilled.

### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Samples can be taken from the fish in accordance with the procedure described in Section 3.5.1, using a sterile instrument, and transferred to a sterile plastic tube containing transport medium.

Alternatively, tissue samples for RT-PCR testing should be preserved in an appropriate medium for preservation of RNA. Samples in RNA stabilising reagents can be shipped on ice or at room temperature if transport time does not exceed 24 hours.

For further storage, the samples should ~~can~~ be kept below at -20°C.

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

Tissue samples for histopathology should be fixed in 10% neutral buffered formalin immediately after collection. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1.

### 3.5.4. Fixed Samples for electron microscopy

Samples for electron microscopy are not routinely required and are collected only when it is considered beneficial to facilitate further diagnostic investigation. A 2 mm cubed section from each of the appropriate organs described in section 3.2 should be fixed in glutaraldehyde; the recommended ratio of fixative to tissue is 10:1.

### 3.5.5-4. Samples for other tests

Blood samples should be centrifuged for the collection of serum or plasma as soon as possible after sampling, to avoid lysis of the red blood cells. Serum or plasma samples should be shipped on ice to the laboratory to ensure virus viability.

## 3.6. Pooling of samples

The reliability of a virus isolation and real-time RT-PCR for detecting SAV in pooled samples from apparently healthy and clinically diseased populations of Atlantic salmon has not been evaluated completely thoroughly (Hall *et al.*, 2014). The Results suggest that the use of individual samples rather than pools is-are more appropriate when testing for freedom from, or for confirmatory diagnosis of, infection with SAV (Hall *et al.*, 2014).

#### 4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations), ii) presumptive and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage. The designations used in Table 4.1 indicate:

Key:

- +++ = Recommended method(s) validated for the purpose shown and usually to stage 3 of the OIE Validation Pathway;
  - ++ = Suitable method(s) but may need further validation;
  - + = May be used in some situations, but cost, reliability, lack of validation or other factors severely limits its application;
- 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.

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

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology <sup>3</sup>					++	++	++	<u>2</u>				
Cytopathology <sup>3</sup>												
Cell or artificial media culture					+	+	+	<u>2</u>	+	+	+	<u>2</u>
Real-time RT-PCR	+++	+++	+++	<u>1,2</u>	+++	+++	+++	<u>2</u>	+++	+++	+++	<u>2</u>
Conventional RT-PCR					++	++	++	<u>1</u>	++	++	++	<u>1</u>
Amplicon sequencing <sup>4</sup>									+++	+++	+++	<u>1</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab ELISA												
Ag ELISA												
Immunohistochemistry										±	±	<u>2</u>
Serum neutralisation assay		+	++	<u>1</u>	++	++	++	<u>2</u>				

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); RT-PCR = reverse transcription-polymerase chain reaction methods;

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

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Early and juvenile life stages have been defined in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Histopathology and cytopathology can be validated if the results from different operators has been statistically compared. <sup>4</sup>Sequencing of the PCR product.

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

#### 4.1. Wet mounts

Not ~~relevant~~ applicable.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

The pathological changes most commonly found in clinically diseased fish are severe loss of exocrine pancreatic tissue, cardiomyocytic necrosis and inflammation, red (aerobic) skeletal muscle inflammation and white (anaerobic) skeletal muscle degeneration or inflammation. A less frequent but supporting finding is the detection of cells with many cytoplasmic eosinophilic granules along kidney sinusoids.

As the disease progresses, the development of these changes is not simultaneous in all organs: in a very short, early phase, the only lesions present might be necrosis of exocrine pancreatic tissue and a variable inflammatory reaction in the peripancreatic fat. Shortly thereafter, heart muscle cell degeneration and necrosis develop before the inflammation response in the heart becomes more pronounced. The pancreatic necrotic debris will seemingly disappear, and the typical picture of severe loss of exocrine pancreatic tissue will soon appear simultaneously with the increasing inflammation in the heart. ~~Somewhat later,~~ Subsequently, skeletal muscle degeneration, inflammation and fibrosis develop. In a proportion of fish, severe fibrosis of the peri-acinar tissue may occur, and in these cases, the pancreas does not recover (runs) (Christie *et al.*, 2007; Kerbart Boscher *et al.*, 2006; McLoughlin & Graham, 2007; Taksdal *et al.*, 2007).

Cytopathology is not relevant for diagnostic use.

#### 4.3. Cell ~~or artificial media~~ culture for isolation

##### 4.3.1. ~~Cell lines~~

Isolation of field isolates of SAV in cell culture may be challenging (Christie *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2007b; Petterson *et al.*, 2013).

CHSE-214 cell cultures are commonly used for primary SAV isolation, but susceptible cell lines such as BF-2, FHM, SHK-1, EPC, CHH-1 or others, may be used. Nevertheless, variation in cell line susceptibility among different SAV field isolates has been reported (Graham *et al.*, 2008; Herath *et al.*, 2009), and it is Therefore recommended that several cell lines are other susceptible cell lines such as BF-2, FHM, SHK-1, EPC, CHH-1 should be tested for initial cell culture isolation of SAV in a new laboratory or for a new virus strain. Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

The CHSE-214 cells are grown at 20°C in Eagle's minimal essential medium (EMEM) with non-essential amino acids and 0.01 M HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid) buffer, or Leibovitz's L-15 cell culture medium, both supplemented with fetal bovine serum (FBS) (5% or 10%) and L-glutamine (4 mM).

##### 4.3.2. ~~Sample preparation and inoculation~~

For virus isolation, cells are grown in tissue culture flasks or multi-well cell culture plates. SAV-positive controls are may be inoculated in parallel with the tissue samples as a test for cell susceptibility to SAV. When positive controls are included, measures must be taken to avoid contamination.

Use the procedure for sample preparation and inoculation described in Chapter 2.3.0 General information (on diseases of fish), Section A.2.2.2.

##### i) ~~Inoculation of cell monolayers~~

~~Prepare a 2% suspension of tissue homogenate or a 10% suspension of serum using L-15 medium or EMEM without serum, or other medium with documented suitability. Remove growth medium from actively growing monolayers (1- to 2-day-old cultures or cultures of 70–80% confluency) grown in tissue culture flasks or multi-well cell culture plates (see above). Inoculate monolayers with a low volume of the 2% tissue homogenate or 10% serum dilution (for 25 cm<sup>2</sup> flasks: 1.5 ml). Adjust volume to the respective surface area in use. Allow 2–3 hours of incubation at 15°C, followed by removal of the inoculum, and addition of fresh L-15 or EMEM medium supplemented with 2–5% fetal bovine serum (for 25 cm<sup>2</sup> flasks: 5 ml).~~

When fish samples come from production sites where IPNV is regarded as endemic, the tissue homogenate supernatant should be incubated (for a minimum of 1 hour at 15°C) with a pool of antisera to the indigenous serotypes of IPNV prior to inoculation.

#### ii) ~~Monitoring incubation~~

~~Inoculated cell cultures (kept at 15°C) are examined at regular intervals (at least every 7 days) for the occurrence of cytopathic effect (CPE). Typical CPE due to SAV appears as plaques of pyknotic, vacuolated cells. However, Norwegian SAV field isolates (both SAV3 and SAV2) usually do not produce CPE in low passages, and this is also reported for other SAV genotypes (Graham *et al.*, 2008; Petterson *et al.*, 2013). If no CPE has developed after 14 days, subculture to fresh cell cultures.~~

#### iii) ~~Subcultivation procedure~~

~~14 days (or earlier when obvious CPE appears) after inoculation, the cultures are freeze-thawed at -80°C to release virus from the infected cells. The procedure can be repeated 1–2 times.~~

~~Following centrifugation at 3000 g for 5 minutes, the supernatants are inoculated into fresh cell cultures as described for the primary inoculation: remove growth medium, inoculate monolayers with a small volume of diluted supernatant (1/5 and higher dilutions) for 2–3 hours before addition of fresh medium.~~

Inoculated cell cultures are incubated at 15°C for at least 14 days and examined at regular intervals for the occurrence of cytopathic effect (CPE). Typical CPE due to SAV appears as plaques of pyknotic, vacuolated cells. However, Norwegian SAV field isolates (both SAV3 and SAV2) usually do not produce CPE in low passages, and this is also reported for other SAV genotypes (Graham *et al.*, 2008; Petterson *et al.*, 2013). If no CPE has developed after 14 days, subculture to fresh cell cultures, as described for the primary inoculation. At the end of the incubation period, or earlier if obvious CPE appears, the medium is collected for virus identification, as described below. Cell cultures should always be examined for the presence of SAV by immunofluorescence (indirect fluorescent antibody test [IFAT]) or conventional RT-PCR or real-time RT-PCR as virus replication may occur without development of apparent CPE.

## 4.4. Nucleic acid amplification

### 4.4.1. Reverse transcription, Real-time RT-PCR polymerase chain reaction

The primers described below for real-time RT-PCR and RT-PCR with sequencing will detect all known genotypes of SAV.

RT-PCR may be used for detection of SAV from total RNA (or total nucleic acids) extracted from recommended organs or tissues (see Section 3.4). Real-time RT-PCR for the detection of SAV is recommended as it increases the specificity and the sensitivity of the test.

For genotyping, RT-PCR with subsequent sequencing of fragments from the E2 gene is recommended.

The primers and probe sequences for real-time RT-PCR from the nsP1 gene, as well as primers for genotyping, are listed in Table 4.2. ~~The E2 primers may also be used for conventional RT-PCR detection of SAV, if necessary.~~ For RNA extraction, automatic and semi-automatic nucleic acid extractors can be used. In addition, a variety of manual RNA extraction kits can also be used successfully to extract SAV RNA. Various RT-PCR kits and real-time PCR machines can be used. The PCR programme depends on the kit and real-time PCR equipment used in the laboratory. The conditions for performing the real-time RT-PCR in the OIE Reference Laboratory is as follows: 50°C for 10 minutes, 95°C for 3 minutes, and 40 cycles of (95°C for 10 seconds, 60°C for 20 seconds). ~~For the conventional RT-PCRs (sequencing), the following programme is used: 50°C for 30 minutes, 95°C for 15 minutes, and 45 cycles of (94°C for 60 seconds, 55°C for 45 seconds, 72°C for 60 seconds).~~

**Table 4.2.** Primers and probe sequences for RT-PCR and real time RT-PCR

Primer and probe sequences	<u>Test type</u>	Genomic segment	Product size	Reference
QnsP1F: 5'-CCG-GCC-CTG-AAC-CAG-TT-3' QnsP1R: 5'-GTA-GCC-AAG-TGG-GAG-AAA-GCT-3' QnsP1probe: 5'FAM-CTG-GCC-ACC-ACT-TCG-A-MGB3' (Taqman@probe)	<u>Real-time RT-PCR</u>	QnsP1	107 nt <u>bp</u>	Hodneland <i>et al.</i> , 2006
E2F: 5'-CCG-TTG-CGG-CCA-CAC-TGG-ATG-3' E2R: 5'-CCT-CAT-AGG-TGA-TCG-ACG-GCA-G-3'	<u>RT-PCR</u>	E2	516 107 nt <u>bp</u>	Fringuelli <i>et al.</i> , 2008

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

#### 4.4.2. Conventional RT-PCR (PCR)

See Section 4.4.1 for comments on conventional PCR kits and PCR machines.

The E2-primers stated in Table 4.2 may be used for conventional RT-PCR detection of SAV, if necessary.

For the conventional RT-PCR (and sequencing), the following programme is used: 50°C for 30 minutes, 95°C for 15 minutes, and 45 cycles of (94°C for 60 seconds, 55°C for 45 seconds, 72°C for 60 seconds).

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

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Not applicable.

### 4.5. Amplicon sequencing

Sequencing to determine the genotype of SAV can be performed using the E2 primer set listed in Table 4.2. Nucleotide sequencing-sequence analysis of the RT-PCR amplicon (Section 4.4.2) is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. SAV-specific sequences will share a higher degree of nucleotide similarity to one of the published reference sequences for SAV.

### 4.6. *In-situ* hybridisation

Not applicable.

### 4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemical testing (Taksdal *et al.*, 2007) is only recommended for samples from fish with acute necrosis of exocrine pancreatic tissue.

#### 4.7.1. Preparation of tissue sections

The tissues are fixed in neutral phosphate-buffered 10% formalin for at least 1 day, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin, according to standard protocols. Approximately 3 µm thick sections (for immunohistochemistry sampled on poly-L-lysine-coated slides) are heated at 56–58°C (maximum 60°C) for 20 minutes, dewaxed in xylene, rehydrated through graded ethanol, and stained with haematoxylin and eosin for histopathology and immunohistochemistry as described below.

#### 4.7.2. Staining procedure for immunohistochemistry

All incubations are carried out at room temperature and all washing steps are done with Tris-buffered saline (TBS).

- i) Nonspecific antibody binding sites are first blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) in TBS for 20 minutes. The solution is then poured off without washing.
- ii) Sections are incubated with primary antibody (monoclonal mouse antibody 4H1 against E1 SAV glycoprotein [Todd *et al.*, 2001]), diluted 1/3000 in 2.5% BSA in TBS and then incubated overnight, followed by two wash out baths lasting a minimum of 5 minutes.
- iii) Sections are incubated with secondary antibody (biotinylated rabbit anti-mouse Ig) diluted 1/300 for 30 minutes, followed by wash out baths as in step ii above.
- iv) Sections are incubated with streptavidin ~~with~~ alkaline phosphatase conjugate (1/500) for 30 minutes followed by wash out baths as in step ii above.
- v) For detection of bound antibodies, sections are incubated with Fast Red<sup>10</sup> (1 mg ml<sup>-1</sup>) and Naphthol AS-MX phosphate (0.2 mg ml<sup>-1</sup>) with 1 mM Levamisole in 0.1 M TBS (pH 8.2) and allowed to develop for 20 minutes followed by one wash in tap water before counterstaining with Mayer's haematoxylin and mounting in aqueous mounting medium.

SAV-positive and SAV-negative tissue sections are included as controls in every setup (Taksdal *et al.*, 2007).

#### 4.8. Bioassay

Not applicable.

#### 4.9. Antibody or antigen-based detection methods

##### 4.9.1. Antibody-based verification of SAV growth in cell culture

This technique should not be used as a screening method. All incubations below are carried out at room temperature unless otherwise stated.

- i) Prepare monolayers of cells in appropriate tissue culture plates (e.g. 96-well plates) or on cover-slips, depending on the type of microscope available (an inverted fluorescence microscope equipped with UV light is necessary for monolayers grown on tissue culture plates). The necessary monolayers for negative and positive controls must be included.
- ii) Inoculate the monolayers with the virus suspensions to be identified in tenfold dilutions, two monolayers for each dilution. Add positive virus control in dilutions known to give a good staining reaction. Incubate inoculated cell cultures at 15°C for 9–11 days.
- iii) Fix in 80% acetone for 20 minutes after removing cell culture medium and rinsing once with 80% acetone. Remove the fixative and air dry for 1 hour. If necessary, the fixed cell cultures may be stored dry for 14 days at 4°C until staining.
- iv) Incubate the cell monolayers with anti-SAV MAb antibodies in an appropriate dilution in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 hour and rinse three times with PBS with 0.05% Tween 20.
- v) Incubate with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse species-specific immunoglobulin antibody for 1 hour ~~(or if the primary Ab is polyclonal from rabbits, use FITC-conjugated antibody against rabbit immunoglobulin)~~, according to the instructions of the supplier. To increase the sensitivity of the test, FITC-conjugated anti-mouse Ig may be replaced with biotin-labelled anti-mouse Ig and FITC-labelled streptavidin with rinsing as in step d) in between the steps. The nuclei can be stained with propidium iodide (100 µg ml<sup>-1</sup> in sterile distilled water). Add PBS (without Tween 20) and examine under fluorescence microscope-UV light. To avoid fading, the stained plates should be kept in the dark until examination. To reduce photobleaching of FITC due to the exposure to excitation light during microscopy. For long periods of storage (more than 2–3 weeks) a solution of 1,4-diazabicyclooctane (DABCO 2.5% in PBS, pH 8.2) or similar reagent may be added as an anti-fade solution.

<sup>10</sup> Reference to specific commercial products as examples does not imply their endorsement by the OIE. This applies to all commercial products referred to in this *Aquatic Manual*.



## 4.10. Other methods

### 4.10.1. ~~Immunoperoxidase-based~~ Serum neutralisation assay

Experimental studies have shown that neutralising antibodies can first be detected 10–16 days post-infection (Graham *et al.*, 2003), and serum neutralisation (SN) assays can be used as a diagnostic tool for the detection of SAV antibodies. SN assays are based on the presence or absence of detectable virus growth in cultured cells following incubation with serum that may contain neutralising antibodies. In addition, the assay allows detection of virus in serum or plasma, if present, as control wells of samples without added SAV are always included in the assay to assess presence of virus in the samples.

CHSE-214 cells are grown as described in Section 4.3.1. A suspension of trypsinised cells, diluted 1/3 in growth medium (10% FBS) is prepared for the SN assay.

- i) 1/20 and 1/40 dilutions of each test serum are prepared in maintenance medium (2% FBS), and transferred to two duplicate wells (15 µl per well) on a flat-bottomed tissue culture grade microtitre plate. An equal volume of virus (100 TCID<sub>50</sub> [median tissue culture infective dose]) is added and the plate is incubated for 2 hours at room temperature.
- ii) 70 µl of maintenance medium, and 50 µl of the CHSE-214 cell suspension is added to each well, and the plates are incubated for 3 days at 15°C.
- iii) The cell monolayer is then fixed and stained as described in Section 4.9.1 *Antibody-based verification of SAV growth in cell culture*, or using the following procedure: monolayers of CHSE-214 cells are fixed for 30 minutes at room temperature in 10% neutral buffered formalin. Following two washes with 0.01 M PBS, a MAbs against SAV is added to the monolayers in an appropriate dilution. Bound MAbs is visualised using a labelled streptavidin–biotin system according to the manufacturer’s instructions.
- iv) SN titres (ND<sub>50</sub>) are then calculated according to the method of Karber (1931), with titres ≥ 1:20 being considered positive. Both known negative serum controls and a control well for each sample (without virus added), and a virus control (without serum added) must always be included in the assay, to ensure valid results. During viremia (as indicated by detection of SAV in the sample control wells) a SN titre cannot be assessed.

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

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

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>11</sup>

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

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with SAV 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) SAV-typical CPE in cell culture~~
- ii) Detection of neutralising activity against SAV in serum or plasma.

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with SAV is considered to be confirmed if ~~in addition to the criteria in Section 6.1.1.,~~ one or more of the following criteria is met:

- i) A positive result on tissue preparations by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;
- ~~ii) A positive result on tissue preparations by real-time RT-PCR and SAV-typical CPE in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;~~
- ~~iii) A positive result on tissue preparations by immunohistochemistry, and by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon.~~
- ~~iii) Detection of neutralising activity against SAV in serum or plasma and SAV-typical CPE in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon~~
- ~~iv) Detection of neutralising activity against SAV in serum or plasma and a positive result on tissue preparations by conventional RT-PCR and sequencing 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 SAV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with infection with SAV;
- ii) Histopathology consistent with SAV infection;
- ~~iii) SAV-typical CPE in cell culture;~~
- iv) Positive result by real-time RT-PCR;
- v) Positive result by conventional RT-PCR;
- ~~v) SAV-typical CPE in cell culture~~
- vi) Detection of neutralising activity against SAV in serum or plasma.

<sup>11</sup> For example, transboundary commodities.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with SAV is considered to be confirmed if, in addition to the criteria Section 6.2.1., one of the following criteria is met:

- i) A positive result on tissue preparations by real-time RT-PCR and a positive result by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;
- ii) A positive result on tissue preparations by real-time RT-PCR and SAV-typical CPE in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;
- iii) A positive result on tissue preparations by immunohistochemistry, and by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon.
- iii) Detection of neutralising activity against SAV in serum or plasma and SAV-typical CPE in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon
- iv) Detection of neutralising activity against SAV in serum or plasma and a positive result on tissues preparations by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon
- v) A positive result on tissue preparations by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon

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

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests: under study

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with SAV is provided in Table 6.3. This information can be used for the design of surveys for infection with SAV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data are only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

**Table 6.3.** Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis on field studies

<u>Test type</u>	<u>Test purpose</u>	<u>Test populations</u>	<u>Tissue or sample types</u>	<u>Species</u>	<u>DSe (n)</u>	<u>DSp (n)</u>	<u>Reference test</u>	<u>Citation</u>
<u>Real-time PCR</u>	<u>Surveillance Diagnosis</u>	<u>Infected</u>	<u>Kidney</u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>0.39 (598)</u>	<u>&gt;0.99 (598)</u>	<u>n/a (Bayesian probability model)</u>	<u>Hall et al., 2014</u>
<u>Real-time PCR</u>	<u>Surveillance Diagnosis</u>	<u>Infected vs assumed SAV free</u>	<u>Heart and mid-kidney</u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>0.978 (268)</u>	<u>0.831 (268)</u>	<u>n/a (Bayesian Latent Class Analysis)</u>	<u>Jansen et al., 2019</u>
<u>Isolation of SAV in cell culture</u>	<u>Diagnosis</u>	<u>Infected</u>	<u>Heart ventricle and head-kidney</u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>0.50 (598)</u>	<u>&gt;0.99 (598)</u>	<u>n/a (Bayesian probability model)</u>	<u>Hall et al., 2014</u>
<u>Isolation of SAV in cell culture</u>	<u>Diagnosis</u>	<u>Infected vs assumed SAV free</u>	<u>Heart and mid-kidney</u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>0.950 (268)</u>	<u>0.993 (268)</u>	<u>n/a (Bayesian Latent Class Analysis)</u>	<u>Jansen et al., 2019</u>
<u>Detection of neutralising activity against SAV</u>	<u>Surveillance</u>	<u>Infected vs assumed SAV free</u>	<u>Serum or plasma</u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>0.085 (268)</u>	<u>0.744 (268)</u>	<u>n/a (Bayesian Latent Class Analysis)</u>	<u>Jansen et al., 2019</u>
<u>Histopathology</u>	<u>Diagnosis</u>	<u>Infected vs assumed SAV free</u>	<u>Heart and mid-kidney</u>	<u>Atlantic salmon</u>	<u>0.637 (268)</u>	<u>0.967 (268)</u>	<u>n/a (Bayesian Latent Class Analysis)</u>	<u>Jansen et al., 2019</u>

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

Commission des normes sanitaires pour les animaux aquatiques de l'OIE / février 2021

## 7. References

ALDRIN M., STORVIK B., FRIGESSI A., VILJUGREIN H. & JANSEN P.A. (2010). A stochastic model for the assessment of the transmission pathways of heart and skeleton muscle inflammation, pancreas disease and infectious salmon anaemia in marine fish farms in Norway. *Prev. Vet. Med.*, **93**, 51–61.

ANON. Development and optimization of an environmentally friendly water purification system for fish transport water based on UV technology. Project report, Norwegian Institute for Water Research. Project no: 245494/E40. 8pp. (In Norwegian).

BANG JENSEN B., KRISTOFFERSEN A.B., MYR C. & BRUN E. (2012). Cohort study of effect of vaccination on pancreas disease in Norwegian salmon aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **102**, 23–31.

BERNHARD L.-V., MYRMEL M., LILLEHAUG A., QVILLER L. & WELI S.C. (2021). A filtration method for concentration and detection of Salmonid alphavirus in seawater during a post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) cohabitant challenge trial. *Dis. Aquat. Org.*, DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03572>

BRATLAND A. & NYLUND A. (2009). Studies on the possibility of vertical transmission of Norwegian salmonid Alphavirus in production of Atlantic salmon in Norway. *J. Aquat. Anim. Health*, **21**, 73–78.

BRUNO D.W., NOGUERA P.A., BLACK J., MURRAY W., MACQUEEN D.J. & MATEJUSOVA I. (2014) Identification of a wild reservoir of salmonid alphavirus in common dab *Limanda limanda*, with emphasis on virus culture and sequencing. *Aquacult Environ Interact* 5:89-98. <https://doi.org/10.3354/aei00097>.

CHRISTIE K.E., FYRAND K., HOLTET L. & ROWLEY H.M. (1998) Isolation of pancreas disease virus from farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Norway. *J. Fish Dis.*, **21**, 391–394.

CHRISTIE K.E., GRAHAM D.A., MCLOUGHLIN M. F., VILLOING S., TODD D. & KNAPPSKOG D. (2007). Experimental infection of Atlantic salmon *Salmo salar* pre-smolts by i.p. injection of new Irish and Norwegian salmonid alphavirus (SAV) isolates: a comparative study. *Dis. Aquat. Org.*, **75**, 13–22.

FRINGUELLI E., ROWLEY H.M., WILSON J.C., HUNTER R., RODGER H. & GRAHAM D.A. (2008). Phylogenetic analyses and molecular epidemiology of European salmonid alphaviruses (SAV) based on partial E2 and nsP3 gene nucleotide sequences. *J. Fish Dis.*, **31**, 811–823.

GONEN S., BARANSKI M., THORLAND I., NORRIS A., GROVE H., ARNESEN P., BAKKE H., LIEN S., BISHOP S.C. & HOUSTON R.D. (2015). Mapping and validation of a major QTL affecting resistance to pancreas disease (salmonid alphavirus) in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Heredity*, **115**, 405–414. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.37>

GRAHAM D.A., CHERRY K., WILSON C.J. & ROWLEY H.M. (2007a). Susceptibility of salmonid alphavirus to a range of chemical disinfectants. *J. Fish Dis.*, **30**, 269–277.

GRAHAM D.A., FRINGUELLI E., WILSON C., ROWLEY H.M., BROWN, A., RODGER H., MCLOUGHLIN M.F., MCMANUS C., CASEY E., MCCARTHY L.J. & RUANE N.M. (2010). Prospective longitudinal studies of salmonid alphavirus infections on two Atlantic salmon farms in Ireland; evidence for viral persistence. *J. Fish Dis.*, **33**, 123–135.

GRAHAM D.A., FROST P., MCLAUGHLIN K., ROWLEY H.M., GABESTAD I., GORDON A. & MCLOUGHLIN M.F. (2011). A comparative study of marine salmonid alphavirus subtypes 1–6 using an experimental cohabitation challenge model. *J. Fish Dis.*, **34**, 273–286.

GRAHAM D.A., JEWHRUST V.A., ROWLEY H.M., MCLOUGHLIN M.F. & TODD D. (2003). A rapid immunoperoxidase-based neutralization assay for salmonid alphavirus used for a serological survey in Northern Ireland. *J. Fish Dis.*, **26**, 407–413

GRAHAM D.A., ROWLEY H.M. & FROST P. (2014). Cross-neutralization studies with salmonid alphavirus subtype 1–6 strains: results with sera from experimental studies and natural infections. *J. Fish Dis.*, **37**, 683–691.

GRAHAM D.A., STAPLES V., WILSON C.J., JEWHRUST H., CHERRY K., GORDON A. & ROWLEY H.M. (2007b). Biophysical properties of salmonid alphaviruses: influences of temperature and pH on virus survival. *J. Fish Dis.*, **30**, 533–543.

- GRAHAM D.A., WILSON C., JEWHRST H. & ROWLEY H. (2008). Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influences of cell line and temperature. *J. Fish Dis.*, **31**, 859–868.
- HALL L.M., MUNRO L.A., WALLACE I.S., MCINTOSH R., MACNEISH K. & MURRAY, A.G. (2014). An approach to evaluating the reliability of diagnostic tests on pooled groups of infected individuals. *Prev. Vet. Med.* **116**, 305–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.021>
- HERATH T., COSTA J., THOMPSON K., ADAMS A. & RICHARDS R. (2009). Alternative cell line for the isolation of salmonid alphavirus-1. *Icelandic Agricultural Sci.*, **22**, 19–27.
- HODNELAND K. & ENDRESEN C. (2006). Sensitive and specific detection of salmonid alphavirus using real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods*, **131**, 184–192.
- ~~JANSEN M.D., BANG JENSEN B. & BRUN E. (2014). Clinical manifestations of pancreas disease (PD) outbreaks in Norwegian marine salmon farming – variations due to salmonid alphavirus (SAV) subtype. *J. Fish Dis.*, 24 March, doi: 10.1111/jfd.12238~~
- JANSEN M.D., GUARRACINO M., CARSON M., MODAHL I., TAKSDAL T., SINDRE H., BRUN E. & TAVORNPANICH S. (2019). Field evaluation of diagnostic test sensitivity and specificity for *Salmonid alphavirus* (SAV) infection and pancreas disease (PD) in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway using Bayesian latent class analysis. *Frontiers Vet. Sci.*, doi: 10.3389/fvets.2019.00419
- JANSEN M.D., TAKSDAL T., WASMUTH M.A., GJERSET B., BRUN E., OLSEN A.B., BRECK O. & SANDBERG M. (2010a). Salmonid alphavirus (SAV) and pancreas disease (PD) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in freshwater and seawater sites in Norway from 2006 to 2008. *J. Fish Dis.*, **33**, 391–402.
- JANSEN M.D., WASMUTH M.A., OLSEN A.B., GJERSET B., MODAHL I., BRECK O., HALDORSEN R.N., HJELMELAND R. & TAKSDAL T. (2010b). Pancreas disease (PD) in sea-reared Atlantic salmon, *Salmon salar* L., in Norway; a prospective, longitudinal study of disease development and agreement between diagnostic test results. *J. Fish Dis.*, **33**, 723–736.
- JEWHRST V.A., TODD D., ROWLEY H.M., WALKER I.W., WESTON J.H. MCLOUGHLIN M.F & GRAHAM D.A. (2004). Detection and antigenic characterization of salmonid alphavirus isolates from sera obtained from farmed Atlantic salmon, *salmo salar* L., and farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **27**, 143–149.
- KERBART BOSCHER S., MCLOUGHLIN M., LE VEN A., CABON J., BAUD M. & CASTRIC J. (2006). Experimental transmission of sleeping disease in one-year-old rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by sleeping disease virus. *J. Fish Dis.*, **29**, 263–273.
- KONGTORP R.T., STENE A., ANDREASSEN P.A., ASPEHAUG V., GRAHAM D.A., LYGSTAD T.M., OLSEN A.B., OLSEN R.S., SANDBERG M., SANTI N., WALLACE C. & BRECK O. (2010). Lack of evidence for vertical transmission of SAV 3 using gametes of Atlantic salmon, *salmo salar* L., exposed by natural and experimental routes. *J. Fish Dis.*, **33**, 879–888.
- KRISTOFFERSEN A.B., VILJUGREIN H., KONGTORP R.T., BRUN E. & JANSEN P.A. (2009). Risk factors for pancreas disease (PD) outbreaks in farmed Atlantic salmon and rainbow trout in Norway during 2003–2007. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 127–136.
- LEWISCH, E., FRANK, T., SOLIMAN, H., SCHACHNER, O., FRIEDL, A., EL-MATBOULI, M., 2018. First confirmation of salmonid alphavirus infection in Arctic char *Salvelinus alpinus* and in Austria . *Diseases of Aquatic Organisms* **130**, 71–76.
- MCLOUGHLIN M.F. & GRAHAM D.A. (2007). Alphavirus infections in salmonids – a review. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00023-1>
- NORRIS A., FOYLE L., RATCLIFF J. (2008). Heritability of mortality in response to a natural pancreas disease (SPDV) challenge in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts on a West of Ireland sea site. *J. Fish Dis.*, **31**, 913–920.
- PETTERSON E., SANDBERG M. & SANTI N. (2009). Salmonid alphavirus associated with *Lepeoptheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **30**, 511–531.
- PETTERSON E., STORMOEN, M., EVENSEN O., MIKALSEN A.B. & HAUGLAND O. (2013). Natural infection of Atlantic salmon (*Salmon salar*) with salmonid alphavirus 3 generates numerous viral deletion mutants. *J. Gen. Virol.*, **94**, 1945–1954.

RODGER H. & MITCHELL S. (2007). Epidemiological observations of pancreas disease of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Ireland. *J. Fish Dis.*, **32**, 477–479.

RUANE N., GRAHAM D. & RODGER H. (2008). Pancreas disease in farmed salmon – health management and investigations at Irish farm sites 2005–2008. Marine Environments and Health Series, No. 34, Marine Institute. Available at <http://oar.marine.ie/handle/10793/267>

SNOW M., BLACK I., MCINTOSH R., BARETTO E., WALLACE I.S. & BRUNO D.W. (2010). Detection of salmonid alphavirus RNA in wild marine fish: implications for the origin of salmon pancreas disease in aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, **91**, 177–188.

STENE A., VILJUGREIN H., YNDESTAD H., TAVORNPANICH S. & SKJERVE E. (2013). Transmission dynamics of pancreas disease (PD) in a Norwegian fjord: aspects of water transport, contact networks and infection pressure among salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 123–134.

STENE A., BANG JENSEN B., KNUITSEN Ø., OLSEN A. & VILJUGREIN H. (2014). Seasonal increase in sea temperature triggers pancreas disease in Norwegian salmon farms. *J. Fish Dis.*, **37**, 739–751.

STENE A., HELLEBO A., VILJUGREIN H., SOLEVAG S.E., DEVOLD M. & ASPEHAUG V. (2016). Liquid fat, a potential abiotic vector for horizontal transmission of salmonid alphavirus? *J. Fish Dis.*, **39**, 531-537.

STORMOEN M., KRISTOFFERSEN A.B. & JANSEN P.A. (2013). Mortality related to pancreas disease in Norwegian farmed salmonid fish, *Salmo salar* L. and *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **36**, 639–645.

TAKSDAL T., BANG JENSEN B., BÖCKERMAN I., MCLOUGHLIN M.F., HJORTAAS M.J., RAMSTAD A. & SINDRE H. (2015). Mortality and weight loss of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., experimentally infected with salmonid alphavirus subtype 2 and subtype 3 isolates from Norway. *J. Fish Dis.*, **38**, 1047–1061. <https://doi.org/10.1111/jfd.12312>

TAKSDAL T., OLSEN A.B., BJERKAAS I., HJORTAAS M.J., DANNEVIG B.H., GRAHAM D.A. & MCLOUGHLIN M.F. (2007). Pancreas disease in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Norway. *J. Fish Dis.*, **30**, 545–558.

TAKSDAL T. & SINDRE H. (2016). Chapter 23 - Togaviruses of Fish. In: Aquaculture Virology. Eds: Kibenge, F. & Godoy, M. Academic Press, San Diego, pp. 357–364. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801573-5.00023-1> Paperback ISBN: 9780128015735, eBook ISBN: 9780128017548.

THE NORWEGIAN SCIENTIFIC COMMITTEE FOR FOOD SAFETY (VITENSKAPSKOMITEEN FOR MATTRYGGHET) (2010). Risikovurdering - stamfiskovervåking og vertikal smitteoverføring. **01**, 1-44. Available at:

<HTTPS://VKM.NO/DOWNLOAD/18.A665C1015C865CC85BDFC47/1500464589864/VURDERING%20AV%20SANNSYNLIGHET%20FOR%20OG%20RISIKO%20VED%20VERTIKAL%20OVERF%20C3%B8RING%20AV%20SMITTE.PDF>

TODD D., JEWHRUST V.A., WELSH M.D., BORGHMANS B.J., WESTON J.H., ROWLEY H.M., MACKIE D.P. & MCLOUGHLIN M.F. (2001). Production and characterisation of monoclonal antibodies to salmon pancreas disease virus. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 101–108.

VILJUGREIN H., STAALSTRØM A., MOLVÆR J., URKE H.A. & JANSEN P.A. (2009). Integration of hydrodynamics into a statistical mode on the spread of pancreas disease (PD) in salmon farming. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 35–44.

\*  
\* \*

**NB:** There is an OIE Reference Laboratory for infection with salmonid alphavirus (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list: <http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>). Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with salmonid alphavirus

[Retour à l'ordre du jour](#)

## SECTION 2.3.

## DISEASES OF FISH

## CHAPTER 2.3.0.

## 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 depends on the specific disease or pathogen, the size of the animals and the objective of testing (i.e. diagnosis of overt clinical disease, detection of fish that are subclinical ~~pathogen carriers~~ infection in apparently healthy animals or sampling for targeted surveillance to demonstrate freedom of from infection with a specified disease pathogen). See the ~~OIE Aquatic Animal Health Code Chapter 1.4 Aquatic animal health surveillance~~ for information on the design and evaluation of surveillance systems for aquatic animals and the individual disease chapters in the *Aquatic Manual* for specific details of sample requirements.

## 1.2. Specifications according to fish populations

For ~~specific~~ details of fish to sample requirements for a particular 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 OIE *Aquatic Code* Chapter 1.4.

Fish to be sampled are selected as follows:

- i) Susceptible species should be sampled proportionally or following risk-based criteria for targeted selection of lots or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. via untreated surface water, wild harvest or replacement with stocks of unknown disease status).
- ii) 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 (not decomposed) fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the fish selected should include apparently healthy fish collected in such a way that all parts of the farm, as well as all year classes, are proportionally represented in the sample.

## 1.3. Specifications according to clinical status

For diagnosis of clinical infection for most OIE-listed viruses, appropriate organs to sample include anterior/mid kidney, spleen and either heart or encephalon; for fry whole fish or entire viscera may be used. For koi herpesvirus, gill and gut should be sampled; for epizootic ulcerative syndrome, skin or muscle; and for *Gyrodactylus salaris*, whole fish or skin and fins should be examined. Disease-specific recommendations are provided in Section 3.2 Selection of organs or tissues of the individual chapters. Samples from five to ten clinically diseased fish consistent with the disease of interest should be sufficient for the pathogen test(s) for each epidemiological unit.

For the appropriate organs to sample to detecting subclinical infections carriers of virus and or for targeted surveillance for case detection or disease freedom, refer to individual disease chapters of the *Aquatic Manual* and chapter 1.4 of the OIE *Aquatic Code* where a large number of samples is required, samples may be combined in pools as specified in each individual disease chapter of the *Aquatic Manual*.

## 1.4. Specifications according to fish size

### 1.4.1. For the listed viral diseases except infection with koi herpesvirus disease and viral encephalopathy and retinopathy

*Fry and yolk sac fry*: Sample the entire fish but remove the yolk sac if present.

*Fish 4 to 6 cm*: Sample the entire viscera including and the kidney. A piece of encephalon can be obtained after severing the head at the level of the rear edge of the operculum and pressing it laterally.

*Fish over 6 cm*: Sample the kidney, spleen, and heart or encephalon and/or other tissues appropriate for the specific pathogen being tested for (see individual disease chapter in the *Aquatic Manual* for details).

Adult fish-Non-lethal sampling: Sample tissues appropriate for the specific pathogen being tested for (see the specific disease chapter in the *Aquatic Manual* for details). For non-lethal sampling, appropriate sample types are recommended in Section 3.4 of the specific disease chapter. Take the ovarian fluid, milt or tissues appropriate for the specific pathogen being tested for (see individual disease chapter in the *Aquatic Manual* for details).

### 1.4.2. For infection with Aphanomyces invadans (epizootic ulcerative syndrome [EUS])

Any size of fish: kidney, liver, muscular tissue (See Chapter 2.3.2 Infection with *Aphanomyces invadans* [epizootic ulcerative syndrome] for specific details).

### 1.4.3. For infection with Gyrodactylus salaris

Any size of fish: skin and fins (See Chapter 2.3.3 Infection with *Gyrodactylus salaris* for specific details).

### 1.4.4. For Koi herpesvirus (KHV)

Fish 4 cm to adult: Take the gill, kidney, spleen, encephalon and gut tissues depending on test to be used (See Chapter 2.3.7 Infection with koi herpesvirus disease for specific details).

### 1.4.5. For viral encephalopathy and retinopathy (VER)

Fish 2-4 cm: take the whole head.

Fish 4 cm to adults: take the encephalon and possibly the eyes and spinal cord (see Chapter 2.3.12 Viral encephalopathy and retinopathy for specific details).

## 2. General processing of samples

### 2.1. Macroscopic examination

For the listed diseases, macroscopic examination is mostly used for detecting clinical signs of epizootic ulcerative syndrome-infection with *Aphanomyces invadans* or *Gyrodactylus salaris*, but this is followed by microscopic examination of histological slides for the former or by identification of parasites removed isolated from of wet mounts of skin/fin scrapings the skin, fins or gills of fish for the latter.

For viral diseases, clinical signs (including increased mortality rate, surface discolouration, distended abdomen, excess mucous production, exophthalmia, pale gills/anaemia, skin/fin/gill lesions, surface haemorrhages, lethargy, abnormal swimming behaviour and inappetence) and increasing mortality rates are non-specific.



## 2.2. Preservation of samples for subsequent virological examination

Samples to be submitted are either (i) fresh and chilled on ice or in vials containing cell culture medium for virus isolation, (ii) fixed in a nucleic acid stabilisation solution (e.g. RNAlater-RNA preservative or 80–90% ethanol) for polymerase chain reaction (PCR) detection and/or (iii) preserved in 4–10% neutral-buffered formalin fixative for histology and *in-situ* hybridisation. See individual sections below for further details. See the individual disease chapters in the *Aquatic Manual* for specific details of preservation requirements for other types of tests.

## 2.3. Virological examination

### 2.3.1. Transportation and antibiotic treatment of samples

Individual or pools of whole fish, organs or secretions—Pools of organs or of ovarian fluids/milt are placed in sterile vials and stored at 4°C or on ice until virus extraction isolation is performed in the laboratory. Virus extraction isolation should optimally be carried out within 24 hours after fish sampling, but is still acceptable for up to 48 hours if the storage temperature is maintained at 0–4°C, or for longer periods for clinical disease samples held frozen at –80°C. Freezing at –20°C for storage should be avoided. For testing of apparently healthy fish, freezing of samples (at any temperature) for testing for subclinical carriers should be avoided.

Organ samples may also be transported to the laboratory by placing them in vials containing cell culture medium or Hanks' balanced salt solution (HBSS) with added antibiotics to suppress the growth of bacterial contaminants (one volume of organ in at least five volumes of transportation fluid). Suitable antibiotic concentrations are: gentamycin (1000 µg ml<sup>-1</sup>), or penicillin (800 International Units [IU] ml<sup>-1</sup>) and streptomycin (800 µg ml<sup>-1</sup>). Antifungal compounds, such as Mycostatin® or Fungizone®, may also be incorporated into the transport medium at a final concentration of 400 IU ml<sup>-1</sup>. Serum or albumen (5–10%) may be added to stabilise the virus if the transport time will exceed 12 hours.

### 2.3.2. Virus isolation extraction

This procedure should be conducted below 15°C (preferably between 0 and 10°C). This can be achieved by using mortars and pestles that have been stored at –20°C or homogenising tissues quickly in a Stomacher or in tubes held in an ice slurry.

1. Decant antibiotic-supplemented medium from the organ sample.
2. Homogenise organ pools (minimum weight of 0.5 g) in transport medium at a final dilution of 1/10 using a suitable method (e.g. mortar and pestle, glass or electronic homogeniser, Stomacher or validated equivalent electric homogeniser) until a paste is obtained and dilute 1/10 (w/v) with transport medium.
3. Centrifuge the homogenate in a refrigerated (2–5°C) centrifuge at 2–5°C at 2000–4000 g for 15 minutes, collect the supernatant and treat for either four hours at 15°C or overnight at 4°C with antibiotics, e.g. gentamicin 1 mg ml<sup>-1</sup>. If shipment of the sample has been made in a transport medium (i.e. with exposure to antibiotics) the treatment of the supernatant with antibiotics may be omitted. The antibiotic treatment makes filtration through membrane filters unnecessary. Alternatively, if gross microbial contamination is suspected, the supernatant can be membrane-filtered (0.45 µm) understanding that there may be some loss of virus.
4. Likewise, ovarian fluid/milt samples may be treated with antibiotics to control microbial contamination but should not be diluted more than fivefold in the HBSS and antibiotic medium.
5. Ovarian fluid/milt samples should be centrifuged in the same way as organ homogenates, and their supernatants used directly in subsequent steps.
6. Prepared tissue/ovarian fluids/milt supernatants are used for inoculation of cell cultures for virus isolation and an aliquot may also be used for pre-screening by other tests, for example, PCR.
7. It is recommended to aliquot the homogenised sample material to avoid repeated freeze-thawing of the material. This also ensures reproducibility and comparability of the results.

### 2.3.3. Treatment to neutralise enzootic viruses

Fish are often subclinically infected with ~~enzootic endemic~~ viruses, such as birnaviruses (e.g. infectious pancreatic necrosis virus [IPNV]), which induce a cytopathic effect in susceptible cell cultures and thus complicate isolation and identification of target pathogens. In such situations, the infectivity of the enzootic viruses should be neutralised, where possible, before testing for the viruses listed in the *Aquatic Code*. However, when it is important to determine whether one of the enzootic viruses is present, samples should be tested with and without the presence of neutralising antibodies (NABs).

To neutralise aquatic birnaviruses, mix equal volumes (200 µl) of a solution of one or more NABs against the ~~indigenous enzootic~~ birnavirus serotypes with the supernatant to be tested. Allow the mixture to react for 1 hour at 15°C or overnight at 4°C prior to inoculation on to susceptible cell monolayers. The titre of the NAB solution used should be at least 2000 in a 50% plaque reduction test versus the viral serotypes present in the given geographical area.

When samples are from a country, region, fish population or production unit considered to be free from enzootic viral infections, the NAB treatment of the organ homogenate supernatant may ~~should~~ be omitted.

This approach can also be used to neutralise other viruses enzootic to the area ~~being tested from where the~~ samples were taken.

### 2.4. Parasitic examination

See Chapter 2.3.3 Infection with *Gyrodactylus salaris* for specific details.

### 2.5. Fungal examination

See Chapter 2.3.2 Infection with *Aphanomyces invadans* for specific details.

## B. MATERIALS AND BIOLOGICAL PRODUCTS REQUIRED FOR THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FISH PATHOGENS

### 1. Fish viruses

#### 1.1. Fish cell lines

The following fish cell lines are used to test for the viral fish pathogens referred to in the *Aquatic Manual*:

*Epithelioma papulosum cyprini* (EPC)

Bluegill fry (BF-2)

Fathead minnow (FHM)

Rainbow trout gonad (RTG-2)

Chinook salmon embryo (CHSE-214)

Salmon head kidney (SHK-1)

Atlantic salmon kidney (ASK)

Chum salmon heart (CHH-1)

Grunt fin (GF)

Koi fin (KF-1)

Common carp *Cyprinus carpio* brain (CCB)

Striped snakehead (SSN-1)

Grass carp ovary cell lines (GCO)

## 1.2. Culture media

Traditional Eagle's minimal essential medium (MEM) with Earle's salt supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), antimicrobial agents and 2 mM L-glutamine is the most widely used medium for fish cell culture.

Stoker's medium, however, which is a modified form of the above medium comprising a double-strength concentration of certain amino acids and vitamins, is ~~particularly~~ recommended particularly to enhance cell growth, using the same supplements as above + 10% tryptose phosphate.

These media are buffered with either sodium bicarbonate, 0.16 M tris-hydroxymethyl aminomethane (Tris) HCl, or, preferably, 0.02 M N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES). The use of sodium bicarbonate alone is restricted to those cell cultures made in tightly closed cell culture vessels or cultures incubated in an atmosphere supplemented with CO<sub>2</sub> to maintain the desired pH (7.3–7.6). As an alternative, MEM with Hanks' salts can be used in both closed cell culture flasks and 24-well or 96-well culture plates without the addition of other buffer salts.

Alternatively, Leibovitz medium (L15) supplemented with FBS (5% or 10%), L-glutamine (4 mM) and gentamicin (50 µg ml<sup>-1</sup>) is recommended for some cell lines, e.g. SHK-1 ~~and SSN-1~~.

For cell growth, the FBS content of the medium is usually 10%, whereas for virus isolation or virus production it may be reduced to 2%. ~~Similarly, the pH of the culture medium for cell growth is 7.3–7.4 and is adjusted to 7.6 for virus production or virus assay.~~

The composition of the most frequently used antimicrobial agent mixture is penicillin (100 IU ml<sup>-1</sup>) and dihydrostreptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>). Add mycostatin (50 IU ml<sup>-1</sup>) if fungal contamination is likely. Other concentrations or other antimicrobial agents may be used as convenient for the operator depending on the antimicrobial sensitivity of the bacterial or fungal strains encountered.

## 1.3. Virus positive controls and antigen preparation

### 1.3.1. ~~Virus nomenclature~~

~~Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)~~

~~Infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)~~

~~Infectious salmon anaemia virus (ISAV)~~

~~Koi herpesvirus (KHV)~~

~~*Oncorhynchus masou* virus (OMV)~~

~~Red sea bream iridovirus (RSIV)~~

~~Salmonid alphavirus (SAV)~~

~~Spring viraemia of carp virus (SVCV)~~

~~Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)~~

~~Viral encephalopathy and retinopathy virus (VERV) also known as viral nervous necrosis virus (VNNV)~~

### 1.3.1. Virus production

For the *in-vitro* production of stock cultures of most of these viruses, monolayer cultures of susceptible cells (see relevant sections in the *Aquatic Manual*) in suitable tissue culture vessels (e.g. plastic flasks) should be inoculated with fairly low multiplicities of infection (m.o.i.), i.e. 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-3</sup> plaque-forming units (PFU) per cell or equivalent.

The preferred temperatures for virus propagation are included in the table below.

~~15°C for IHNV, ISAV, OMV, and VERV (genotype BFNNV) and VHSV~~

~~20°C for KHV SVCV and VERV (genotypes BFNNV, SJNNV and TPNNV)~~

22°C for EHNV

25°C for RSIV and VERV (genotypes RGNNV and SJNNV)

30°C for VERV (genotype RGNNV)

<u>Temperature</u>	<u>Virus</u>
<u>15°C</u>	<u>infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV)</u> <u>infectious salmon anaemia virus (ISAV)</u> <u>salmonid alphavirus (SAV)</u> <u>viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)</u>
<u>20°C</u>	<u>koi herpesvirus (KHV)</u> <u>spring viraemia of carp virus (SVCV)</u>
<u>22°C</u>	<u>epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)</u>
<u>25°C</u>	<u>red sea bream iridovirus (RSIV)</u>

### 1.3.2. Preservation and storage of virus stock cultures

1. Centrifuge infected cell cultures at 2–5°C and 2000–4000 **g** for 15 minutes then dilute the virus-containing supernatants in order to obtain virus titres averaging 10<sup>6</sup> PFU ml<sup>-1</sup> or equivalent.
2. Dispense the resulting viral suspensions into sterile vials at volumes of 0.3–0.5 ml each.
3. Freeze and store each series of standard virus stocks at –80°C or in liquid nitrogen vapour phase, and check the titre of each virus stock at regular intervals (6–12 months) if it has not been used during that time period.

*Lyophilisation*: long-term storage (decades) of ~~the seeds of~~ standard virus seed strains is achievable by lyophilisation. For this purpose, viral suspensions in cell culture medium supplemented with 10% ~~fetal calf serum~~ FBS are mixed (v/v) with an equal volume of cryopreservative medium (such as 20% lactalbumin hydrolysate in distilled water) before processing. Seal or plug under vacuum and store at 4°C, in the dark.

At least every 6 months or if decreased cell susceptibility is suspected, titration of reference isolates is performed to verify cell line susceptibility to infection.

## 2. Techniques

### 2.1. Serology

#### 2.1.1. ~~Production of rabbit antisera and polyclonal antibodies to fish viruses~~

~~There are various ways in which antibodies against fish viruses can be raised in rabbits. Titre and specificity are influenced, however, by the inoculation programme used. The following immunisation protocols may be used to produce antisera for use in the virus isolation and/or identification procedures described later.~~

##### 2.1.1.1. ~~Antisera to infectious pancreatic necrosis virus~~

~~Intravenous injection with 50–100 µg of purified virus on day 0, followed by an identical booster on day 21, and bleeding 5–7 days later. Rabbits may be reused if not bled completely.~~

##### 2.1.1.2. ~~Antisera to other viruses~~

~~The immunisation protocols alternate an intramuscular or intradermal injection with further intravenous boosters:~~

Day 0: primary injection, 500–1000 µg of purified virus is mixed (v/v) with adjuvant (Freund's incomplete or other<sup>12</sup> adjuvants that are considered more acceptable) giving a total volume of 1.2 ml. This antigen is delivered to the rabbit as multipoint intradermal injections (2 points on each side) after the animal has been shaved.

Day 21: collect about 2 ml of blood and check for reactivity (neutralisation, fluorescence); boost intravenously with the same amount of purified virus as in the primary injection, but without adjuvant. Prior to the intravenous booster injection, the rabbit should be treated with promethazine (12 mg intramuscularly) to prevent a possible anaphylactic response.

Day 28: sample the blood, check the serum reactivity and bleed or boost according to the results.

For rhabdoviruses, this immunisation procedure is well suited to production of antisera to be used in immunofluorescence and in the enzyme-linked immunosorbent assay. However, a more efficient method for production of neutralising antisera is regular intravenous injection without adjuvant (0.2 ml) every 3–4 days (twice a week). As many as 15 injections may be necessary; 1 week after the last injection, a serum sample should be collected and tested.

### 2.1.3. Processing and storage of immune sera

After blood clotting, collect and centrifuge the serum at 20°C and heat it for 30 minutes at 56°C. Filter the resulting heat-inactivated serum through a membrane filter (450 nm pore size) and temporarily store it at 4°C for the time necessary for the screening of its reactivity and specificity and for checking that these properties are not affected by preservation conditions (e.g. freezing or lyophilisation). Sterile rabbit sera can be kept for at least 2 months at 4°C without any change in their properties. Dispense (usually as small volumes) and freeze at –20°C or lyophilise.

Immunoglobulins (Ig) may be extracted from antisera using conventional methods suitable for Ig purification. Selective attachment to protein A constitutes a reliable and effective method. The concentration of Ig solutions is adjusted to the values required for further conjugate preparation or storage.

*Preservation of Ig:* Mix a solution of Ig of concentration 2 mg litre<sup>-1</sup> with sterile pure glycerol (v/v) and keep at –20°C. Solutions of Ig with a higher concentration may also be prepared in glycerol.

### 2.1.4. Mouse monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies (MAbs) to most of the fish viruses have been raised over the past years. Some of them, singly or as two or three associated MAbs, have given rise to biological reagents suitable for the identification of virus groups (IPN, VHS, IHNV). Other MAbs, taken individually or as components of Ab panels, allow accurate typing of VHSV and IHNV. These MAbs can be obtained from the Reference Laboratories listed at the end of this *Aquatic Manual*.

In theory, mouse monoclonal IgGs can be processed and stored as for polyclonal IgGs. However, the reactivity of certain MAbs may be impaired by processes such as enzymatic or radio-labelling or lyophilisation. It is thus necessary to test various MAbs for the conditions under which they will be used.

## 2.1. Direct microscopy

Samples for direct microscopic examination of smears or tissue imprints should be examined as soon as possible after collection. Live specimens should be used whenever possible, or fresh specimens chilled at 4°C, or 10% neutral-buffered formalin-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. For *G. salaris*, fresh specimens are examined or fish can be stored in ethanol prior to microscopic examination (see Chapter 2.3.3 Infection with *G. salaris*).

<sup>12</sup> Use of Freund's complete adjuvants may be restricted on animal welfare grounds. Alternative synthetic adjuvants include trehalose dimycolate and monophosphate lipid A.

## 2.2. Histological techniques

### 2.2.1 Preparation of slides for histological examination

#### **2.3.1. Tissue fixation and embedding**

Only live or moribund specimens of fish with clinical lesions should be sampled **after humane euthanasia** for histology. The removed tissues (<5 mm thick) should be fixed immediately in 10% neutral-buffered formalin. Use at least ten volumes of fixative for each volume of tissue sample and allow to fix for at least 24 hours. After removal from the fixative, tissue samples are then dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in a wax-miscible agent such as xylene and then embedded in paraffin using standard protocols. Cut sections of approximately 3–5 µm thickness from the block. Mount each section on a glass slide, de-wax in a wax-miscible agent, such as xylene or 'Clearene®', and rehydrate. For most disease examinations, the sections can then be stained with haematoxylin and eosin (H&E) using standard procedures (Slaoui & Fiette, 2011). For observing granulomas and fungal hyphae as occur in infection with *A. invadans*, a general fungal stain such as Grocott–Gomori may be used instead of H&E.

#### **2.3.2. Tissue sectioning and staining**

Cut sections of approximately 5 µm thickness from the block. Mount each section on a glass slide, de-wax in a wax-miscible agent, such as xylene or 'Clearene®', and rehydrate.

For most disease examinations, the sections can then be stained with haematoxylin and eosin (H&E), by the following procedure:

##### **Taking the slides to water**

1. — Place slides in xylene or 'Clearene®' to remove wax for a minimum of 2 minutes.
2. — Repeat step 1 in fresh xylene or 'Clearene®'.
3. — Place in 100% alcohol to remove the solvent for a minimum of 2 minutes.
4. — Repeat step 3 in fresh 100% alcohol.

##### **Staining**

5. — Wash in running tap water (RTW) for 2–5 minutes. Slides should be clear, not cloudy.
6. — Place in haematoxylin solution for 3 minutes
7. — Turn blue in RTW for 5–10 minutes (or saturated lithium carbonate); cannot over blue.
8. — Dip in acid/alcohol for a maximum of 10 seconds.
9. — Rinse in RTW (or lithium carbonate) until blue.
10. — Microscope check for clear cytoplasm and blue nuclei.
11. — Aqueous eosin for 3 minutes.
12. — Good wash in RTW to differentiate eosin.

##### **Dehydration, clearing and mounting**

13. — Rinse well in 70% alcohol but not for too long as it removes eosin.
14. — Place in 100% alcohol for 1–2 minutes.
15. — Repeat step 14 in fresh alcohol.
16. — Place in 50/50 alcohol/Clearene for 1–2 minutes.
17. — Place into Clearene.
18. — Repeat with fresh Clearene bath, slides should be clear.
19. — Mount in DPX (distyrene, plasticizer, and xylene) mountant and leave to dry.

For observing granulomas and fungal hyphae as occur in epizootic ulcerative syndrome, a general fungal stain such as Grocott-Gomori may be used instead of H&E.

### 2.2.2. Preparation of slides for immunohistochemistry

It is important to note that prolonged fixation can mask antigens of interest. Therefore, it is recommended keeping fixation to a minimum whilst still achieving optimal preservation (24–48 hours). This can be reduced further when using small pieces of tissue. Nonetheless, it is recommended to incorporate an antigen retrieval step (included within the protocol below) where possible (Kim *et al.*, 2016). The following outlines a standard immunohistochemistry protocol routinely used in histology laboratories, but Due to variations that may exist between antibodies and commercially available detection kits, it is probable that individuals will need to optimise the technique for their own purposes. This will include factors such as determination of optimal optimum antibody titre. This is the highest dilution that results in the most intense specific staining whilst achieving the least non-specific “background” staining. In addition, individuals may need to consider amending the duration of reagent incubation.

1. ~~Carry out steps 1–5 of Section 2.3.2.~~
2. ~~Rinse slides in two changes of 0.2% Tween 20 in PBS for 2 minutes.~~
3. ~~Perform antigen retrieval by placing slides into plastic coplin jar containing Sodium citrate buffer and place on steamer rack situated inside pressure cooker.~~
4. ~~Place cooker on high heat until full pressure is reach indicated by “rocking” of vent.~~
5. ~~Reduce temperature and leave on hotplate for approximately 10 minutes whilst maintaining pressure.~~
6. ~~Remove from hotplate and allow cooker to cool and vent for approximately 20–30 minutes in a fume hood prior to opening.~~
7. ~~Remove coplin jar from pressure cooker and replace Sodium citrate buffer with warm tap water followed by cool tap water and distilled water. This is to cool the slides gradually.~~
8. ~~If required, carry out blocking of endogenous biotin/avidin activity (a) incubate slides for 15–20 minutes in 0.005% avidin in PBS (b) rinse in PBS followed by (c) incubation in 0.005% biotin in PBS for 15–20 minutes. Alternatively, employ the use of a commercially available blocking system in accordance to manufacturer guidelines. This is usually undertaken on tissues containing high levels of biotin such as liver, kidney and spleen.~~
9. ~~Briefly rinse slides in tap water.~~
10. ~~Rinse slides in 0.2% Tween 20 in PBS for 2 minutes.~~
11. ~~Tip off reagent and blot dry around tissue section ensuring section is kept moist.~~
12. ~~Incubate with primary antibody at 25°C for 30 minutes with gentle orbital rotation if available.~~
13. ~~Rinse slides in 0.2% Tween 20 in PBS from a wash bottle.~~
14. ~~Tip off reagent and blot dry around tissue section ensuring section is kept moist.~~
15. ~~Incubate with biotinylated secondary antibody at 25°C for 10 minutes with gentle orbital rotation if available.~~
16. ~~Rinse slides in 0.2% Tween 20 in PBS from a wash bottle.~~
17. ~~Quench endogenous peroxidase activity by placing slides into 0.3% Hydrogen peroxide in PBS with 0.1% Sodium azide for 10–15 minutes at room temperature.~~
18. ~~Rinse slides in 0.2% Tween 20 in PBS from a wash bottle.~~
19. ~~Incubate with preferred commercially available peroxidase-labelled streptavidin detection complex at 25°C for 10 minutes with gentle orbital rotation if available.~~
20. ~~Rinse slides in 0.2% Tween 20 in PBS from a wash bottle.~~
21. ~~Apply DAB chromogen to slides and develop reaction product by monitoring under microscope for optimum time. Duration will vary depending on DAB product used.~~
22. ~~Stop reaction by placing slides into tap water.~~

23. Perform chromogenic enhancement (optional) by placing slides into 0.5% Copper sulfate in PBS for 1–5 minutes at 25°C with gentle orbital rotation.
24. Rinse in distilled water.
25. Counterstain with Harris's haemotoxylin for 2–3 minutes.
26. Rinse with water.
27. Dehydrate, clear and mount.

#### *Reagent preparation*

PBS-Tween 20 (0.2%):	Phosphate-buffered saline	10 litres
	Tween 20	2 ml
Sodium citrate buffer:	Tri-sodium citrate (dihydrate)	2.94g
	Distilled water	1 litre
	Tween 20	0.5 ml

Mix to dissolve, adjust pH to 6.0 with 1 N HCl before adding Tween 20. Store this solution at room temperature for 3 months or at 4°C for longer storage.

## 2.3. Electron microscopy

Electron microscopy (transmission or scanning) is a valuable research tool for the study of aquatic animal diseases (e.g. Hyatt *et al.*, 1991) and for the detection of previously unknown viruses for which there are no specific diagnostic tests. However, these methods are not normally used for the routine diagnosis of the fish diseases listed by the OIE so are not described in the *Aquatic Manual*.

## 2.4. Virus isolation

### 2.4.1. Introduction

For most viruses, the standard surveillance method (to detect subclinical carriers) is virus isolation in cell culture followed by identification of the virus using either antibody-based or, more commonly, nucleic acid-based (PCR) methods can be employed in the diagnosis of clinically affected animals or in the surveillance of apparently healthy animals. Isolation of finfish viruses in cultures of a number of established fish cell lines is well-documented (Crane *et al.*, 2005; Devold *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2008; Herath *et al.*, 2009; Lorenzen *et al.*, 1999; Olesen & Vestergård Jørgensen, 1992). However for some viruses, such as While inoculation of fish cell lines with fish tissues processed for virus isolation is considered the reference standard for surveillance programmes with respect to sensitivity, the precise sensitivity of the procedure is unknown. Moreover KHV, cell culture isolation is not as sensitive as the published PCR-based methods and is not considered to be a reliable reproducible diagnostic method for KHV (Haenen *et al.*, 2004). Indeed, real-time or conventional PCR methods and sequencing are, in general, highly sensitive and highly specific and, following adequate validation, can be used for direct detection of viral nucleic acids in samples prepared from fish tissue. The technique has the potential to be used in direct surveillance programmes for obtaining approved free status (e.g. Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2013). Duplicates of unfixed samples testing positive using real-time or conventional PCR methods and sequencing can be processed for virus isolation to confirm presence of infectious virus. At least every 6 months or if decreased cell susceptibility is suspected, titration of frozen viral stocks is performed to verify cell line susceptibility to infection.

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend heavily on the quality of samples (level of autolysis of fish samples, time since collection, time and temperature in storage). Fresh specimens should be kept on ice and preferably sent to the laboratory within 24 hours of collection. Alternative storage methods should be used only after consultation with the receiving laboratory.

Before transfer to the laboratory, pieces of the organs to be examined for virus isolation should be removed from the fish with sterile dissection tools and transferred to sterile plastic tubes containing at least 4 ml transport medium, i.e. cell culture medium with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. The



combination of 200 International Units (IU) penicillin, 200 µg streptomycin, and 200 µg kanamycin per ml are recommended, although other antibiotics of proven efficiency may also be used. The tissue in each sample should be larger than the analytical unit size required for initial laboratory testing (e.g. between 0.5 and 2 g). To prepare duplicates (for retesting) it is recommended to aliquot the organ material after homogenisation.

Tubes containing fish tissues in transport medium for cell cultivation should be placed in insulated containers, such as thick-walled polystyrene boxes, together with sufficient ice or an alternative cooling medium with the similar cooling effect to ensure chilling of the samples during transportation to the laboratory. However, freezing of the samples should be avoided. The temperature of a sample during transit must never exceed 10°C, and ice must still be present in the transport box at receipt or at least one freeze block—must still be partly or completely frozen.

Whole fish may be sent to the laboratory if the temperature requirements referred to in the first paragraph during transportation can be fulfilled. Whole fish should be wrapped up in paper with absorptive capacity and enclosed in a plastic bag. Live fish may also be transported to the laboratory. All packaging and labelling must be performed in accordance with current national and international transport regulations, as appropriate.

The virological examination for isolation in cell culture should be started as soon as possible and no later than 48 hours after the collection of the samples. In exceptional cases, the virological examination may be started at the latest within 72 hours after the collection of the material, provided that the material to be examined is protected by a transport medium and that the temperature requirements during transportation can be fulfilled.

See the individual disease chapters in the *Aquatic Manual* for specific details of virus isolation requirements.

#### **2.4.2. Inoculation of cell monolayers**

Cell cultures to be used for inoculation with tissue material should be young (4–48 hours old) and actively growing (not confluent) at inoculation.

Prepared tissue samples (see Section A. *Sampling* above) are inoculated onto cell cultures in at least two dilutions, i.e. the primary dilution and a 1/10 dilution thereof, resulting in final dilutions of tissue material in cell culture medium of 1/100 and 1/1000, respectively (to prevent homologous interference). ~~The ratio between inoculum size and volume of cell culture medium should be about 1:10.~~ For each dilution and each cell line, a minimum of about 2 cm<sup>2</sup> cell area, corresponding to one well in a 24-well cell culture plate, has to be used. Use of 24-well cell culture plates is recommended, but other units of a similar or larger growth area are also acceptable.

#### **2.4.3. Incubation of cell cultures**

Inoculated cell cultures are incubated at the pathogen-specific temperature for 7–14 days. If the colour of the cell culture medium changes from red to yellow indicating medium acidification, pH adjustment with sterile bicarbonate solution, or equivalent substances, has to be performed to ensure cell susceptibility to virus infection.

#### **2.4.4. Microscopy**

Using ×40–150 magnification, inoculated cell cultures must be inspected regularly (at least ~~three~~ **two** times a week) for the occurrence of cytopathic effect (CPE). The use of a phase-contrast microscope is recommended. If obvious CPE is observed, virus identification procedures must be initiated immediately.

#### **2.4.5. Sub-cultivation**

If no CPE has developed after the primary incubation for 7–14 days, sub-cultivation is performed with fresh cell cultures using a cell area similar to that of the primary culture.

Aliquots of medium (supernatant) from all cultures/wells constituting the primary culture are pooled according to the cell line 7–14 days after inoculation. The pools are then inoculated onto homologous cell cultures undiluted and diluted 1/10 (resulting in final dilutions of 1/10 and 1/100, respectively, of the supernatant) as described above (Section B.2.4.2 *Inoculation of cell monolayers*). For SAV, and other non- or slow CPE-forming viruses that are cell-bound, it is recommended that a freeze–thaw cycle or sonication step be included prior to passage.

Alternatively, aliquots of 10% of the medium constituting the primary culture are inoculated directly into a well with a fresh cell culture (well-to-well sub-cultivation). In the case of salmonid samples, inoculation may be preceded by preincubation of the dilutions with an anti-IPNV antiserum at an appropriate dilution, as described above (see Section A.2.3.3 *Treatment to neutralise enzootic viruses*). The inoculated cultures are then incubated for 7–14 days at the appropriate temperature, with observation, as described above (see Section B.2.4.4 *Microscopy*).

If nonspecific cytotoxicity occurs within the first 3 days of incubation, sub-cultivation may be performed at that stage, but the cells must then be incubated for 7 days and sub-cultivated again with a further 7 days of incubation. When nonspecific cytotoxicity develops after 3 days, the cells may be passed once and incubated to achieve a total of 14 days from the primary inoculation. There should be no evidence of toxicity in the final 7 days of incubation.

If bacterial contamination occurs despite treatment with antibiotics, sub-cultivation must be preceded by centrifugation at 2000–4000 g for 15–30 minutes at 2–5°C, or filtration of the supernatant through a 0.45 µm filter (low protein-binding membrane). In addition to this, sub-cultivation procedures are the same as for nonspecific cytotoxicity.

If no CPE occurs, the test may be declared negative, however, increased confidence of a negative result can be achieved by testing for the presence of virus using antibody based or nucleic acid based (PCR) methods. For SAV2/SAV3 no apparent CPE is common from field isolates. An IFAT for the detection of SAV antigen is routinely performed.

Where practical difficulties arise (e.g. incubator breakdown, problems with cell cultures, etc.) that make making it impossible to inoculate cells within 48 hours of collection of the tissue samples after tissue sampling, it is acceptable possible to freeze-store the supernatants at –80°C and carry out virological examination within 14 days. If the collected Once supernatants is are stored at –80°C, thawing is recommended only once within 48 hours of sampling it may be reused only once for virological examination. Another freeze-thaw cycle will substantially reduce virus titres. It is recommended to aliquot the homogenised sample material to avoid repeated freeze-thawing of the material. This also ensures reproducibility and comparability of the results.

#### **2.4.6. Virus identification**

Infected cell cultures are used for virus identification by IFAT. Supernatant from cultures demonstrating CPE is used for virus identification by either antibody based and/or nucleic acid based techniques. The preferred method for confirmatory identification is by sequence analysis of PCR amplicons (see *Aquatic Manual* chapters on individual pathogens for details).

### **2.5. Use of molecular techniques for surveillance testing, confirmatory testing and diagnosis**

Molecular techniques, including the use of nucleic acid probes for *in-situ* hybridisation, conventional and the polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR, have been developed for the identification of many pathogens of aquatic animals. However, as is the case with several other diagnostic techniques, an advantage in sensitivity is frequently offset by problems in interpretation or susceptibility to technical problems. 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 from fish tissue. The technique 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 (e.g. Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2013). Duplicates of unfixed samples testing positive using real-time PCR can be processed for virus isolation to confirm presence of infectious virus.

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. PCR can be quite dependent on the conditions under which it is run and can be highly subject to laboratory contamination by previous PCR products, yielding false positive results. Nevertheless, Real-time PCR is a powerful technique particularly for analysing relatively high numbers of samples (e.g. for surveillance) via high-throughput testing. Thus, while several nucleic acid probe and PCR protocols are included in this version of the *Aquatic Manual* as screening, diagnostic or confirmatory methods for fish, where possible well established techniques (e.g. virus isolation) are should and can be undertaken as specified as the standard screening methods. However, following PCR-positive results, where possible, virus isolation should be undertaken to confirm the presence of infectious virus. Conventional PCR with sequencing of PCR products should be used for confirmation of the cultured pathogen identity. Whenever these newer molecular techniques are used, they should be performed with caution and with special attention to the inclusion of adequate positive and negative controls.

As with all PCR protocols, optimisation may be necessary depending on the reagents, equipment and the plasticware. 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. Therefore, each assay and tissue extraction should include a negative control to rule out contamination. False-negative results (positive samples giving a negative result), may lead to unwanted transmission of pathogens and biosecurity failure.

To minimise the risk of contamination, aerosol-preventing pipette tips should be used for all sample and PCR preparation steps. Additionally, all PCRs should be prepared in a clean area that is separate from the area where the 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 and paper (e.g. workbooks). Also, ensure all work-tops and air-flow 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 from the molecular biology laboratory and reagents.

### 2.5.1. Sample preparation and types

For these techniques, Samples should be prepared to preserve the nucleic acid of the pathogen. ~~Likewise,~~ samples intended for testing with antibody-based methods should be preserved to retain the reactive antigenic sites for the antibodies used. ~~Samples selected for nucleic acid-based or antibody-based diagnostic tests 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. To prevent contamination, new disposable containers (plastic sample bags or bottles) should be used. 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:

- *Live iced specimens or chilled specimens:* For specimens that can be rapidly transported to the laboratory for testing within 24 hours, pack samples in sample bags surrounded by an adequate quantity of wet ice packs ~~around the bagged samples or ice bricks~~ in an insulated box and ship to the laboratory.
- *Frozen whole specimens:* Select live specimens according to the purpose of sampling, ethanase fish humanely and quick-freeze in the field using crushed dry-ice, or freeze in a field laboratory using a mechanical freezer at  $-20^{\circ}\text{C}$  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. Freezing samples for histological analysis should be avoided.
- *Alcohol-preserved samples:* In regions where the storage and shipment of fresh ( $0-4^{\circ}\text{C}$ ) and frozen samples is problematic, 90–95–80–90% (v/v) ethanol (analytical grade) or RNAlater-RNA preservative should be used to preserve, store, and transport ~~certain types of~~ samples for PCR analysis. Pack for shipment according to the methods described above.
- *Fixed tissues for in-situ hybridisation and immunohistochemistry:* For this purpose, classic methods for preservation of the tissues are adequate. Neutral-buffered formalin is usually a good choice, ~~for later use of molecular probes.~~ For DNA, specifically, over-Fixation for (over 24–48 hours) should be avoided; samples should be transferred to ethanol following the formalin treatment.

### 2.5.2. Preservation of RNA and DNA in tissues

Tissue is cut to be less than 0.5 cm in one dimension and submerged in 10 volumes of a suitable nucleic acid preservative (e.g. a 0.5 g sample requires about 5 ml of RNAlater-RNA preservative or 80–90% ethanol). Smaller organs such as kidney, liver and spleen can be stored whole in RNAlater-RNA preservative or 80–90% ethanol. ~~These~~ Samples preserved in this way can be stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for 1 month, at  $25^{\circ}\text{C}$  for 1 week or indefinitely at  $-20^{\circ}\text{C}$  or below. ~~Archive RNAlater-treated tissues at  $-20^{\circ}\text{C}$  or below.~~

### 2.5.3. DNA-Nucleic acid extraction

For DNA extraction, grind the sample in 10 volumes of extraction buffer (NaCl [100 mM], ethylene diamine tetraacetic acid [EDTA, 25 mM], pH 8, and sodium dodecyl sulphate [SDS, 0.5%]) supplemented with proteinase K (100 µg ml<sup>-1</sup>). Following overnight incubation at 50°C, DNA is extracted using a standard phenol/chloroform protocol, and precipitated with ethanol. To isolate DNA-nucleic acids from tissues preserved in ethanol or RNAlater an RNA preservative, simply remove the tissue from ethanol or RNAlater the fixative or preservative and treat it as though it was just harvested. Most fresh and RNAlater/ethanol-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.

Considering time constraints and risks for laboratory staff, commercially available kits may provide satisfactory technical alternatives. Use of commercial kits should be validated by comparison with a standard phenol/chloroform protocol prior to their routine use in diagnostic laboratories.

### 2.5.4. RNA extraction

To isolate RNA from tissues preserved in RNAlater, simply remove the tissue from RNAlater and treat it as though it was just harvested. Most tissues can be homogenised directly in lysis or extraction buffer.

Considering time constraints and risks for laboratory staff, commercially available kits may provide satisfactory technical alternatives. Use of commercial kits should be validated by comparison with a standard phenol/chloroform protocol prior to their routine use in diagnostic laboratories.

### 2.5.4. Preparation of slides for *in-situ* hybridisation

For *in-situ* hybridisation (ISH), fish tissues should be fixed in neutral-buffered formalin for approximately 24 hours and then embedded in paraffin according to standard histological methods, as described under section 3.3. 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 µg ml<sup>-1</sup>) in TE buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]), at 37°C for 30 minutes. For ISH-*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).

## 3. 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.

Storage facilities should record 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.

## KEY REFERENCES FOR FURTHER READING

AMEND D., YASUTAKE W. & MEAD R. (1969). A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **98**, 796–804.

ARNZEN J.M., RISTOW S.S., HESSON C.P. & LIENTZ J. (1991). Rapid fluorescent antibody test for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) utilizing monoclonal antibodies to nucleoprotein and glycoprotein. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**, 109–113.

AUBERTIN A.M. (1991). Family Iridoviridae. *In: Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.* (Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 132–136.

BOOTLAND L.M. & LEONG J.A. (1992). Staphylococcal coagglutination, a rapid method of identifying infectious hematopoietic necrosis virus. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 6–13.

BOWSER P.R. & PLUMB J.A. (1980). Fish cell lines: establishment of a line from ovaries of channel catfish. *In Vitro*, **16**, 365–368.

CORSIN F., GEORGIADIS M., HAMMELL K.L. & HILL B. (2009). Guide for Aquatic Animal Health Surveillance. The World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 114 pp.

CRANE M.ST.J. & HYATT A.D. (2011). Viruses of fish: An overview of significant pathogens. *Viruses*, **3**, 2025–2046.

CRANE M.ST.J., YOUNG J. & WILLIAMS L.M. (2005). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV): Growth in fish cell lines at different temperatures. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **25**, 228–231.

DANNEVIG B.H., FALK K. & NAMORK E. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney. *J. Gen. Virol.*, **76**, 1353–1359.

DEVOLD M., KROSSOY B., ASPEHAUG V. & NYLUND A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 9–18.

DOBOS P. (1991). Family Birnaviridae. *In: Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.* (Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 200–202.

EAGLE H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, **130**, 432.

FIJAN N., PETRINEC Z., SULIMANOVIC D. & ZWILLENBERG L.O. (1971). Isolation of the causative agent from the acute form on infectious dropsy of carp. *Vet. Arch. Zagreb*, **41**, 125–138.

FIJAN N., SULIMANOVIC D., BEARZOTTI M., MUZINIC D., ZWILLENBERG L.O., CHILMONCZYK S., VAUTHEROT J.F. & DE KINKELIN P. (1983). Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). *Ann. Virol. Institut Pasteur*, **134E**, 207–220.

FRESHNEY R.I. (2010). CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE AND SPECIALIZED APPLICATIONS, 6TH EDITION, WILEY-BLACKWELL, 768 PP.

GARVER K.A., HAWLEY L.M., MCCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.

GRAHAM D.A., WILSON C., JEWHRST H. & ROWLEY H. (2008). Cultural characteristics of salmonid alphaviruses – influences of cell line and temperature. *J. Fish Dis.*, **31**, 859–868.

HAENEN O.L.M., WAY K., BERGMANN S.M. & ARIEL E. (2004). The emergence of koi herpesvirus and its significance to European aquaculture. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 293–307.

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.

HERATH T., COSTA J., THOMPSON K., ADAMS A. & RICHARDS R. (2009). Alternative cell line for the isolation of salmonid alphavirus-1. *Icelandic Agricultural Sci.*, **22**, 19–27.

HILL B.J., WILLIAMS R.F., FINLAY J. (1981). Preparation of antisera against fish virus disease agents. *Dev. Biol. Stand.*, **49**, 209–218.

- HSU Y.L., MARK ENGELKING H. & LEONG J. (1986). Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1353–1361.
- HYATT A.D., EATON B.T., HENGSTBERGER S. & RUSSEL G. (1991). Epizootic hematopoietic necrosis virus: detection by ELISA, immuno-histochemistry and electron microscopy. *J. Fish Dis.*, **14**, 605–618.
- JENSEN M.H. (1965). Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **126**, 422–426.
- JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUTRUP T.S. & OLESEN N.J. (2013). Development and validation of a novel Tagman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.*, **36**, 9–23.
- KIM S.W., ROH J. & PARK C.S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *J. Pathol. Translational Med.*, **50**, 411–418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- 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.
- LANNAN C.N., WINTON J.R., FRYER J.L. (1984). New cell lines. Fish cells: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, **20**, 671–676.
- LAURIN E., THAKUR K., MOHR P., HICK P., CRANE M.ST.J., GARDNER I.A., MOODY N.J.G., COLLING A. & ERNST I. (2019). To pool or not to pool? Guidelines for pooling samples for use in surveillance testing of infectious diseases in aquatic animals. *J. Fish Dis.*, **42**, 1471–1491.
- LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN, N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 81–88.
- LORENZEN N., OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to four Egtved virus structural proteins. *Dis. Aquat. Org.*, **4**, 35–42.
- 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.
- MOURTON C., ROMESTAND., DE KINKELIN P., JEFFROY J., LEGOUVELLO R. & PAU B. (1992). A highly sensitive immunoassay for the direct diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia, using anti-nucleocapsid monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 2338–2345.
- MUNDAY B.L., KWANG J. & MOODY N. (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, **25**, 127–142.
- NAKANE P.K. & KAWAOKI A. (1974). Peroxidase-labeled antibody, a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084–1091.
- OLESEN N.J., LORENZEN E. & LAPATRA S. (1999). Production of neutralizing antisera against viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus by intravenous infection of rabbits. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**, 10–16.
- OLESEN N.J. & VESTERGAARD-JORGENSEN P.E. (1992). Comparative susceptibility of three fish cell lines to Egtved virus, the virus of viral haemorrhagic septicaemia. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 235–237.
- 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.
- PANZARIN V., PATARNELLO P., MORI A., RAMPAZZO E., CAPPELLOZZA E., BOVO G. & CATTOLI G., (2010). Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Arch. Virol.*, **155**, 1193–1203.
- PAUL J. (1976). Media for culturing cells and tissues. In: Cell and Tissue Culture, Paul J., ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, UK, and New York, USA, 91–123.
- RISTOW S.S. & ARNZEN J.M. (1989). Development of monoclonal antibodies that recognize a type 2 specific and a common epitope on the nucleoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **1**, 119–125.

ROIZMAN B. (1991). Family Herpesviridae. *In: Classification and Nomenclature of Viruses*, Francki R.J., Fauque C.M., Knudson D.L. & Brown F., eds. *Arch. Virol.* (Suppl. 2). Springer, New York, USA and Vienna, Austria, 103–110.

SLAOUI M. & FIETTE L. (2011). Histopathology procedures: From tissue sampling to histopathological evaluation. *Methods Mol. Biol.*, **691**, 69–82. doi:10.1007/978-1-60761-849-2\_4

STOKER M. & MCPHERSON I. (1961). Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus *in vitro*. *Virology*, **14**, 359–370.

THRUSH M.A., HILL T. & TAYLOR N.G.H. (2019). Development of a non-lethal hydrogen peroxide treatment for surveillance of *Gyrodactylus salaris* on trout farms and its application to testing wild salmon populations. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi:10.1111/tbed.13263

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

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.

WALKER P. & SUBASINGHE R.P. (2000). DNA-based Molecular Diagnostic Techniques. Research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. *FAO Fisheries Technical Paper*, n°395, 93 pp.

WINTON J, W BATTS W, DEKINKELIN P, LEBERRE M, BREMONT M. & FIJAN N. (2010). Current lineages of the epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell line are contaminated with fathead minnow, *Pimephales promelas*, cells. *J. Fish Dis.*, **33**, 701–704.

WOLF K. (1988). *Fish Viruses and Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476 pp.

WOLF K. & QUIMBY M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cell *in vitro*. *Science*, **135**, 1065–1066.

WOLF K. & QUIMBY M.C. (1973). Fish viruses: Buffers and methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl. Microbiol.*, **25**, 659–664.

\*  
\*\*

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPTER 2.4.3.

INFECTION WITH *BONAMIA OSTREAE*

...

**2.2. Host factors****2.2.1. Susceptible host species**

Natural host: European flat oysters, *Ostrea edulis*.

Oyster species infected when moved into *B. ostreae* endemic zones: *Ostrea puelchana*, *O. angasi*, *O. chilensis* (= *Tiostrea chilensis*, *T. lutaria*) (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004). However, the parasite was not identified to the species level in these hosts.

Experimental assays have indicated a low infectivity of *B. ostreae* to *Crassostrea ariakensis* (Audemard *et al.*, 2005)

It has been speculated that *Ostrea conchaphila* (= *O. lurida*) and *Crassostrea angulata* have been infected with *B. ostreae* (Carnegie & Cochenne-Laureau, 2004), but confirmatory diagnosis has not been achieved.

Experimental work showed that the following species are not susceptible to *B. ostreae*: *C. gigas*, *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* (Culoty *et al.*, 1999).

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: European flat oyster (*Ostrea edulis*), Chilean flat oyster (*Ostrea chilensis*), and Suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis*).

**2.2.2. Susceptible stages of the host Species with incomplete evidence for susceptibility**

Both 0+ and 1+ year-old *O. edulis* are susceptible to infection and can develop a high prevalence and high intensity of infection and even mortality over a 6-month period (Lynch *et al.*, 2005). However, individuals older than 2 years appear to be more susceptible to the disease (Culoty & Mulcahy, 1996; Grizel, 1985; Engelsma *et al.*, 2010). Seed from natural settlements appear to be significantly more parasitised than oyster seed from hatcheries (Conchas *et al.*, 2003).

It has recently been shown that larvae can be infected with *B. ostreae* (Arzul *et al.*, 2010).

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 (*Crassostrea gigas*).

**2.2.3. Non-susceptible species**

Species that fulfil the criteria for listing as non-susceptible to infection with *Bonamia ostreae* according to Chapter 1.5 of the Aquatic Code include: blue mussel (*Mytilus edulis*), European clam (*Ruditapes decussatus*), Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*).



## CHAPTER 2.1.3.

## INFECTION WITH *BATRACHOCHYTRIUM SALAMANDRIVORANS*

---

### 1. Scope

Infection with *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) means infection of amphibians with the pathogenic agent *Batrachochytrium salamandrivorans*, of the Division Chytridiomycota and Order Rhizophydiales—Genus *Batrachochytrium* and Family *Incertae sedis*.

### 2. Disease information

#### 2.1. Agent factors

##### 2.1.1. Aetiological agent

The type strain of the pathogenic chytrid fungal agent *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) ~~type strain is~~ AMFP13/1. Three more isolates have been described (Martel *et al.*, 2014) but no information is available on genetic structuring or phenotypic variation. Phylogenetic analyses show that Bsal forms a clade with its sister species *B. dendrobatidis* (Martel *et al.*, 2013). The genome size of the type strain was determined at 32.6 Mb with 10,138 protein-coding genes predicted (Farrer *et al.*, 2017). The contribution of these proteins to virulence is currently not clear.

##### 2.1.2. Survival and stability inside the host tissues in processed or stored samples

Bsal is an intracellular pathogen that develops inside epidermal cells. The presence of Bsal could be demonstrated using real-time polymerase chain reaction (qPCR) on dorsal skin swabs up to 7 days on average post-mortem and using histopathology of dorsal skin tissue up to 3 days on average post-mortem (Thomas *et al.*, 2018). It is not clear how long Bsal can survive inside tissues of a dead host and how long a dead host remains infectious. ~~Storage of tissues or skin swabs in 70% ethanol or at -20°C allows detection of Bsal using qPCR for more than 150 years as demonstrated by analysis of museum specimens (Martel *et al.*, 2014).~~

##### 2.1.3. Survival and stability outside the host

Encysted spores have been shown to remain infectious in pond water for up to at least 31 days (Stegen *et al.*, 2017) and are considered more ~~environmentally-resistant~~ in the environment compared with zoospores. Experimentally inoculated forest soil was demonstrated to remain infectious to fire salamanders for 48 hours (Stegen *et al.*, 2017). However, Bsal DNA was detected up to 28 weeks in contaminated forest soil for up to 28 weeks (Stegen *et al.*, 2017). ~~However, Whether~~ this reflects the presence of viable Bsal organisms is not clear. The effect of ~~desiccation~~ desiccation on Bsal survival has not been studied.

For inactivation methods, see Section 2.4.5.

#### 2.2. Host factors

##### 2.2.1. Susceptible host species [under study]

Species that fulfil the criteria for listing as susceptible to infection with Bsal according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* ~~include are:~~ alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*), blue-tailed fire-bellied newt (*Cynops cyanurus*), fire salamander (*Salamandra salamandra*), eastern newt (*Nothophthalmus viridescens*), French cave salamander (*Hydromantes strinatii*), Italian newt (*Lissotriton italicus*), yellow-spotted newt (*Neurergus crocatus*), Japanese fire-bellied newt (*Cynops pyrrhogaster*), northern spectacle salamander (*Salamandrina perspicillata*), Tam Dao salamander (*Paramesotriton deloustali*), rough-skinned newt (*Taricha granulosa*), sardinian brook salamander (*Euproctus platycephalus*) and Spanish ribbed newt (*Pleurodeles waltli*) [under study and may include:].

Family	Scientific name	Common name
Plethodontidae	<i>Hydromantes strinatii</i>	French cave salamander
Salamandridae	<i>Cynops cyanurus</i>	blue-tailed fire-bellied newt
	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Japanese fire-bellied newt
	<i>Euproctus platycephalus</i>	sardinian brook salamander
	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	Alpine newt
	<i>Lissotriton italicus</i>	Italian newt
	<i>Neureergus crocatus</i>	yellow spotted newt
	<i>Nothophthalmus viridescens</i>	eastern newt
	<i>Paramesotriton deloustali</i>	Tam Dao salamander
	<i>Pleurodeles waltl</i>	Spanish ribbed newt
	<i>Salamandrina perspicillata</i>	northern spectacle salamander
	<i>Salamandra salamandra</i>	fire salamander
	<i>Taricha granulosa</i>	rough-skinned newt

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

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: [under study]

### 2.2.3. Non-susceptible species

Species that have been found non-susceptible to infection with Bsal according to Chapter 1.5. of the Aquatic Code are: [under study]

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

Bsal is a pathogenic agent that mainly affects urodeles. Evidence from experimental infections and disease outbreaks in the wild and in captivity show that at least most, if not all, species of the family Salamandridae, as well as species of the family Hynobiidae are likely to become infected when exposed to Bsal. However, differences in susceptibility to infection between species do exist: for example, for fire salamanders (*Salamandra salamandra*), the infectious dose of Bsal was determined to be a theoretical one zoospore, whereas a significantly higher dose was necessary to infect Alpine newts (*Ichthyosaura alpestris*); Stegen *et al.*, 2017) and one western Palearctic species (*Lissotriton helveticus*) may be more resistant to infection (Martel *et al.*, 2014). For the largest family of salamanders (Plethodontidae), little information is currently available; at least one European species (*Speleomantes strinatii*) can be infected but other, North American species (*Gyrinophilus porphyriticus*, *Plethodon glutinosus*, Ambystomatidae) seem less susceptible to infection (Martel *et al.*, 2014). Susceptibility of the family of *Cryptobranchidae* is not clear, with a single infection found in a farmed Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*; Zhiyong *et al.*, 2018). No information is available on the urodele families *Proteidae*, *Rhyacotritonidae* and *Amphiumidae*. Bsal infection in anurans has only been detected in two species, in captivity, the wild and in lab trials (Nguyen *et al.*, 2017; Stegen *et al.*, 2017).

Thus far, infections with Bsal have been demonstrated only in amphibians post-metamorphosis. In one experimental infection trial, larvae of fire salamanders were exposed to Bsal, but did not become ~~were not~~ infected (Van Rooij *et al.*, 2015). The extent to which factors such as ~~like~~ age and sex affect susceptibility to infection post-metamorphosis is unknown.

In Europe, Bsal has been detected in captive collections of urodeles (Fitzpatrick *et al.*, 2018, Sabino-Pinto *et al.*, 2015) and the pet trade in salamanders and newts has been hypothesised to play a central role in the distribution of this fungus (Fitzpatrick *et al.*, 2018; Yap *et al.*, 2015; Zhiyong *et al.*, 2018). Hence, urodeles that come into contact with traded urodeles, either directly (by ~~via~~ co-housing or contact ~~of with~~ wild animals ~~with or~~ released or captive animals) or indirectly (via materials, contaminated water or soil) ~~come in contact with traded urodeles~~, may have a high likelihood of exposure to infection with ~~be more likely to contract~~ Bsal infection.

For the purposes of Table 4.1, salamander larvae with gill buds may be considered early life stages, larvae with developed or developing gills and limbs are juveniles and salamander with full developed gills and limbs are adults.

#### 2.2.5.4. Distribution of the pathogen in the host

Bsal only infects the skin, where it remains limited to the epidermis.

#### 2.2.6-5. Aquatic animal reservoirs of Persistent infection

A large number of salamanders, mainly belonging to the families Salamandridae and Hynobiidae, may survive episodes of infection (for example Alpine newts) or be considered tolerant, resulting in persistent subclinical infections. Although persistent infection has not been demonstrated for all species, in the native Bsal range in east Asia, Bsal infection and disease dynamics appear to be consistent for all species examined and appear capable of long-term persistent infections (Laking *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018).

In its invasive range, persistent infections (e.g. in Alpine newts) have been implicated in the ~~extirpation-local~~ extinction of a highly susceptible species (fire salamanders). It is currently not clear which of the species, mentioned in Section 2.2.1 may sustain persistent infections in the invasive Bsal range. At least some species (the best-known example is the fire salamander) are highly susceptible and invariably die ~~shortly~~ briefly after exposure (Martel *et al.*, 2014; Stegen *et al.*, 2017), ~~making which would make~~ them unlikely to sustain persistent infections.

It is not known whether other, biotic reservoirs of Bsal exist.

#### 2.2.7-6. Vectors

There is evidence that birds may carry zoospores attached to their ~~the~~ feet of birds (Stegen *et al.*, 2017), ~~which may and thus may~~ act as vectors for Bsal.

### 2.3. Disease pattern

#### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

In its native range in east Asia, Bsal has been demonstrated to be present in the wild at a prevalence of between 2 and 4% on average (data from China [People's Rep. of], Japan, Thailand, and Vietnam; Laking *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018), but in the absence of any observed morbidity or mortality under natural conditions. In some populations (*Paramesotriton hongkongensis*), prevalence may reach 50% (Zhiyong *et al.*, 2018). In its invasive range in Europe, Bsal was present in a population of fire salamanders at a prevalence of between 25 and 63% (Stegen *et al.*, 2017). ~~In captive collections of urodeles in Europe, Bsal occurrence and associated mortality has been~~ were detected in captive collections of urodeles in Europe, including Germany (1), the United Kingdom (4), Belgium (1), the Netherlands (2) and Spain (1) (number in brackets indicates number of collections). When left untreated, morbidity and mortality can reach 100%, at least in members of the genus *Salamandra*.

Morbidity, mortality and minimum infectious dose vary considerably between species (Martel *et al.*, 2014; Stegen *et al.*, 2017). Based on natural outbreaks in captivity and in the wild and ~~in an~~ in infection trials, the case morbidity and case mortality rate in fire salamanders can reach 100%, independent of the initial level of Bsal exposure. This has resulted in the loss of over 99.9% of the fire salamander population at the Bsal index outbreak site in the Netherlands (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2016). All tested western Palearctic urodeles, except for *Lissotriton helveticus* and *Salamandrella keyserlingii*, showed 100% morbidity and mortality when exposed to a single, high dose of Bsal (Martel *et al.*, 2014). However, at least for Alpine newts, the case morbidity and case fatality rates depend on the Bsal dose that the animal is exposed to: a high dose resulting in the highest mortality, while a low dose does not necessarily result in morbidity or mortality.

~~It is important to mention that~~ Morbidity and mortality also depend on environmental temperature. For the Bsal type strain, temperatures above 20°C reduces the level of ~~tempers~~ infection and temperatures above 25°C eventually result in killing of Bsal and elimination of infection (Bloo *et al.*, ~~2015b-2015a~~). Exposure of infected animals to conditions that inhibit Bsal growth may thus result in non-clinical or sub-clinical infections in susceptible species.

Co-occurrence of highly susceptible species such as fire salamanders with less susceptible species, such as Alpine newts may facilitate density independent disease dynamics that lead to the local extinction of the highly susceptible species (Stegen *et al.*, 2017).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Chytridiomycosis caused by Bsal may be accompanied by a combination of the following signs: epidermal ulcerations (ranging from discrete ~~tiny~~ to extensive), excessive skin shedding, skin haemorrhages and/or fluid loss, anorexia, apathy, abnormal body postures and convulsions ~~and death~~ (Martel *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Gross pathology

Skin anomalies (haemorrhages, ulcerations, presence of sloughed skin) are the main pathological findings (Martel *et al.*, 2013).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Colonial or monocentric thalli of this fungus develop inside host epidermal cells and produce motile zoospores or walled, encysted spores, both of which are infectious stages. Zoospores are released through one or several discharge tubes. While motile spores actively swim towards a suitable substrate (e.g. a host), the encysted spores float at the water–air interface and passively adhere to a passing host (Stegen *et al.*, 2017). *In vitro*, developing thalli form fine rhizoids. Mature thalli *in vitro* are between 16 and 50 µm in diameter, *in vivo* between 7 and 17 µm; zoospores are approximately 5 µm in diameter. Motile zoospores are roughly spherical, the nucleus is located outside of the ribosomal mass, with aggregated ribosomes, multiple mitochondria and numerous lipid globules. The position of the non-flagellated centriole in free swimming zoospores varies from angled to parallel to the kinetosome (Martel *et al.*, 2013).

There are no indications of vertical transmission. However, this cannot be excluded in species giving birth to metamorphosed offspring (e.g. *Salamandra atra*, *Salamandra lanzai*, *Lyciasalamandra helverseni*). Horizontal transmission occurs through direct contact or contact with contaminated soil or water (Stegen *et al.*, 2017). Infectious stages include the motile zoospore and the environmentally resistant encysted spores (Stegen *et al.*, 2017). Infections can be reproduced under experimental conditions by topically applying a Bsal inoculum on the dorsum of amphibians and housing the exposed animals at 15°C (Martel *et al.*, 2013; 2014; Stegen *et al.*, 2017). This inoculum can either contain motile zoospores or the immobile, encysted spores.

Pathways of Bsal dispersal within Europe are poorly understood but may be anthropogenic (e.g. through contaminated material). Zoospores attach to bird feet, suggesting birds may spread Bsal over larger distances (Stegen *et al.*, 2017). Direct animal-to-animal contact is necessary for transmission of Bsal: salamanders only separated by 1 cm from infected conspecifics were not infected in laboratory trials, in contrast to co-housed animals (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2018). Overall, dispersal ability of Bsal in Europe currently seems limited: Bsal was found not to be transmitted to a neighbouring site in the Netherlands, despite being downstream of a small stream, and the current distribution of Bsal in Europe is probably not continuous (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2018).

Although Bsal dispersal between populations is now hypothesised to be mainly human mediated, other factors (e.g. wildlife, water) may play key roles and critical knowledge about Bsal dispersal is currently lacking.

### 2.3.5. Environmental ~~and management~~ factors

The Bsal type strain AMFP13/1 tolerates temperatures up to 25°C but is killed at higher temperatures (Bloom *et al.*, 2015b–2015a). As Bsal infections have been demonstrated in aquatic newts at water temperatures above 25°C (Laking *et al.*, 2017; Zhiyong *et al.*, 2018), it is likely, ~~however~~, that thermal tolerance may be Bsal lineage dependent. A temperature of 4°C results in slower progression ~~build-up~~ of infection but does not reduce morbidity or mortality (Stegen *et al.*, 2017). Desiccation is likely to be poorly tolerated by Bsal, although data are currently lacking, and the encysted spore may be resistant to drying (Stegen *et al.*, 2017; Van Rooij *et al.*, 2015). It is not known to what extent Bsal tolerates freezing.

Co-occurrence of highly susceptible species such as fire salamanders with less susceptible species, such as Alpine newts may facilitate density independent disease dynamics that lead to the extirpation local extinction of the highly susceptible species (Stegen *et al.*, 2017).

Barriers to pathogen dispersal, for example those preventing migration of infected hosts such as amphibian fences or roads, or those preventing transmission by potential Bsal vectors including humans, fomites and wildlife, may prevent transmission at small spatial scales (Spitzen van der Sluijs *et al.*, 2018).

### 2.3.6. Geographical distribution

Asia is currently considered the region of origin of Bsal (Martel *et al.*, 2014), where the infection appears to be endemic in amphibian communities across a wide taxonomic, geographical and environmental range, albeit at a low prevalence between 2 and 4% (Zhiyong *et al.*, 2018). In Asia, Bsal was shown to be widely present in urodele populations in China (People's Rep. of), Japan, Thailand and Vietnam. East Asia is presumed to be the native range of the fungus (Laking *et al.*, 2017; Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018).

Europe is considered the invasive range of the fungus where Bsal was first identified during a mortality event in fire salamanders (~~*Salamandra salamandra*~~) in Bunderbos, the Netherlands (Martel *et al.*, 2013). In Europe, Bsal was detected by surveys of wild susceptible species in Belgium, Germany and the Netherlands (Martel *et al.*, 2014; Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2016), and in captive urodele populations in Belgium, Germany, the Netherlands, Spain, and the United Kingdom (Fitzpatrick *et al.*, 2018; Sabino-Pinto *et al.*, 2015).

Bsal has not been reported in Africa or the Americas.

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

Not available.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

A combined treatment using Polymyxin E, voriconazole and a temperature regime of 20°C has been shown to be effective in eradicating Bsal from infected hosts (Bloo *et al.*, ~~2015c-2015b~~). If the treatment is not performed properly and does not achieve eradication, low level carriers are created and the likelihood of Bsal detection, is reduced.

### 2.4.3. Immunostimulation

Not available.

### 2.4.4. Breeding resistant strains

~~Breeding resistant strains is one of the few options for long term sustainable disease mitigation.~~

No information available.

### 2.4.5. Inactivation methods

Bsal is sensitive to a wide variety of disinfectants (Van Rooij *et al.*, 2015). Inactivation using formalin has been shown to hamper DNA detection using real-time PCR-qPCR. Bsal is killed within 30 seconds in 70% ethanol (Van Rooij *et al.*, 2017). Inactivation in 70% ethanol allows for subsequent molecular tests yet is less suitable for histopathology. The Bsal type strain AMFP 13/1 is killed at temperatures exceeding 25°C; consequently, inactivation of this fungus can be achieved through heat treatment by autoclaving (Martel *et al.*, 2013).

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

No information available.

#### 2.4.7. General husbandry

In captivity, pathogen detection is difficult due to low prevalence in subclinically infected animals that often carry Bsal at low intensities (Martel *et al.*, 2014; Zhiyong *et al.*, 2018). These subclinically infected animals often belong to (but are not restricted to) taxa of Asian urodeles. Highly susceptible species (such as fire salamanders *Salamandra salamandra*) may serve a sentinel function. Temperature regimes in captivity may strongly interfere with pathogen detection. Temperatures higher than 20°C (and below 25°C) severely impair pathogen proliferation in the host skin (Bloo *et al.*, 2015b-2015a) and may result in infections that cannot be detected.

Heat treatment can be used to clear infection with Bsal in thermotolerant salamander species (Bloo *et al.*, 2015a).

Barriers to pathogen dispersal, for example those preventing migration of infected hosts such as amphibian fences or roads, or those preventing transmission by potential Bsal vectors including humans, fomites and wildlife, may prevent transmission at small spatial scales (Spitzen-van der Sluijs *et al.*, 2018).

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

This Section draws on information from 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

In cases of disease or mortality in urodeles in captivity, sampling should be focused primarily on diseased or moribund animals (i.e. those showing skin lesions and abnormal behaviour). In a population with ongoing disease and mortality, live but diseased animals are preferentially sampled. The second choice is dead animals. Only freshly dead animals should be sampled as detectability of Bsal deteriorates post-mortem (Thomas *et al.*, 2018). However, in the absence of diseased or freshly dead animals, apparently healthy animals can be sampled.

Similarly, in wild populations, samples should be taken preferentially from diseased or, moribund or freshly dead animals ~~should preferentially be sampled, but~~, however, as these may quickly be removed (i.e. through predation, scavenging) only healthy animals may only be available. Populations which have declined or where dead animals have been observed should be targeted.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

The only relevant tissue is skin tissue and probably only from amphibians post-metamorphosis. Both invasive (skin biopsies) and non-invasive (cotton tipped medical swabs) samples sampling are appropriate, given the apical shedding of Bsal spores. In dead animals, dorsal skin is the preferred tissue, given its slower post-mortem decay (Thomas *et al.*, 2018).

#### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

~~Any other~~ Tissues other than skin is are not suitable for the detection of Bsal in amphibians.

#### 3.4. Non-lethal sampling

Non-lethal sampling is possible, either by collecting skin biopsies (toeclips or tailclips) or by non-invasively collecting samples using cotton tipped medical swabs. The latter is preferred given its minimal impact on animal welfare well-being. As Bsal is limited to the superficial skin layers of the amphibian host, non-lethal sampling results are equivalent to lethal sampling results. ~~In the absence of other, Bsal specific diagnostic tests (other than the laborious isolation of the fungus),~~ Large numbers of animals can be sampled using skin

swabs with minimal effects on animal welfare. **Cotton-tipped Medical** swabs should be rubbed firmly over the abdomen (10 times), the underside of a foot (10 times) and the ventral tail (10 times) using the tip of the swab. The use of disposable gloves for manipulating amphibians is highly recommended. **Swabs should be transported immediately to the diagnostic laboratory or should be frozen until transfer.**

### 3.5. Preservation of samples for submission

#### 3.5.1. Samples for pathogen isolation

Bsal isolation is a ~~very~~ laborious procedure, requiring up to two months ~~to obtain~~ ~~for obtaining~~ a pure culture from a clinical sample. Isolation from animals that died due to Bsal infection is hampered by bacterial overgrowth. The best sample for Bsal isolation is a diseased, living animal, which is euthanised just prior to an isolation attempt. Before sampling, diseased animals should be kept at temperatures between 5 and 15°C to avoid clearance of infection (Bloom *et al.*, ~~2015b~~ 2015a).

#### 3.5.2. Preservation of Fixed 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. The use of lower grade (laboratory or industrial grade) ethanol is not recommended. If material cannot be fixed it may be frozen.

Skin swabs should be stored dry and preferably frozen.

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

Skin samples for histopathology should be fixed immediately after collection. The recommended ratio of formalin (10%) to tissue is 10:1.

#### **3.5.4. Fixed Samples for electron microscopy**

**For transmission electron microscopy, skin samples can be fixed in glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer and 1% osmium tetroxide post-fixation (Martel *et al.*, 2013).**

#### 3.5.5 ~~4~~. Samples for other tests

Not applicable.

### 3.6. Pooling of samples

Pooling of up to ~~four~~ ~~five~~ skin swab samples appears to allow reliable detection of Bsal in clinically affected animals (Sabino-Pinto *et al.*, ~~2018~~ 2019a; 2019b) but estimates of ~~on~~ the impact on diagnostic performance of the test characteristics have not been determined. Given low infection intensities in subclinically infected animals, sampling and testing of individual animals is recommended.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations, ii) presumptive and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage. The designations used in the Table indicate:

Key:

+++ = Recommended method(s) validated for the purpose shown and usually to stage 3 of the OIE Validation Pathway;

++ = Suitable method(s) but may need further validation;

+ = May be used in some situations, but cost, reliability, lack of validation or other factors severely limits its application;

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.

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

Method [amend or delete as relevant]	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juvenile s <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juvenile s <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts	+	+	+	1	+	+	+	1				‡
Histopathology <sup>3</sup>	+	+	+	1	++	++	++	1				‡
Cell or artificial media culture									+	+	+	<u>1</u>
Real-time PCR	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2	+++	+++	+++	2
Conventional PCR												
Amplicon sequencing <sup>4</sup>												
<i>In-situ</i> hybridisation												
LAMP												
Lateral flow assay	+	+	+	‡	++	++	++	1				‡
Immunohistochemistry												

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

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Early and juvenile life stages have been defined in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Cytopathology and histopathology can be validated if the results from different operators has been statistically compared. <sup>4</sup>Sequencing of the PCR product.

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



#### 4.1. Wet mounts

Wet mounts of skin scraping or pieces of shed skin can be examined at magnification 10x using light microscopy. The presence of motile spores of approximately 5 µm are indicative of amphibian chytrid infection.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

~~No reports are available on the use of cytology.~~ Histopathology of skin in amphibians post-metamorphosis may provide strong indications of Bsal infection. In ~~a haematoxylin/eosin staining of skin stained~~ sections, histopathological evidence suggestive of Bsal infections ~~of skin, is~~ multifocal epidermal necrosis with loss of distinction between layers of keratinocytes associated with myriad intracellular and extracellular chytrid-type fungal thalli ~~provides histopathological evidence of Bsal infection~~ (Martel *et al.*, 2013; White *et al.*, 2016). Using immunohistochemistry, Bsal thalli can be stained, which aids in detecting low level infections (Thomas *et al.*, 2018). Histopathology is highly indicative, yet does not allow ~~specific definitive~~ identification of Bsal, which needs further confirmation. In randomly collected skin samples from experimentally infected salamanders, histopathology was capable of detecting Bsal in only a minority of the samples (Thomas *et al.*, 2018). In dead animals, post-mortem decay of the epidermis may mask the lesions (Thomas *et al.*, 2018). Lesions can be so extensive, that the epidermis is entirely eroded and no fungal thalli can be observed. Mild infections can be missed due to the multifocal and small lesions (Thomas *et al.*, 2018). ~~For asymptotically in subclinically~~ infected animals, **diagnostic** sensitivity should be rated low. ~~Sensitivity, In clinically affected animals, sensitivity~~ and specificity of histopathology and immunohistochemistry have not been quantified.

No reports are available on the use of cytopathology.

#### 4.3. Cell ~~or artificial media~~ culture for isolation

Bsal can be isolated and cultured on artificial media, yet this is a laborious and difficult procedure, typically requiring between 4 weeks and 2 months. There is a significant probability of bacterial overgrowth, which hampers fungal isolation, resulting in poor sensitivity. The protocol of Fisher *et al.* (2018) can be used. Small (approximately 1 mm<sup>2</sup>) pieces of skin from an infected, diseased animal should first be thoroughly cleaned by wiping through agar plates. The cleaned pieces of skin can then each be transferred to a well of a 96-well plate, containing tryptone-gelatin hydrolysate lactose broth (TGH<sub>L</sub>) containing penicillin/streptomycin (200 mg/litre) and incubated at 15°C. Wells showing chytrid growth without bacterial contamination can be used for subculturing (Martel *et al.*, 2013). Chytrid growth can be visualised by examining the wells under an inverted microscope (10–40 x magnification).

Given the difficulties to isolate Bsal from infected animals and the high uncertainty to obtain a viable culture, this method is not appropriate as ~~first diagnostic approach~~ a routine diagnostic method, but (in rare cases) may be useful to confirm infection and ~~for or to~~ obtaining isolates for research ~~(for example for epidemiological tracing)~~.

#### 4.4. Nucleic acid amplification

##### 4.4.1. Real-time PCR

The following information is derived from Blooi *et al.* (2013), Thomas *et al.* (2018) and Sabino Pinto *et al.* (2018). DNA from skin swabs can be extracted using commercial DNA extraction kits, in 100 µl Prepman Ultra Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA) or by using the Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). ~~The latter follows the animal tissues protocol (Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit) with pre-treatment for Gram-positive bacteria and expanded initial incubation for 1 hour. DNA from skin tissue can be extracted using proteinase K digestion or DNA Easy Tissue Kit.~~ Extracted DNA is diluted tenfold to minimise possible PCR inhibition. Controls should be run with each assay: at least a negative extraction control and a positive control; preferably, an internal PCR control is included. Positive control consists of DNA extracts of a tenfold dilution series of Bsal zoospores from 1 to 100,000 to allow quantification.

A TaqMan PCR has been partially validated to level 2-3 without however, stating its intended purpose (Thomas *et al.*, 2018). SYBR green real-time PCR, may be used as well but needs further validation to determine specificity and sensitivity (Martel *et al.*, 2013). The TaqMan PCR can either be used as simplex PCR or in combination with primers to detect *B. dendrobatidis* in a duplex PCR (Bloom *et al.*, 2013) and uses the forward primer STerF (5'-TGC-TCC-ATC-TCC-CCC-TCT-TCA-3'), reverse primer STerR (5'-TGA-ACG-CAC-ATT-GCA-CTC-TAC-3') and Cy5 labelled probe STerC (5'-ACA-AGA-AAA-TAC-TAT-TGA-TTC-TCA-AAC-AGG-CA-3') to detect the presence of the 5.8S rRNA gene of Bsal. Intra- and interassay efficiency were 95.7 and 96% 94 and 99%, respectively (Bloom *et al.*, 2013). This TaqMan duplex PCR does not decrease detectability of both Bd and Bsal, except in case of mixed infections (Thomas *et al.*, 2018). The use of simplex Bsal-specific PCR is therefore recommended in case Bd has been detected in the sample. The sensitivity of this real-time qPCR is between 96 and 100% and diagnostic specificity 100% (95% CI: 73–100%; Thomas *et al.*, 2018) when used in clinically affected animals. Although DNA quantities as low as 0.1 genomic equivalent can be detected (Bloom *et al.*, 2013), Thomas *et al.* (2018) recommend a threshold of 1 genomic equivalent per reaction to reduce the likelihood of false positive results. Borderline results ( $\leq 1$  GE per reaction) should be classified as suspect and need confirmation by sequencing (or isolation).

Samples are preferably run in duplicate. A sample is considered positive based on the combination of (1) the shape of the amplification curves (2) positive results in both duplications, (3) returning GE values above the detection threshold (1 GE per reaction) (4) low variability between duplicates ( $< 0.3$  Ct value).

#### 4.4.2. Conventional PCR (PCR)

~~The use of real-time PCR is recommended.~~ No conventional PCR protocol has been validated.

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

None validated.

### 4.5. Amplicon sequencing

~~For confirmation of suspect samples, amplified products can be sequenced with the primers as described in 4.4.1.~~

~~No conventional PCR protocol has been validated.~~

### 4.6. *In-situ* hybridisation ~~(and histoimmunocytochemistry)~~

~~No~~ *In-situ* hybridisation: ~~no~~ validated protocols are available.

### 4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry is currently not Bsal specific, due to the lack of Bsal specific antibodies (Dillon *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2018). ~~Sensitivity of immunohistochemistry in diseased or dead animals can be estimated to be high if clinically affected skin regions have been selected.~~

### 4.8. Bioassay

Not available.

### 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

A lateral flow assay (LFA) using an IgM monoclonal antibody (MAb) was developed to detect infection in amphibian skin samples. This MAb does not discriminate between *B. salamandrivorans*, *B. dendrobatidis* and *Homolaphlyctis polyrhiza* (Dillon *et al.*, 2017-2016). The sensitivity of this test is likely to be lower than that of the real-time qPCR (Dillon *et al.*, 2017): in experimentally Bd inoculated frogs, 1/5 animals tested positive in LFA compared to 4/5 using real-time qPCR. This would make this technique most useful in animals with high infection loads. Such techniques may be useful for point-of-care testing if specificity is increased and provided thorough validation.

#### 4.10. Other ~~serological~~ methods

Not applicable

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

The use of real-time PCR on skin swabs is recommended for surveillance.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

This Section only addresses the diagnostic test results for detection of infection in the ~~presence-absence~~ (Section 6.1) or in the ~~presence absence~~ 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.

#### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>13</sup>

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.

Such surveys typically consist of non-invasive sampling using skin swabs that are examined for the presence of Bsal using real-time PCR. When applied to animals in the wild, confirmation by using a complementary technique, other than sequencing the PCR product, is often not feasible.

##### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with Bsal shall be suspected if ~~a positive result has been obtained on at least one animal from at least one of the following diagnostic tests~~ criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR;
- ii) Histopathological changes ~~(including immunohistochemistry)~~ consistent with the presence of the pathogen or the disease;
- iii) The presence of motile spores, compatible with chytrid zoospores, in wet mount of urodele skin.
- iv) ~~Positive result from lateral flow assay (LFA).~~

##### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with Bsal is confirmed if ~~positive results have been obtained on at least, in addition to the criteria in Section 6.1.1, one animal from two tests used in~~ of the following combination criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR on skin swab or skin tissue, and by histopathology or immunohistochemistry on skin tissue;
- ii) ~~Positive result by real-time PCR on skin swab or skin tissue, and~~ Pathogenic agent isolation from the skin in culture and confirmation-identification by real-time PCR.

<sup>13</sup> For example transboundary commodities.

## 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 Bsal shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Clinical signs (haemorrhages, ulcerations, presence of sloughed skin, see Section 2.3.2), notably the presence of skin ulcers and/or disecdysis;
- ii) Positive result by real-time PCR ~~on at least one swab or skin tissue~~;
- iii) Histopathological changes consistent with the presence of the pathogenic agent or the disease;
- iv) Visual observation (by microscopy) of motile spores, compatible with amphibian chytrid zoospores, in a wet mount of the skin of at least one diseased urodele;
- v) Positive result of antigen detection ~~technique such as~~ by LFA.
- vi) ~~Positive result from immunohistochemistry.~~

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with Bsal is confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.2.1, positive results have been obtained on at least one animal from two tests used in one of the following combination diagnostic tests criteria is met:

- i) Positive result by real-time PCR ~~on skin swab or skin tissue and by histopathology~~;
- ii) ~~Positive result by real-time PCR on skin swab or skin tissue, and Pathogenic agent isolation from the skin in culture and identification by real-time PCR and confirmation by real-time PCR.~~

~~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 Bsal is provided in Table 6.3. This information can be used for the design of surveys for infection with Bsal, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data is only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

***Table 6.3. Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis***

<u>Test type</u>	<u>Test purpose</u>	<u>Source populations</u>	<u>Tissue or sample types</u>	<u>Species</u>	<u>DSe (n)</u>	<u>DSp (n)</u>	<u>Reference test</u>	<u>Citation</u>
Real-time PCR	Diagnosis	Experimentally infected salamanders (clinical and subclinical infection)	Skin swabs	<i>Salamandra salamandra</i>	96–100 (26)	100 (12)	Droplet digital PCR	Thomas <i>et al.</i> (2018)

DSe = diagnostic sensitivity; DSp = diagnostic specificity; n = number of samples used in the study.

## 7. References

- BLOOI M., MARTEL A., HAESEBROUCK F., VERCAMMEN F., BONTE D. & PASMANS F. (2015a). Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports*, **5**, 8037. <https://doi.org/10.1038/srep08037>
- BLOOI M., MARTEL A., VERCAMMEN F., HAESEBROUCK F. & PASMANS F. (2015b). Treatment of urodelans based on temperature dependent infection dynamics of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports*, **5**, 8037.
- BLOOI M., PASMANS F., LONGCORE J.E., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., VERCAMMEN F. & MARTEL A. (2013). Duplex real-time PCR for rapid simultaneous detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* in amphibian samples. *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 4173–4177.
- BLOOI M., PASMANS F., ROUFFAER L., HAESEBROUCK F., VERCAMMEN F. & MARTEL A. (2015c-2015b). Successful treatment of *Batrachochytrium salamandrivorans* infections in salamanders requires synergy between voriconazole, polymyxin E and temperature. *Scientific Reports*, **5**, 11788.
- DILLON M.J., BOWKETT A.E., BUNGARD M.J., BECKMAN K.M., O'BRIEN M.F., BATES K., FISHER M.C., STEVENS J.R. & THORNTON C.R. (2017). Tracking the amphibian pathogens *Batrachochytrium dendrobatidis* and *Batrachochytrium salamandrivorans* using a highly specific monoclonal antibody and lateral-flow technology. *Microb. Biotechnol.*, **10**, 381–394.
- FARRER R.A., MARTEL A., VERBRUGGHE E., ABOUELLEIL A., DUCATELLE R., LONGCORE J.E., JAMES T.Y., PASMANS F., FISHER M.C. & CUOMA C.A. (2017). Evolutionary innovations underpin niche-specific infection strategies across emerging pathogenic chytrid fungi. *Nature Communications*, **8**: 14742. doi: 10.1038/ncomms14742.
- FISHER M.C., GHOSH P., SHELTON J.M.G., BATES K., BROOKES L., WIERZBICKI C., ROSA G.M., FARRER R.A., AANENSEN D.M., ALVARADO-RYBAK M., BATAILLE A., BERGER L., BÖLL S., BOSCH J., CLARE F.C., COURTOIS E., CROTTINI A., CUNNINGHAM A.A., DOHERTY-BONE T.M., GEBRESENBET F., GOWER D.J., HÖGLUND J., JAMES T.Y., JENKINSON T.S., KOSCH T.A., LAMBERTINI C., LAURILA A., LIN C.F., LOYAU A., MARTEL A., MEURLING S., MIAUD C., MINTING P., NDRIANTSOA S., O'HANLON S., PASMANS F., RAKOTONANAHARY T., RABEMANANJARA F.C.E., RIBEIRO L.P., SCHMELLER D.S., SCHMIDT B.R., SKERRATT L., SMITH F., SOTO-AZAT C., TESSA G., TOLEDO L.F., VALENZUELA-SÁNCHEZ A., VERSTER R., VÖRÖS J., WADMAN B., WEBB R.J., WELDON C., WOMBWELL E., ZAMUDIO K.R., LONGCORE J.E. & GARNER T.W.J. (2018). Development and worldwide use of non-lethal, and minimal population-level impact, protocols for the isolation of amphibian chytrid fungi. *Scientific Reports*, **8** (1), 7772. doi: 10.1038/s41598-018-24472-2.
- FITZPATRICK L., PASMANS F., MARTEL A. & CUNNINGHAM A.A. (2018). Epidemiological tracing of *Batrachochytrium salamandrivorans* identifies widespread infection and associated mortalities in private amphibian collections. *Scientific Reports*, **8**, 13845.
- LAKING A.E., NGO H.N., PASMANS F., MARTEL A. & NGUYEN T.T. (2017). *Batrachochytrium salamandrivorans* is the predominant chytrid fungus in Vietnamese salamanders. *Scientific Reports*, **7**, 44443. doi: 10.1038/srep44443
- MARTEL A., BLOOI M., ADRIAENSEN C., VAN ROOIJ P., BEUKEMA W., FISHER M.C., FARRER R.A., SCHMIDT B.R., TOBLER U., GOKA K., LIPS K.R., MULETZ C., ZAMUDIO K., BOSCH J., LÖTTERS S., WOMBWELL E., GARNER T.W.J., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., SALVIDIO S., DUCATELLE R., NISHIKAWA K., NGUYEN T.T., VAN BOCXLAER I., BOSSUYT F. & PASMANS F. (2014). Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. *Science*, **346**, 630–631.
- MARTEL A., SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., BLOOI M., BERT W., DUCATELLE R., FISHER M.C., WOELTJES A., BOSMAN W., CHIERS K., BOSSUYT F. & PASMANS F. (2013). *Batrachochytrium salamandrivorans* sp nov causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **110**, 15325–15329.
- NGUYEN T.T., NGUYEN T.V., ZIEGLER T., PASMANS F. & MARTEL A. (2017). Trade in wild anurans vectors the urodelan pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* into Europe. *Amphibia Reptilia*, **38**, 554–556. doi: 10.1163/15685381-00003125
- SABINO-PINTO J., BLETZ M., HENDRIX R., PERL R.G.B., MARTEL A., PASMANS F., LÖTTERS S., MUTSCHMANN F., SCHMELLER D.S., SCHMIDT B.R., VEITH M., WAGNER N., VENCES M. & STEINFARTZ S. (2015). First detection of the emerging fungal pathogen *Batrachochytrium salamandrivorans* in Germany. *Amphibia Reptilia*, **36**, 411–416.

SABINO-PINTO J., TOBIAS KRAUSE E., BLETZ M.C., MARTEL A., PASMANS F., STEINFARTZ S. & VENCES M. (2018–2019a). Detectability vs. time and costs in pooled DNA extraction of cutaneous swabs: a study on the amphibian chytrid fungi. *Amphibia Reptilia*, **40**, 4–11–29-39.

SABINO-PINTO J., MARTEL A., PASMANS F., STEINFARTZ S. & VENCES M. (2019b). Pooling skin swabs does not inhibit qPCR detection of amphibian chytrid infection. *Plos One* **14**, e0214405

SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., MARTEL A., ASSELBERGHS J., BALES E.K., BEUKEMA W., BLETZ M.C., DALBECK L., GOVERSE E., KERRES A., KINET T., KIRST K., LAUDELOUT A., MARIN D.A., FONTE L.F., NÖLLERT A., OHLHOFF D., SABINO-PINTO J., SCHMIDT B.R., SPEYBROECK J., SPIKMANS F., STEINFARTZ S., VEITH M., VENCES M., WAGNER N., PASMANS F. & LÖTTERS S. (2016). Expanding distribution of lethal amphibian fungus *Batrachochytrium salamandrivorans* in Europe. *Emerg. Infect. Dis.*, **22**, 1286–1288.

SPITZEN-VAN DER SLUIJS A., STEGEN G., BOGAERTS S., CANESSA S., STEINFARTZ S., JANSSEN N., BOSMAN W., PASMANS F. & MARTEL A. (2018). Post-epizootic salamander persistence in a disease-free refugium suggests poor dispersal ability of *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Scientific Reports*, **8**, 3800.

STEGEN G., PASMANS F., SCHMIDT B.R., ROUFFAER L.O., VAN PRAET S., SCHAUB M., CANESSA S., LAUDELOUT A., KINET T., ADRIAENSEN C., HAESEBROUCK F., BERT W., BOSSUYT F. & MARTEL A. (2017). Drivers of *Batrachochytrium salamandrivorans* mediated salamander extirpation. *Nature*, **544**, 353–356. doi: 10.1038/nature22059

THOMAS V., BLOOI M., VAN ROOIJ P., VAN PRAET S., VERBRUGGHE E., GRASELLI E., LUKAC M., SMITH S., PASMANS F. & MARTEL A. (2018). Recommendations on diagnostic tools for *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Transbound. Emerg. Dis.*, **65**, e478-e488.

VAN ROOIJ P., MARTEL A., HAESEBROUCK F. & PASMANS F. (2015). Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Vet. Res.*, **46**, 137.

VAN ROOIJ P., PASMANS F., COEN Y. & MARTEL A. (2017). Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS One*, **12**, e0186269. doi: 10.1371/journal.pone.0186269

WHITE L.W., FORZÁN M.J., PESSIER A.P., ALLENDER M.C., BALLARD J.R., CATENAZZI A., FENTON H., MARTEL A., PASMANS F., MILLER D.L., OSSIBOFF R.J., RICHGELS K.L.D. & KERBY J.L. (2016). Amphibian: a case definition and diagnostic criteria for *Batrachochytrium salamandrivorans* chytridiomycosis. *Herpetological Review*, **47**, 207.

YAP T.A., KOO M.S., AMBROSE R.F., WAKE D.B. & VREDENBURG V.T. (2015). BIODIVERSITY: Averting a North American biodiversity crisis. *Science*, **349**, 481–482.

ZHIYONG Y., MARTEL A., WU J., VAN PRAET S., CANESSA S. & PASMANS F. (2018). Widespread occurrence of an emerging fungal pathogen in heavily traded Chinese urodelan species. *Conservation Letters*, **11**: e12436.

\*  
\*\*

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPTER 2.3.9.

# INFECTION WITH SPRING VIRAEMIA OF CARP VIRUS

## 1. Scope

Infection with spring viraemia of carp virus means infection with the pathogenic agent *Carp sprivivirus* (commonly known as spring viraemia of carp virus [SVCV]), of the Genus *Sprivivirus* and the Family *Rhabdoviridae*.

## 2. Disease information

### 2.1. Agent factors

#### 2.1.1. Aetiological agent

The virus genome is a non-segmented, negative-sense, single strand of RNA. The genome contains 11,019 nucleotides encoding five proteins in the following order: a nucleoprotein (N), a phosphoprotein (P), a matrix protein (M), a glycoprotein (G) and an RNA-dependent, RNA polymerase (L). The genome does not contain a non-virion (NV) gene between the G and L genes as is found in fish rhabdoviruses of the genus *Novirhabdovirus* (Ahne *et al.*, 2002). The type strain of SVCV is available from the American Type Culture Collection (ATCC VR-1390). Two complete genome sequences of the type strain have been submitted to Genbank (Genbank accession U18101 by Bjorklund *et al.* [1996] and Genbank accession AJ318079 by Hoffmann *et al.* [2002]). The complete genome sequence of isolates from China (People's Rep. of) has also been deposited in Genbank (Genbank accession DQ097384 by Teng *et al.* [2007] and Genbank accession EU177782 by Zhang *et al.* [2009]).

Stone *et al.* (2003) used sequence analysis of a 550 nucleotide region of the G-gene to compare 36 isolates from different fish species and geographical locations ~~that were previously identified by serology~~ as SVCV or pike fry rhabdovirus (PFRV) ~~by serology~~. The analysis showed that the isolates could be separated into four distinct genogroups and that all of the SVCV isolates could be assigned to genogroup I, sharing <61% nucleotide identity with viruses in the other three genogroups. Re-analysis of the sequence data generated for viruses assigned to Genogroup I identified four subgroups (Ia–d). Those viruses originating in Asia were assigned to Subgroup Ia, those from Moldova, the Ukraine and Russia to Subgroups Ib and Ic, and those from the UK to Subgroup Id.

#### 2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

There are limited published data on the stability of the pathogen in host tissues. There is also limited information on the stability of the virus in the tissues after death of a diseased animal. Detection of SVCV in the tissues of recently dead animals by ~~either both reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or and culture~~ may be possible ~~should not be ruled out~~, and therefore, dead fish ~~as well as moribund~~ should ~~may~~ be taken for analysis if moribund fish are not available.

The virus can be stored for several months when frozen in medium containing 2–5% serum. The virus is most stable at lower temperatures, with little loss of titre ~~for~~ when stored for 1 month at –20°C for 1 month, or for 6 months at –30 or –74°C for 6 months (Ahne, 1976; de Kinkelin & Le Berre, 1974). The virus ~~is~~ remains stable over four freeze (–30°C)–thaw cycles in medium containing 2% serum (de Kinkelin & Le Berre, 1974).

#### 2.1.3. Survival and stability outside the host

The virus ~~has been shown to~~ can remain viable-infectious outside the host for 5 weeks in river water at 10°C and for more than 6 weeks in pond mud at 4°C, reducing to 4 days in pond mud at 10°C (Ahne, 1976).

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 SVCV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Animal Health Code (Aquatic Code)* are: all varieties and subspecies of common carp (*Cyprinus carpio*), bighead carp (*Aristichthys nobilis*), bream (*Abramis brama*), Caspian white fish (*Rutilus kutum*), fathead minnow (*Pimephales promelas*), golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*), goldfish (*Carassius auratus*), grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), roach (*Rutilus rutilus*) and sheatfish (also known as European or wels catfish) (*Silurus glanis*).

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Cyprinidae</u>	<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>	Fathead minnow
	<i>Rutilus kutum</i>	Caspian white fish
<u>Siluridae</u>	<i>Rutilus rutilus</i>	Roach
	<i>Silurus glanis</i>	Sheatfish (also known as European or wels catfish) Wels catfish

### 2.2.2. Species with incomplete evidence for susceptibility

Species for which there is incomplete evidence for susceptibility according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: Crucian carp (*Carassius carassius*), pike (*Esox lucius*), firebelly newt (*Cynops orientalis*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and yellow perch (*Perca flavescens*) and zebrafish (*Danio rerio*).

Evidence is lacking for these species to either confirm that the identity of the pathogenic agent is SVCV, transmission mimics natural pathways of infection, or presence of the pathogenic agent constitutes an infection.

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Cyprinidae</u>	<i>Carassius carassius</i>	Crucian carp
	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Silver carp
<u>Esoxidae</u>	<i>Esox lucius</i>	Northern pike
<u>Percidae</u>	<i>Perca flavescens</i>	Yellow perch
<u>Salamandridae</u>	<i>Cynops orientalis</i>	Firebelly newt

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:

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
<u>Catostomidae</u>	<i>Catostomus commersonii</i>	White sucker
<u>Cichlidae</u>	<i>Sarotherodon niloticus</i>	Nile tilapia
	<i>Oreochromis niloticus</i>	
<u>Cyprinidae</u>	<i>Notropis atherinoides</i>	Emerald shiner
	<i>Cirrhinus mrigala</i>	Mrigal carp
	<i>Labeo rohita</i>	Rohu
	<i>Tinca tinca</i>	Tench
<u>Penaeidae</u>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Pacific white shrimp
<u>Salmonidae</u>	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon
	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Sockeye salmon
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Steelhead trout

### 2.2.3. Non-susceptible species

Species that have been found non-susceptible to infection with SVCV according to Chapter 1.5. of the *Aquatic Code* are: Largemouth bass (*Micropterus salmoides*), Muskellunge (*Esox masquinongy*), and Walleye (*Sander vitreus*).

<u>Family</u>	<u>Scientific name</u>	<u>Common name</u>
---------------	------------------------	--------------------



Centrarchidae	<i>Micropterus salmoides</i>	Largemouth bass
Esocidae	<i>Esox masquinongy</i>	Muskellunge
Percidae	<i>Sander vitreus</i>	Walleye

### 2.2.4-3. Likelihood of infection by species, host life stage, population or sub-populations

Common carp varieties are the principal hosts for SVCV and are considered to be most likely susceptible to be infected with SVCV followed, in order of susceptibility, by other carp species (including hybrids), other susceptible cyprinid species and finally susceptible non-cyprinid fish species. When sampling during surveillance programmes for SVCV, common carp or strains such as koi or ghost (koi x common) carp are preferentially selected, followed by carp hybrids (e.g. common carp x crucian carp), then other carp species such as crucian carp, goldfish, grass carp, bighead carp and silver carp. Should these species not be available then other known susceptible species should be sampled. Cyprinid species may be increasingly mixed together in polyculture systems and the risk of transmission of SVCV between species during disease outbreaks is high (Billard & Berni, 2004).

Generally, young fish up to one-year old are most susceptible to likely to demonstrate clinical signs of disease, but all age groups can be affected. Moreover, there is a high variability in the degree of susceptibility to infection with SVCV among individuals of the same fish species. Apart from the physiological state of the fish, the role of which is poorly understood, age or the age-related status of innate immunity appears to be extremely important to the manifestation of clinical disease: the younger the fish, the higher the susceptibility are more likely to show signs of overt disease, although even adult broodfish can be susceptible to infection.

Fish that have separated from the shoal and found at the water inlet or sides of a pond are more likely to be infected.

For the purposes of Table 4.1 carp larvae and fry (e.g. up to approximately 1 g in weight) may be considered early life stages, carp may be considered juveniles (i.e. fingerlings and grower fish) up to 250 g, and adults are above 250 g.

### 2.2.5-4. Distribution of the pathogen in the host

The transmission of SVCV is horizontal (Fijan, 1988). SVCV appears to enter via the gills and then spreads to the kidney, liver, heart, spleen and alimentary tract. During disease outbreaks high titres of virus occur in the liver and kidney of infected fish, but much lower titres occur in the spleen, gills and brain (Dixon, 2008). The virus has been detected in ovarian fluid (Bekesi & Csontos, 1985), but vertical transmission has yet to be demonstrated.

### 2.2.6-5. Aquatic animal reservoirs of infection

Liu *et al.* (2004) isolated SVCV in China (People's Rep. of) from common and koi carp exhibiting no external or internal signs of disease, and similarly, the virus was isolated from apparently healthy wild carp in Canada (Garver *et al.*, 2007). Thus fish surviving infection with SVCV long-term subclinical infections may act as reservoirs of infection.

### 2.2.7-6. Vectors

The parasitic invertebrates *Argulus foliaceus* (Crustacea, Branchiura) and *Piscicola geometra* (Annelida, Hirudinea) have been demonstrated to transfer SVCV from diseased to healthy fish under experimental conditions and the virus has been isolated from *A. foliaceus* removed from infected carp (Ahne *et al.*, 2002; Dixon, 2008). It has been demonstrated experimentally that virus can be isolated from fish tissues regurgitated by herons (*Ardea cinerea*) 120 minutes after being fed with SVCV-infected carp, suggesting a potential route for SVCV transmission, but is not known whether such transmission has occurred in nature (Peters & Neukirch, 1986).

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

~~A noticeable increase in mortality will occur in the population during an outbreak of infection with SVCV there will be a noticeable increase in mortality in the population. Co-infections with koi herpesvirus or carp oedema virus can increase levels of mortality.~~ Disease patterns are influenced by water temperature, age and condition of the fish, population density and stress factors. The immune status of the fish is also an important factor with both nonspecific (e.g. interferon) and specific immunity (serum antibodies, cellular immunity) having important roles. Poor physiological condition of over-wintered fish may be a contributory factor to the onset of clinical disease in infected animals ~~susceptibility~~. In European aquaculture, losses can be up to 70% in young carp (Ahne *et al.*, 2002), but are usually from 1 to 40%.

In one survey from Serbia, the virus was isolated by culture in samples collected from 12 of the 38 hatcheries screened over the 10-year period (1992–2002) (Svetlana *et al.*, 2004). The virus occurred sporadically in different ponds on one site, and sporadically from year to year at different sites (Svetlana *et al.*, 2004). In another study, 18 of 30 tissue pools (five fish/pool) of wild, clinically healthy, common carp sampled in Canada in 2006 were positive for SVCV by culture (Garver *et al.*, 2007). ~~The isolation of SVCV in the latter case was from asymptomatic common carp which correlates with~~ This observation suggests that SVCV infection may ~~can often~~ be clinically inapparent (Fijan, 1999).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Fish can become lethargic, separate from the shoal and gather at the water inlet or sides of a pond and some may experience loss of equilibrium. Clinical signs of infection with SVCV are nonspecific and not all fish will exhibit all of the signs. Two of the most obvious and consistent features are abdominal distension and haemorrhages, which ~~The latter may be pale and~~ occur on the skin, fin bases, eyes and gills, ~~which may be pale~~. The skin may darken and exophthalmia is often observed. The vent may be swollen, inflamed and trail mucoid casts. ~~During an outbreak of infection with SVCV there will be a noticeable increase in mortality in the population. Diseased fish usually appear darker in colour.~~ There may be no clinical signs in cases with a sudden onset of mortality.

### 2.3.3. Gross pathology

There are no pathognomonic gross lesions. Lesions may be absent in cases of sudden mortality. Gross pathologies are mainly documented for common carp and may include excess ascitic fluid in the abdominal cavity, usually containing blood, degeneration of the gill lamellae and inflammation of the intestine, which contains mucous instead of food. Oedema and haemorrhage of the visceral organs is commonly observed (the spleen is often enlarged), and organs adhere to each other and to the peritoneum. Focal haemorrhages may be seen in the muscle and fat tissue, as well as in the swim bladder (see Dixon, 2008). However, petechial haemorrhages are infrequent ~~uncommon~~ in cases caused by Asian strains of SVCV (Dikkeboom *et al.*, 2004).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

The transmission of SVCV is horizontal (Fijan, 1988). Horizontal transmission may be direct, or via water, fomites or vectors (Section 2.2.7) (Fijan, 1988). The virus appears to enter the host via the gills. A viraemia follows and the virus rapidly spreads to the liver, kidney, spleen and alimentary tract. The virus can be detected in faeces and is also shed into the water via faeces and urine (Ahne, 1982).

Vertical ~~or~~ and 'egg-associated' transmission cannot be ruled out following one report of isolation of SVCV from carp ovarian fluid, although there have been no further reports (Bekesi & Csontos, 1985).

~~Horizontal transmission may be direct or vectorial, water being the major abiotic vector (Fijan, 1988). Animate vectors (Section 2.2.6.) and fomites may also be involved in transmission of SVCV (Fijan, 1988). Once SVCV is established in populations, it may be very difficult to eradicate without destroying all susceptible species and vectors types of life at the site.~~

### 2.3.5. Environmental and management factors

Disease outbreaks in carp generally occur between 11 and 17°C. They rarely occur below 10°C, and mortalities, particularly in older fish, decline as the temperature exceeds 22°C (Fijan, 1988). However, the virus was isolated from apparently healthy fish from a lake in Canada that had been sampled over a 13-day

period during which the water temperature varied between 24.2°C and 27.3°C (Garver *et al.*, 2007). These fish may have been more susceptible to infection as they were penned and detection was during spawning. Secondary and concomitant bacterial ~~and/or~~ parasitic infections can affect the mortality rate and ~~display the appearance of clinical~~ signs. In carp, the disease is often observed during in-springtime (hence the common name for the disease), particularly in countries having cold winters. It is believed that the poor condition of the over-wintered fish may be a contributory factor in ~~the disease~~ occurrence of clinical disease. Clinical ~~The disease~~ can occur in fish in quarantine following the stress of transportation, even though there has been no evidence of infection prior to transportation.

### 2.3.6. Geographical distribution

For a long time, the geographical range of SVCV was limited to countries of the European continent that experience low water temperatures during winter. ~~Consequently~~ The disease has been recorded from most European countries, ~~and from certain of the western Independent States of the former Soviet Union (Belarus, Georgia, Lithuania, Moldova, Russia and the Ukraine) (see Dixon 2008 for references to these and the following locations).~~ However, in 1998, the disease was recorded in South America (in goldfish in a lake in Brazil) and in 2002 in the USA, North America, and in 2006 in Canada. The virus was first detected in Asia ~~Detection of the virus in carp in China (People's Rep. of) was confirmed in 2004.~~

For recent information on distribution at the country level consult the WAHIS interface ([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en)).

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

A safe and effective vaccine is not currently available; however, ~~a number the efficacy of an experimental DNA vaccine has been investigated~~ inactivated preparations, live attenuated vaccines and DNA vaccines have given encouraging results (Dixon, 2008, (Emmenegger & Kurath, 2008). ~~The use of live attenuated vaccines or the DNA vaccines might affect diagnostic performance.~~

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Methisoprinol inhibits the replication of SVCV *in vitro*, but has not been tested under carp culture conditions (Siwicki *et al.*, 2002).

### 2.4.3. Immunostimulation

Injection into carp of single-stranded and double-stranded RNA (which is an interferon inducer) protected carp for longer than 3 weeks, but the treatment is not effective by bath administration (Alikin *et al.*, 1996).

### 2.4.4. Breeding resistant strains

The "Krasnodar" strain of common carp has been bred for increased resistance to SVCV (Kirpichnikov *et al.*, 1993).

### 2.4.5. Inactivation methods

The virus is inactivated at 56°C for 30 minutes, at pH 12 for 10 minutes and pH 3 for 2 hours (Ahne, 1986). Oxidising agents, sodium dodecyl sulphate, non-ionic detergents and lipid solvents are all effective for inactivation of SVCV. ~~The following disinfectants are also effective for inactivation~~ inactivate the virus: 3% formalin for 5 minutes, 2% sodium hydroxide for 10 minutes, 540 mg litre<sup>-1</sup> chlorine for 20 minutes, 200–250 ppm (parts per million) iodine compounds for 30 minutes, 100 ppm benzalkonium chloride for 20 minutes, 350 ppm alkyltoluene for 20 minutes, 100 ppm chlorhexidine gluconate for 20 minutes and 200 ppm cresol for 20 minutes (Ahne, 1982; Ahne & Held, 1980; Kiryu *et al.*, 2007).

### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Eggs can be disinfected by iodophor treatment (Ahne & Held, 1980).

### 2.4.7. General husbandry

Methods to control of infection with SVCV ~~rely~~ ~~rely~~ on avoiding exposure to the virus coupled with good hygiene practices. This is feasible on small farms supplied by spring or borehole water and a secure system to prevent fish entering the farm via the discharge water. ~~Hygiene measures should include disinfection of eggs by iodophor treatment (Ahne & Held, 1980), until it has been confirmed unequivocally that vertical transmission does not occur, regular disinfection of ponds, chemical disinfection of farm equipment, careful handling of fish to avoid stress and safe disposal of dead fish.~~ Reducing fish stocking density during winter and early spring will reduce the spread of the virus. In rearing facilities with a controlled environment, elevation of water temperature above 19–20°C may stop or prevent outbreaks of infection with SVCV.

## 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

~~Sampling samples, target comprise of susceptible species on the site with each group being represented in the sample. A group is defined as a. The population to be sampled may be stratified into groups of the same fish species that shares a common water supply and originate from the same broodfish or spawning population. Generally young Moribund fish up to 1 year old are most susceptible to clinical disease, but all age groups can be affected. Any moribund fish present in the fish population to be sampled should be sampled selected first for sample collection and the remainder of the samples should comprise randomly selected live fish from all groups of susceptible species rearing units that represent the lot being examined.~~

Clinical inspections should be carried out during a period when the water temperature is between 11°C and 17°C. All production units (ponds, tanks, net-cages, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. Particular attention should be paid to the water outlet area where weak fish tend to accumulate due to the water current.

For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows:

- i) Common carp or strains such as koi or ghost (koi x common) carp are preferentially selected, followed by carp hybrids (e.g. common carp x crucian carp), then other carp-cyprinid species such as crucian carp, goldfish, grass carp, bighead carp, bream and roach-silver carp. Susceptible species should be sampled proportionally, or following risk-based criteria for targeted selection of lots or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. via untreated surface water, wild harvest or replacement with stocks of unknown disease status).
- ii) If more than one water source is used for fish production, fish from the highest risk water source should be targeted. If all water sources are of equal risk, all water sources should be included in the sample.
- iii) If weak, abnormally behaving or freshly dead (not decomposed) fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the fish selected should include normal appearing, healthy fish collected in such a way that all parts of the farm as well as all year classes are proportionally represented in the sample.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with SVCV should be collected. Ideally fish should be collected while alive, however, recently dead fish can also be selected for diagnostic testing purposes. 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. There may be no clinical signs or gross pathognomonic lesions and no clinical signs in cases of sudden mortality (~~see Section 4.1.1.~~).

### 3.2. Selection of organs or tissues

Kidney, spleen, gill and encephalon should be selected from subclinically infected fish (apparently healthy fish).

For clinically affected fish: whole  fry ~~alevin~~ (body length ≤ 4 cm), entire viscera including kidney and ~~encephalon~~ brain (> 4 cm body length ≤ 6 cm) or, for larger ~~sized~~ fish, liver, kidney, spleen and encephalon should be selected.

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

Virus isolation may also not be possible from decomposed clinical samples. A number of studies in which attempts were made to isolate virus from reproductive fluids were unsuccessful, although and seminal fluid samples are not suitable. While the virus has been isolated at low frequency from ovarian, but not seminal, fluids, the suitability of these tissues for detection of SVCV samples has not been substantiated (Bekesi & Csontos, 1985).

### 3.4. Non-lethal sampling

Serological assays for antibodies can be undertaken on blood samples; the and can indicate possible exposure to SVCV, however, serology is not a suitable test for making a suspect diagnosis, can only be used for a presumptive diagnosis given cross reactivity of anti-SVCV antibodies with viruses of the species pike fry sprivivirus allows for a presumptive indication of infection with SVCV.

### 3.5. Preservation of samples for submission

For guidance on sample preservation methods for the intended test methods, see Chapter 2.2.0 or 2.3.0 or 2.4.0.

#### 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).

Samples for virus isolation (Section 3.2.) should be transported to the laboratory at 4°C using refrigerated containers or on ice, preferably in virus transport medium and tested within 24 hours or, in exceptional circumstances, 48 hours. The shipment of organ samples is preferred, but live or whole dead fish can be submitted to the testing laboratory if necessary. If this is not possible, samples can be frozen, but there may be loss of virus viability on thawing the samples. Repeated freeze-thawing of the sample must be avoided.

#### 3.5.2. Preservation of Fixed 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. [Alternatives to ethanol can be mentioned if they can be referenced.]

The material collected for virus culture is generally used for the molecular diagnostic assays, but additional tissue samples for RT-PCR can be preserved in commercially available RNA preservation solutions according to the manufacturers' recommendations, or, alternatively, samples can be preserved in 80–90% (v/v) analytical grade (absolute) ethanol at the recommended ratio of ethanol to tissue of 10:1.

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

Histology samples from each individual fish must be taken placed into 10% neutral buffered formalin (NBF) immediately after collection to prevent sample deterioration. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1 and each sample should be cut cleanly and be no thicker than approximately 4 mm to allow the fixative to penetrate the material and should be cut cleanly. Standard methods for histopathology can be found in Chapter 2.3.0 General information (diseases of fish).

#### 3.5.4. Fixed Samples for electron microscopy

EM sampling is Samples for electron microscopy are not routinely required as standard, and the material is and are collected only when where it is considered beneficial to facilitate potential further diagnostic investigation work. From each fish sampled, a 2 mm cubed (approximately) sample section from each of the appropriate organs described in section 3.2 should be fixed in glutaraldehyde; the recommended ratio of fixative to tissue is 10:1.

### 3.5.5 ~~4~~. Samples for other tests

Tubes for the separation of serum are available commercially. After collection, the blood is allowed to clot by leaving it undisturbed at room temperature. This usually takes 15–30 minutes. Serum is clarified by centrifuging at 1000–2000 **g** for 10 minutes ~~in a refrigerated centrifuge at 4–8°C.~~

~~It is important to immediately transfer the liquid component (serum) into a clean polypropylene tube using a Pasteur pipette and maintain the samples at 2–8°C while handling. If the serum is not analysed immediately, it should be apportioned into 0.5 ml aliquots, stored, and transported at –20°C or lower. It is important to avoid freeze–thaw cycles because this is detrimental to many serum components. Samples that are haemolysed, icteric or lipaemic can invalidate certain tests.~~

### 3.6. Pooling of samples

~~Traditionally pools of five animals have been used and more recently this has been increased to pools of ten animals for virus culture. However, no published data on the effect of pooling on test characteristics has been published.~~

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

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations), ii) presumptive and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage. The designations used in the Table indicate:

Key:

- +++ = Recommended method(s) validated for the purpose shown and usually to stage 3 of the OIE Validation Pathway;
- ++ = Suitable method(s) but may need further validation;
- + = May be used in some situations, but cost, reliability, lack of validation or other factors severely limits its application;

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.

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

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

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

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

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6).

<sup>2</sup>Early and juvenile life stages have been defined in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Histopathology and cytopathology can be validated if the results from different operators have been statistically compared.

<sup>4</sup>Sequencing of the PCR product.

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

#### 4.1. Wet mounts

Not applicable.

#### 4.2. ~~Histo-pathology~~ and cytopathology

Histopathological changes can be observed in all major organs. In the liver, blood vessels show oedematous perivascularitis progressing to necrosis. Liver parenchyma shows hyperaemia with multiple focal necrosis and degeneration. The heart shows pericarditis and infiltration of the myocardium progressing to focal degeneration and necrosis. The spleen shows hyperaemia with hyperplasia of the reticuloendothelium and enlarged melanomacrophage centres, and the pancreas is inflamed with multifocal necrosis. In the kidney, damage is seen to excretory and haematopoietic tissue. Renal tubules are clogged with casts and the cells undergo hyaline degeneration and vacuolation. The intestine shows perivascular inflammation, desquamation of the epithelium and atrophy of the villi. The peritoneum is inflamed, and lymph vessels are filled with detritus and macrophages. In the swim bladder, the epithelial lamina changes from a monolayer to a discontinuous multi-layer and vessels in the submucosa are dilated with nearby lymphocyte infiltration.

As the histopathological ~~presentation picture~~ is not specific for the disease, and not all fish will exhibit each feature (Misk *et al.*, 2016), microscopic methods by themselves are not recommended for diagnosis of SVCV ~~as the histopathological picture is not specific for the disease~~. They may, however, provide supporting evidence, particularly, when ~~immunohistochemistry~~ immunohistological (IHC) or ~~nucleic acid~~ DNA-based *in-situ* hybridisation methods are used (see the relevant Sections below).

~~Fixed sections can also be used for histoimmunohistochemistry (but see caveats in Section 4.6.).~~

#### 4.3. Cell ~~or artificial media~~ culture for isolation

##### 4.3.1. Cell lines

~~If culturing viruses-~~ The recommended cell lines for SVCV detection are EPC, FHM or GCO. Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

EPC, FHM and GCO cells are grown at 20–30°C in suitable medium, e.g. Eagle's minimal essential medium (MEM or modifications thereof) with a supplement of 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics in standard concentrations. When the cells are cultivated in closed vials, it is recommended to buffer the medium with bicarbonate. The medium used for cultivation of cells in open units may be buffered with Tris-HCl (23 mM) and Na-bicarbonate (6 mM). The pH must be 7.6 ± 0.2. Cell culture plates should be seeded 4–48 hours and not 100% confluent prior to inoculation. 15–30 minutes prior to sample inoculation, cells should be pre-treated with 7% (w/v) PEG-20,000 solution (10–15 µl/cm<sup>2</sup>) (Batts & Winton, 1989; Wang *et al.*, 2016 ).

##### 4.3.2. Sample preparation and inoculation

###### *Cell culture*

Cell line to be used: EPC, FHM or GCO.

Virus isolation-extraction: Use the procedure described in Section A-2.2.2 of Chapter 2.3.0.

Inoculation of cell monolayers: make two serial tenfold dilutions of the 1/10 organ homogenate supernatants in cell culture medium (i.e. the homogenate supernatants will be 1/100 and 1/1000 dilutions of the original organ material) and transfer an appropriate volume of each of these two dilutions on to 24-hour-old cell monolayers drained of their culture medium. Alternatively, make a single tenfold dilution of the 1/10 organ homogenate (i.e. a 1/100 dilution of the original organ material) and add an appropriate volume of both the 1/10 and 1/100 dilutions directly to undrained 24 hour-old cell monolayers, to effect 1/100 and 1/1000 final dilutions of the organ homogenate. Should toxicity of the sample be a problem, make two serial tenfold dilutions of the 1/10 organ homogenate supernatants in cell culture medium as described above and inoculate at least 2 cm<sup>2</sup> of drained cell monolayer with 100 µl of each dilution. Allow to adsorb for 0.5–1 hour at 10–15°C, withdraw the inoculum and add cell culture medium buffered at pH 7.6 and supplemented with 2% fetal calf serum (FCS) (1 ml well<sup>-1</sup> for 24-well cell culture plates). Incubate at 20°C.

Monitoring incubation: Follow the course of infection in positive controls and other inoculated cell cultures by microscopic examination at x40–100 magnification for 7 days. The use of a phase-contrast microscope is recommended.



Maintain the pH of the cell culture medium at between 7.3. and 7.6. during incubation. This can be achieved by the addition to the inoculated medium of sterile bicarbonate buffer (for tightly closed cell culture flasks) or HEPES-buffered medium (HEPES = N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulfonic acid) or 2 M Tris (Tris [hydroxymethyl] aminomethane)/HCl buffer solution (for cell culture plates).

**The cytopathic effect (CPE) is characterised by rounding, detachment and lysis of cells (Fijan, 1999).** If a CPE appears in those cell cultures inoculated with the dilutions of the tested homogenate supernatants, identification procedures must be undertaken immediately ~~(see Section 4.6.2).~~

Subcultivation procedures: Using a pipette, try to dislodge cells from the cell culture vessels and collect aliquots of cell culture medium plus cells from all inoculated monolayers, keeping different groups separate. The aliquots of the 1/100 and 1/1000 dilutions are pooled and inoculated on to fresh 24 hour-old cell cultures to effect 1/10 and 1/100 final dilutions of the pooled aliquots. Incubate and monitor as described above. ~~If no CPE occurs, the test may be declared negative.~~

If no CPE occurs the test may be declared negative. However, if undertaking surveillance to demonstrate freedom from SVCV it would be advisable to screen the cells at the end of the 14 days using an SVCV-specific RT-PCR ~~or real-time RT-PCR~~ (Section 4.4). Following a positive result culture should be re-attempted.

Following isolation, the virus must be identified, and this can be achieved by antigen detection methods, virus neutralisation or nucleic acid identification methods. The former two methods are generally regarded as presumptive unless fully validated monoclonal or polyclonal antibodies are used, as cross reactions with other viruses occur. Commercially available kits using polyclonal antibodies may also lack specificity, and those using monoclonal antibodies may not detect all subgenogroups of SVCV (Dixon & Longshaw, 2005). Nucleic acid detection methods must always be followed up by sequencing or use of a method such as reverse hybridisation (Sheppard *et al.*, 2007) to confirm the identity of the virus.

## 4.4. Nucleic acid amplification

### 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 if available and validated.

Real-time RT-PCR assays are available to detect and confirm ~~infection with~~ SVCV (Yue *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), however, they are not currently recommended as they have not been sufficiently validated.

### 4.4.2. Conventional **RT-PCR**

~~The following controls should be run with each assay: negative extraction control; positive control; no template control; internal PCR control.~~ Positive and negative controls should be run with each stage of the assays: extraction, RT-PCR and second round PCR. Due to the sensitive nature of PCR-based assays it is highly recommended that master mix, template addition and PCR amplification occur in designated hoods or spatially separated areas.

*Nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (confirmation of virus identity from cell culture isolation or directly from fish tissue extracts)*

The genome of SVCV consists of a single strand of RNA of approximately 11 kb, with negative polarity. Amplification of a 714 bp fragment of SVCV cDNA is performed using primers derived from sequences of the region coding for the glycoprotein gene: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3' (SVCV F1) and 5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH\*-ACN\*-CAY\*-3' SVCV R2), using a modification of the method of Stone *et al.* (2003).

- i) Total RNA is extracted from 100 µl of supernatant from cell cultures exhibiting CPE or 50 µl of fish tissue extract and dissolved in 40 µl molecular biology grade DNase- and RNase-free water.

A number of total RNA extraction kits are available commercially that will produce high quality RNA suitable for RT-PCR. Examples are Trizol Reagent<sup>®</sup> (RL, Life Technologies, Paisley, UK), SV Total RNA isolation system (Promega) and Nucleospin<sup>®</sup> RNA (AB gene), EZ virus mini kit, Ez RNA tissue mini kit (Qiagen).

- ii) For cDNA synthesis, a reverse transcription reaction is performed at 37°C for 1 hour in a 20 µl volume consisting of 1 × M-MLV RT reaction buffer (50 mM Tris, pH 8.3, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 3 mM MgCl<sub>2</sub>) containing 1 mM dNTP, 100 pmol SVCV R2 primer, 20 units M-MLV reverse transcriptase (Promega, Southampton, UK) or an equivalent reverse transcriptase system and 1/10 of the total RNA extracted above.
- iii) **RT**-PCR is performed in a 50 µl reaction volume 1 × PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, and 0.1% Triton X-100) containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 50 pmol each of the SVCV R2 and SVCV F1 primers, 1.25 units of Taq DNA polymerase, and 2.5 µl reverse transcription reaction mix. The reaction mix is subjected to 35 temperature cycles of: 1 minute at 95°C, 1 minute at 55°C and 1 minute at 72°C followed by a final extension step of 10 minutes at 72°C. Amplified DNA (714 bp) is analysed by agarose gel electrophoresis.
- iv) If the CPE in culture is not extensive it is possible that a visible product will not be generated using a single round of amplification. To avoid such problems, use the semi-nested assay using primers: 5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR\*-R\*TC-3' (SVCV F1) and 5'-CTG-GGG-TTT-CCN\*-CCT-CAA-AGY\*-TGY\*-3' (SVCV R4) according to Stone *et al.* (2003).
- v) The second round of PCR is performed in a 50 µl reaction volume 1 × PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, and 0.1% Triton X-100) containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTPs, 50 pmol each of the SVCV R4 and SVCV F1 primers, 1.25 units Taq DNA polymerase, and 2.5 µl of the first round product. The reaction mix is subjected to 35 temperature cycles of: 1 minute at 95°C, 1 minute at 55°C and 1 minute at 72°C followed by a final extension step of 10 minutes at 72°C. Amplified DNA (606 bp) is analysed by agarose gel electrophoresis.
- vi) All amplified products are confirmed as SVCV in origin by sequencing, and the SVCV subtype (Ia-Ic) is identified using a BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) or by phylogenetic analysis using the SVCV sequences available in public sequence databases. Phylogenetic analysis is undertaken using a 426 bp region corresponding to nucleotides 429–855 of the glycoprotein gene.
- vii) In cases where the CPE is extensive and the virus replicates to a high titre, or where a semi-nested RT-PCR assay was used, sufficient PCR amplicon will be available for direct sequencing. Where the amplified product is weak it is recommended that the product be inserted into an appropriate sequencing vector (e.g. pGEM-T, pCR® 4-TOPO®) prior to undertaking the sequencing. At least two independent amplification and sequencing events should be undertaken to eliminate potential sequence errors introduced by the Taq polymerase.

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

**NOTE:** The appropriate IUB codes have been used where appropriate and are indicated by an asterisk (\*).

Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (confirmation of virus identity)

Additional conventional RT-PCR assays are available to detect and confirm SVCV infections (Koutna *et al.*, 2003; Shimahara *et al.*, 2016). A generic primer set based on the polymerase gene also identifies viruses from both the *Sprivirus* and *Perhabdovirus* genera and can be used to screen a virus culture (Ruane *et al.*, 2014). With the exception of the conventional **RT**-PCR assay developed by Shimahara *et al.* (2016) the other assays were not sufficiently fully-validated against representatives from each of the recognised SVCV genogroups and they may fail to detect the full range of SVCV genotypes.

A summary of the Shimahara *et al.* (2016) RT-PCR method follows. Amplification of a 369 bp fragment of SVCV glycoprotein gene is performed using primers as follows: SVCV-G1: 5'-TGA-AGA-YTG-TGT-CAA-TCA-AGTC-3' and SVCV-G2: 5'-GCG-ART-GCA-GAG-AAA-AAG-TG-3'. Preparation of RNA template is the same as nested RT-PCR above. Reverse transcription of SVCV RNA and amplification of cDNA are carried out using SuperScript III one-step RT-PCR with PlatinumR Taq (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The RT-PCR reaction mixture contained 10 pmol of each primer, 12.5 µl of 2x reaction mix, 1 µl of SuperScript III RT/Platinum Taq Mix and 2.5 µl template. After reverse transcription at 50°C for 30 minutes and 94°C for 2 minutes, 40 amplification cycles of 94°C for 15 seconds, 56°C for 30 seconds and 68°C for 1 minute followed by a final extension step at 68°C for 7 minutes is performed. All amplified products are confirmed as SVCV in origin by sequencing.

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

Loop-mediated isothermal amplification assays are available to detect and confirm SVCV infections (Shivappa *et al.*, 2008), however, they are currently not recommended as they are not sufficiently validated.

~~Infection with SVCV has also been confirmed-detected using RT-PCR and hybridisation with non-radioactive probes to determine the genotype (Orshkova *et al.*, 1999; Sheppard *et al.*, 2007), however, it is currently not recommended as it is not sufficiently validated.~~

#### 4.5. Amplicon sequencing

~~See above (Section 4.4.2). All Nucleotide sequencing of all RT-PCR amplicons should be sequenced to confirm that they are SVCV in origin (Section 4.4.2) is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. SVCV-specific products-sequences will share a higher degree of nucleotide identity-similarity to one of the published reference sequences for SVCV (Genbank accession U18101, AJ318079, DQ097384 and EU177782) compared to the published reference sequences for the Pike spriviviruses (GenBank FJ872827, KC113518 and KC113517).~~

#### 4.6. *In-situ* hybridisation (and histoimmunochemistry)

~~Although *in-situ* hybridisation can be used to locate SVCV the virus in different tissues on-in known positive animals, but this assay is currently not recommended as it has not been well-validated as a diagnostic tool for the detection of SVCV as a diagnostic tool.~~

#### 4.7. Immunohistochemistry

~~SVCV can be detected by immunohistochemistry, however, care must be taken with interpreting the results of serological these tests for SVCV, and positive results from antibody-based assays should be confirmed by RT-PCR and sequencing (see Section 4.8.).~~

- i) Bleed the fish thoroughly.
- ii) Make kidney imprints on cleaned glass slides or at the bottom of the wells of a plastic cell culture plate.
- iii) Store and transport the kidney pieces as indicated in Section 2.2.1 of Chapter 2.3.0. together with the other organs required for virus isolation.
- iv) Allow the imprint to air-dry for 20 minutes.
- v) Fix with cold acetone (stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) for glass slides or 80% acetone in water or 30% acetone in ethanol, also at  $-20^{\circ}\text{C}$ , for plastic wells. Let the fixative act for 15 minutes. Allow the imprints to air-dry for at least 30 minutes and process immediately or freeze at  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- vi) Rehydrate the imprints if they have been stored frozen by four rinsing steps with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST), and remove this buffer completely after the last rinse. Block with 5% skim milk or 1% bovine serum albumin, in PBST for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ .
- vii) Rinse four times with PBST, 5 minutes for each rinse. The slides or plastic culture plates can be gently agitated during the rinses.
- viii) Prepare a solution of purified antibody or serum to SVCV in PBST, at the appropriate dilution (which has been established previously or as given by the reagent supplier).
- ix) Incubate the imprints with the antibody solution for 1 hour at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humid chamber and do not allow evaporation to occur.
- x) Rinse four times with PBST.

- xi) Incubate the imprints with a solution of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody to the immunoglobulin used in the first layer and prepared according to the instructions of the supplier. These FITC antibodies are most often rabbit or goat antibodies.
- xii) Rinse four times with PBST.
- xiii) View the treated imprints on plastic plates immediately, or mount the slides with cover-slips using glycerol saline at pH 8.5, or a commercially-available mountant.
- xiv) Examine under incident ultraviolet (UV) light using a fluorescence microscope with x10 eye pieces and x20 or x40 objective lenses having numerical aperture of >0.65 and >1.3, respectively. Positive and negative controls must be found to give the expected results prior to any other observation.

#### 4.8. Bioassay

Not available.

#### 4.9. ~~Antibody-based~~ or ~~antigen-based~~ detection methods (ELISA, etc.)

~~Serological Antibody- or antigen-based~~ methods that detect SVCV must be regarded as presumptive unless fully validated monoclonal or polyclonal antibodies are used, as cross reactions with other ~~viruses~~ closely related spriviviruses (PFRV, GrCRV and TenRV) may occur. Commercially available kits using polyclonal antibodies may lack specificity, and those using monoclonal antibodies may not detect all subgenogroups of SVCV (Dixon & Longshaw, 2005). These techniques should not be used as a screening method.

##### 4.9.1. Antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

~~Virus identification by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)~~

- i) Coat the wells of microplates designed for ELISAs with appropriate dilutions of purified immunoglobulins (Ig) specific for SVCV, in 0.02 M carbonate buffer, pH 9.5 (200 µl well<sup>-1</sup>). Ig may be polyclonal or monoclonal Ig originating most often from rabbit or mouse, respectively. For the identification of SVCV, monoclonal antibodies (MAbs) specific for certain domains of the nucleocapsid (N) protein are suitable.
- ii) Incubate overnight at 4°C.
- iii) Rinse four times with PBST.
- iv) Block with skim milk (5% in carbonate buffer) or other blocking solution for 1 hour at 37°C (300 µl well<sup>-1</sup>).
- v) Rinse four times with PBST.
- vi) Add 2% non-ionic detergent (Triton X-100 or Nonidet P-40) to the virus suspension to be identified.
- vii) Dispense 100 µl well<sup>-1</sup> of two- or four-step dilutions of the virus to be identified, and of the non-infected cell culture harvest (negative control). Also include SVCV positive control virus. Incubate for 1 hour at 37°C.
- viii) Rinse four times with PBST.
- ix) Add to the wells, 200 µl of horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated MAb or polyclonal antibody to SVCV; or polyclonal IgG to SVCV. An MAb to N protein specific for a domain different from the one of the coating MAb and previously conjugated with biotin can also be used. Incubate for 1 hour at 37°C.
- x) Rinse four times with PBST.
- xi) If HRPO-conjugated antibody has been used, go to step xiii. Otherwise, add 200 µl of HRPO-conjugated streptavidin or ExtrAvidin (Sigma) to those wells that have received the biotin-conjugated antibody and incubate for 1 hour at 37°C.
- xii) Rinse four times with PBST.
- xiii) Add 200 µl of a suitable substrate and chromogen, such as tetramethylbenzidine dihydrochloride. Stop the course of the test when positive controls react, and read the results.

*Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using tissue homogenates*

See Section A-2.2.2 of Chapter 2.3.0, for obtaining organ homogenates.

- i) Coat the wells of microplates designed for ELISAs with appropriate dilutions of purified immunoglobulins (Ig) specific for SVCV, in 0.02 M carbonate buffer, pH 9.5 (200 µl well<sup>-1</sup>). Ig may be polyclonal or monoclonal Ig originating most often from rabbit or mouse, respectively. For the identification of SVCV, monoclonal antibodies (MAbs) specific for certain domains of the nucleocapsid (N) protein are suitable.
- ii) Incubate overnight at 4°C.
- iii) Rinse four times with PBST.
- iv) Block with skim milk (5% in carbonate buffer) or other blocking solution for 1 hour at 37°C (300 µl well<sup>-1</sup>).
- v) Rinse four times with PBST.
- vi) Store a 1/4 aliquot of each homogenate at 4°C, in case the test is negative and virus isolation in cell culture is required.
- vii) Treat the remaining part of the homogenate with 2% Triton X-100 or Nonidet P-40 and 2 mM of phenyl methyl sulphonide fluoride; mix gently.
- viii) Dispense 100 µl well<sup>-1</sup> of two- or four-step dilutions of the sample to be identified, and of negative control tissues. Also include an SVCV positive control virus. Incubate for 1 hour at 37°C.
- ix) Rinse four times with PBST.
- x) Add to the wells, 200 µl of horseradish peroxidase (HRPO)-conjugated MAb or polyclonal antibody to SVCV; or polyclonal IgG to SVCV. A MAb to N protein specific for a domain different from the one of the coating MAb and previously conjugated with biotin can also be used. Incubate for 1 hour at 37°C.
- xi) Rinse four times with PBST.
- xii) If HRPO-conjugated antibody has been used, go to step xiv. Otherwise, add 200 µl of HRPO-conjugated streptavidin or ExtrAvidin (Sigma) to those wells that have received the biotin-conjugated antibody and incubate for 1 hour at 37°C.
- xiii) Rinse four times with PBST.
- xiv) Add 200 µl of a suitable substrate and chromogen, such as tetramethylbenzidine dihydrochloride. Stop the course of the test when positive controls react, and read the results.
- xv) If the test is negative, process the organ samples stored at 4°C, for virus isolation in cell culture as described in Section 4.3.

#### **4.9.2. Indirect fluorescent antibody test (IFAT)**

##### ~~Virus identification~~ Confirmation of virus identity by the indirect fluorescent antibody test (IFAT)

- i) Prepare monolayers of cells in 2 cm<sup>2</sup> wells of plastic cell culture plates, flasks or on cover-slips or glass slides in order to reach approximately 80% confluency within 24 hours of incubation at 25°C (seed six cell monolayers per virus isolate to be identified, plus two for positive and two for negative controls). The FCS content of the cell culture medium can be reduced to 2–4%. If numerous virus isolates have to be identified, the use of Terasaki plates is strongly recommended.
- ii) When the cell monolayers are ready for infection, i.e. on the same day or on the day after seeding, inoculate the virus suspensions to be identified by making tenfold dilution steps directly in the cell culture wells or flasks. For tests using cells cultured on glass cover-slips or slides, the dilutions are made in sterile containers and then used to inoculate the cells.
- iii) Dilute the control virus suspension of SVCV in a similar way, in order to obtain a virus titre of about 5000–10,000 PFU ml<sup>-1</sup> in the cell culture medium.
- iv) Incubate at 20°C for 24 hours.

- v) Remove the cell culture medium, rinse once with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, then three times briefly with cold acetone (stored at –20°C) for slides or cover-slips or 80% acetone in water or 30% acetone in ethanol, also at –20°C, for cells on plastic substrates. Let the fixative act for 15 minutes. A volume of 0.5 ml is adequate for 2 cm<sup>2</sup> of cell monolayer.
- vi) Allow the cell monolayers to air-dry for at least 30 minutes and process immediately or freeze at –20°C.
- vii) Rehydrate the dried cell monolayers, if they have been stored frozen, by four rinsing steps with ~~PBS containing 0.05% Tween 20~~ PBST and remove this buffer completely after the last rinse. Block with 5% skim milk or 1% bovine serum albumin, in PBST for 30 minutes at 37°C.
- viii) Rinse four times with PBST, 5 minutes for each rinse. The slides or plastic culture plates can be gently agitated during the rinses.
- ix) Prepare a solution of purified antibody or serum to SVCV in PBST, at the appropriate dilution (which has been established previously or as given by the reagent supplier).
- x) Incubate the cell monolayers with the antibody solution for 1 hour at 37°C in a humid chamber and do not allow evaporation to occur.
- xi) Rinse four times with PBST.
- xii) Incubate the cell monolayers with a solution of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibody to the immunoglobulin used in the first layer and prepared according to the instructions of the supplier. These FITC antibodies are most often rabbit or goat antibodies.
- xiii) Rinse four times with PBST.
- xiv) View the treated cell monolayers on plastic substrates immediately, or mount the slides or cover-slips using glycerol saline at pH 8.5, or a commercially available mountant.
- xv) Examine under incident ultraviolet (UV) light using a fluorescence microscope with ×10 eye pieces and ×20 or ×40 objective lenses having numerical apertures of >0.65 and >1.3, respectively. Positive and negative controls must be found to give the expected results prior to any other observation.

#### 4.10. Other serological methods

Not applicable

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

The method for surveillance of apparently healthy populations ~~susceptible fish populations~~ for declaration of freedom from infection with SVCV is inoculation of cell culture with tissue homogenates ~~extracts~~ (as described in Section 4.3 4.5) to demonstrate absence of the virus. Cell culture is considered the most suitable method despite the lack of validation data for diagnostic methods for SVCV.

### 6. Corroborative diagnostic criteria

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

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

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>14</sup>

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

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

The presence of infection with SVCV shall be suspected if: ~~a positive result has been obtained on at least one animal from~~ at least one of the following ~~diagnostic tests~~ criteria is met:

- i) Positive result by conventional RT-PCR ~~a recommended molecular or antigen or antibody detection test~~;
- ii) SVCV-typical CPE ~~Cytopathic effect~~ in cell culture ~~(viruses)~~.

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with SVCV ~~is considered to~~ shall be confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.1.1, ~~positive results has been obtained on at least one animal from two test used in the following combination~~ the following criterion is met:

- i) ~~Pathogen isolation AND Conventional~~ SVCV-typical CPE in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR test followed by and amplicon sequencing.

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

## 6.2. Clinically affected animals

Clinical signs are not pathognomonic for infection with SVCV ~~a single disease~~; however they may narrow the range of possible diagnoses. ~~[For many diseases, especially those affecting mollusc, 'clinical signs' are extremely limited and mortality may be the only or most dominant observation.]~~

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with SVCV shall be suspected if at least one of the following criteria is ~~are~~ 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 ~~a recommended molecular or antigen or antibody detection test~~ ~~on at least one animal~~;
- iii) Positives result by antigen ELISA or IFAT or immunohistochemistry;
- iv) Positive result by IFAT;
- v) Positive result by immunohistochemistry;
- vi) SVCV-typical CPE ~~Cytopathic effect~~ in cell culture.

<sup>14</sup> For example transboundary *commodities*.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with SVCV is considered to shall be confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.2.1, positive results has been obtained on at least one animal from two test used in the following combination the following criterion is met:

- i) Pathogen isolation AND Conventional SVCV-typical CPE in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR test followed by and amplicon sequencing.

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

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with SVCV is provided in Table 6.3. (note: no data are currently available). This information can be used for the design of surveys for infection with SVCV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data is only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

*Table 6.3. Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis*

Test type	Test purpose	Source population	Tissue/ sample type	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Cell culture	Surveillance, diagnosis	≡	Tissue homogenates	≡	Not yet available	Not yet available	≡	≡
RT-PCR	Surveillance, diagnosis	≡	Tissue homogenates	≡	Not yet available	Not yet available	≡	≡
RT-PCR	Surveillance, diagnosis	≡	Cell culture	≡	Not yet available	Not yet available	≡	≡
RT-LAMP*	Surveillance	Live imported fish	Spleen, kidney and brain homogenate	Common carp, koi, goldfish	92.6 (27)	98.2 (445)	Virus isolation	Liu <i>et al.</i> , 2008

DSe = diagnostic sensitivity; DSp = diagnostic specificity; *n* = number of samples used in the study; RT-LAMP: = real-time loop mediated isothermal amplification. \*Listed as suitable test

## 7. References

AHNE W. (1976). Untersuchungen über die Stabilität des karpfenpathogenen Virusstammes 10/3. *Fisch und Umwelt*, **2**, 121–127.

AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchungen über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV). *Zbl. Vet. Med. B*, **29**, 457–476.

AHNE W. (1986). Unterschiedliche biologische Eigenschaften 4 cyprinidenpathogener Rhabdovirusisolate. *J. Vet. Med. B*, **33**, 253–259.

AHNE W., BJORKLUND H.V., ESSBAUER S., FIJAN N., KURATH G. & WINTON J.R. (2002). Spring viremia of carp (SVC). *Dis. aquat. Org.*, **52**, 261–272.

AHNE W. & HELD C. (1980). Untersuchungen über die viruzide Wirkung von Actomar<sup>®</sup> K<sub>30</sub> auf fischpathogene Viren. *Tierärztl. Umsch.*, **35**, 308–318.



ALIKIN Y.S., SHCHELKUNOV I.S., SHCHELKUNOVA T.I., KUPINSKAYA O.A., MASYSHEVA V.I., KLIMENKO V.P. & FADINA V.A. (1996). Prophylactic treatment of viral diseases in fish using native RNA linked to soluble and corpuscular carriers. *J. Fish Biol.*, **49**, 195–205.

BEKESI L. & CSONTOS L. (1985). Isolation of spring viraemia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, **8**, 471–472.

~~BILLARD R. & BERNI P. (2004). Trends in cyprinid polyculture. *Cybium*, **28**, 255–261.~~

BJORKLUND H.V., HIGMAN K.H. & KURATH G. (1996). The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus – analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Virus Res.*, **42**, 65–80.

DE KINKELIN P. & LE BERRE M. (1974). Rhabdovirus des poissons II. Propriétés *in vitro* du virus de la virémie printanière de la carpe. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **125 A**, 113–124.

DIKKEBOOM A.L., RADI C., TOOHEY-KURTH K., MARCQUENSKI S., ENGEL M., GOODWIN A.E., WAY K., STONE D.M. & LONGSHAW C. (2004). First Report of Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) in Wild Common Carp in North America. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 169–178.

DIXON P.F. (2008). Virus diseases of cyprinids. *In: Fish Diseases*, Vol. 1. Eiras J.C., Segner H., Wahli, T. & Kapoor, B.G. eds. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, 87–184.

DIXON P.F. & LONGSHAW C.B. (2005). Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 25–29.

EMMENEGGER E.J. & KURATH G. (2008). DNA vaccine protects ornamental koi (*Cyprinus carpio koi*) against North American spring viremia of carp virus. *Vaccine*, **26**, 6415–6421.

FIJAN N. (1988). Vaccination against spring viraemia of carp. *In: Fish Vaccination*, Ellis A.E., ed. Academic Press, London, UK, 204–215.

FIJAN N. (1999) Spring viraemia of carp and other viral diseases and agents of warm-water fish. *In: Fish Diseases and Disorders Vol. 3: Viral, Bacterial, and Fungal Infections*, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, London, UK, pp. 177–244.

GARVER K.A., DWILLOW A.G., RICHARD J., BOOTH T.F., BENIAC D.R. & SOUTER B.W. (2007). First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio* L., from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. *J. Fish Dis.*, **30**, 665–671.

HOFFMANN B., SCHÜTZE H. & METTENLEITER T.C. (2002). Determination of the complete genomic sequence and analysis of the gene products of the virus of Spring Viremia of Carp, a fish rhabdovirus. *Virus Res.*, **84**, 89–100.

KIRPICHNIKOV V.S., ILYASOV I., SHART L.A., VIKHMAN A.A., GANCHENKO M.V., OSTASHEVSKY A.L., SIMONOV V.M., TIKHONOV G.F. & TJURIN V.V. (1993). Selection of Krasnodar common carp (*Cyprinus carpio* L.) for resistance to dropsy: principal results and prospect. *In: Genetics in Aquaculture*, Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics in Aquaculture, Graham A.E. & Gall G.A.E., eds. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 7–20.

KIRYU I., SAKAI T., KURITA J. & IIDA T. (2007). Virucidal effect of disinfectants on spring viremia of carp virus. *Fish Pathol.*, **42**, 111–113.

KOUTNA M., VESELY T., PSIKAL I. & HULOVA J. (2003). Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 229–235.

LIU H., GAO L., SHI X., GU T., JIANG Y. & CHEN H. (2004). Isolation of spring viraemia of carp virus (SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*C. carpio carpio*) in PR China. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **24**, 194–202.

~~LIU Z., TENG Y., XIE X., LI H., LV J., GAO L., TIAN F., JIANG Y., CHU Z., XIE C. & LIU H. (2008). Development and evaluation of a one-step loop-mediated isothermal amplification for detection of spring viraemia of carp virus. *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 1220–1226.~~

MISK E., GARVER K., NAGY E., ISAAC S., TUBBS L., HUBER P., AL-HUSSINEE L. & LUMSDEN J.S. (2016). Pathogenesis of spring viremia of carp virus in emerald shiner *Notropis atherinoides* Rafinesque, fathead minnow *Pimephales promelas* Rafinesque and white sucker *Catostomus commersonii* (Lacepede). *J. Fish Dis.*, **39**, 729–739.

ORESHKOVA S.F., SHCHELKUNOV I.S., TIKUNOVA N.V., SHCHELKUNOVA T.I., PUZYREV A.T. & ILYICHEV A.A. (1999). Detection of spring viremia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **63**, 3–10.

PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986) Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.

RUANE N.M., RODGER H.D., MCCARTHY L.J., SWORDS D., DODGE M., KERR R.C., HENSHILWOOD K. & STONE D.M. (2014). Genetic diversity and associated pathology of rhabdovirus infections in farmed and wild perch *Perca fluviatilis* in Ireland. *Dis. Aquat. Org.*, **112**, 121–130.

SHEPPARD A.M., LEDEUFF R.-M., MARTIN P.D., WOOLFORD G., WAY K. & STONE D.M. (2007). Genotyping spring viraemia of carp virus and other piscine vesiculo-like viruses using reverse hybridisation. *Dis. Aquat. Org.*, **76**, 163–168.

SHIMAHARA Y., KURITA J., NISHIOKA T., KIRYU I., YUASA K., SAKAI T., OSEKO N., SANO M. & DIXON P. (2016). Development of an improved RT-PCR for specific detection of spring viraemia of carp virus. *J. Fish Dis.*, **39**, 269–275.

SHIVAPPA R.B., SAVAN R., KONO T., SAKAI M., EMMENEGGER E., KURATH G. & LEVINE J F (2008). Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in koi carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, **31**, 249–258.

SIWICKI A.K., POZET F., MORAND M., KAZUŃ B., TRAPKOWSKA S. & MAŁACZEWSKA J. (2002). Influence of methisoprinol on the replication of rhabdoviruses isolated from carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus melas*): in vitro study. *Polish J. Vet. Sci.*, **6**, 47–50.

STONE D.M., AHNE W., DENHAM K.D., DIXON P.F., LIU C.T.Y., SHEPPARD A.M., TAYLOR G.R. & WAY K. (2003). Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four genogroups. *Dis. Aquat. Org.*, **53**, 203–210.

SVETLANA J., DOBRILA J.-D. & RADOSAVLJEVI V. (2004). Dissemination of spring viraemia of carp (svc) in serbia during the period 1992–2002. *Acta Veterinaria* (Beograd), **54**, 289–299.

TENG Y., LIU H., LV J.Q., FAN W.H., ZHANG Q.Y. & QIN Q.W. (2007). Characterization of complete genome sequence of the spring viremia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) in China. *Arch. Virol.*, **152**, 1457–1465.

WANG J., LIU Y., YU L., JIA P., CHEN B., SHI X., ZHENG X., LAN W., HE J. & LIU H. (2016). Characterization of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Ovary Cell Line and Its Susceptibility to Spring Viremia of Carp Virus. *Prog. Fish. Sci.*, **37**, 56–60.

YUE Z., TENG Y., LIANG C., XIE X., XU B., ZHU L., LEI Z., HE J., LIU Z., JIANG Y., LIU H. & QIN Q. (2008). Development of a sensitive and quantitative assay for spring viremia of carp virus based on real-time PCR. *J. Virol. Methods*, **152**, 43–48.

ZHANG N.Z., ZHANG L.F., JIANG Y.N., ZHANG T. & XIA C. (2009). Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: A fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. *PLoS ONE*, **4**, pp 1–9.

\*  
\*\*

**NB:** There are OIE Reference Laboratories for Spring viraemia of carp  
(see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:  
<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on  
Spring viraemia of carp

[Retour à l'ordre du jour](#)

## CHAPTER 2.3.4.

# INFECTION WITH INFECTIOUS HAEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS

---

## 1. Scope

Infection with infectious haematopoietic necrosis virus means infection with the pathogenic agent Salmonid novirhabdovirus (commonly known as infectious haematopoietic necrosis virus [IHNV]) of the Genus *Novirhabdovirus* and Family *Rhabdoviridae*.

## 2. Disease information

### 2.1. Agent factors

#### 2.1.1. Aetiological agent

IHNV consists of a bullet-shaped particle of approximately 150–190 nm in length and 65–75 nm in diameter that encapsulates a non-segmented, negative-sense, single-stranded RNA genome of approximately 11,000 nucleotides. The viral genome codes for six proteins in the following order: a nucleoprotein (N), a phosphoprotein (P), a matrix protein (M), a glycoprotein (G), a non-virion protein (NV), and a polymerase (L). Due to the primary position of the nucleoprotein gene on the IHNV genome, nucleoprotein transcripts and protein are the first and most abundant during viral infection and is typically the preferred target of diagnostic tests. The glycoprotein forms spike-like projections on the surface of the mature virion and is the primary antigenic component of the virus such that anti-glycoprotein serum is sufficient to neutralise infections IHNV.

The type strain of IHNV is the Western Regional Aquaculture Center (WRAC) strain available from the American Type Culture Collection (ATCC VR-1392). The GenBank accession number of the genomic sequence of the WRAC strain is L40883 (Morzunov *et al.*, 1995; Winton & Einer-Jensen, 2002).

Phylogenetic analyses based on G-gene nucleotide sequences have classified IHNV isolates into five major genogroups denoted U, M, L, E, and J that correspond to geographical location rather than host species (Cieslak *et al.*, 2017; Enzmann *et al.*, 2005; 2010; Johansson *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 1999; Kolodziejek *et al.*, 2008; Kurath *et al.*, 2003; Nishizawa *et al.*, 2006). Nevertheless, IHNV displays a strong phylogeographic signature reflecting the host species from which the virus is most commonly isolated in various geographical areas (e.g. sockeye salmon [*Oncorhynchus nerka*] in the Northeast Pacific – U genogroup; Chinook salmon [*Oncorhynchus tshawytscha*] in California, USA – L genogroup; and rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss*] in Europe, Asia, and Africa (Mulei *et al.*, 2019) and Idaho, USA – E, J and M genogroups, respectively). Additionally, experimental infections demonstrating that U and M genogroup viruses had higher virulence in sockeye salmon and rainbow trout, respectively, and L genogroup showed medium virulence to both sockeye salmon and rainbow trout (Garver *et al.*, 2006), supports the observation finding that virulence depends on viral strain and species infected, and IHNV strains isolated from its historical phylogeographic host tends to be more virulent for the same species in comparison to other species.

#### 2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

IHNV stability in host tissues during storage and processing is largely influenced by temperature. The virus is more stable at lower temperature and remained infectious for at least 3 days at 4°C in naturally infected or IHNV-seeded tissue (Burke & Mulcahy, 1983; Gosting & Gould, 1981; Hostnik *et al.*, 2002; Pietsch *et al.*, 1977). For long-term survival of infectious virus, tissues should be stored at temperatures below –20°C (Burke & Mulcahy, 1983; McClure *et al.*, 2008). The preferred method for retaining infectious virus is to maintain the IHNV sample on ice with rapid processing and inoculation of cell cultures as soon as possible due to the progressive reduction in titre with increasing temperature (Barlic-Maganja *et al.*, 2002; Gosting & Gould, 1981).

### 2.1.3. Survival and stability outside the host

IHNV can survive outside the host tissue in fresh water and sea water, but is impacted affected by temperature, ultraviolet (UV) exposure, microbial community and suspended sediments. At 4°C–15°C, 10<sup>6</sup> pfu/ml of IHNV remained detectable via cell culture after 1 week in either fresh or salt water (Kell *et al.*, 2014). For all genotypes, inactivation rates are reduced at lower water temperatures and virions remain infectious for longer in freshwater compared with seawater (Kell *et al.*, 2014). However, when exposed to sunlight (UV-A and UV-B), IHNV at the water surface is rapidly inactivated with six orders of magnitude of virus rendered non-infectious within 3 hours (Garver *et al.*, 2013). In addition, infectious virus is inactivated by the microbial community within the water source and with increased amounts of suspended sediments (Garver *et al.*, 2013; Kamei *et al.*, 1987).

For inactivation methods, see Section 2.4.6.

## 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:

Family	Scientific name	Common name
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Northern pike
Salmonidae	<i>Salmo marmoratus</i>	Marble trout
	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon
	<i>Salmo trutta</i>	Brown trout
	<i>Salvelinus alpinus</i>	Arctic char
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Brook trout
	<i>Salvelinus namaycush</i>	Lake trout
	<i>Oncorhynchus clarkii</i>	Cutthroat trout
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon
	<i>Oncorhynchus keta</i>	Chum salmon
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Coho salmon
	<i>Oncorhynchus masou</i>	Masou salmon
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Sockeye salmon	

### 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: White sturgeon (*Acipenser transmontanus*), European eel (*Anguilla anguilla*), Tube-snout (*Aulorhynchus flavidus*), Pacific herring (*Clupea pallasii*), Shiner perch (*Cymatogaster aggregata*) and Turbot (*Scophthalmus maxima-maximus*).

Family	Scientific name	Common name
Acipenseridae	<i>Acipenser transmontanus</i>	White sturgeon
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	European eel
Aulorhynchidae	<i>Aulorhynchus flavidus</i>	Tube-snout
Clupeidae	<i>Clupea pallasii</i>	Pacific herring
Embiotocidae	<i>Cymatogaster aggregata</i>	Shiner perch
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus maxima</i>	Turbot

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: Common carp (*Cyprinus carpio*) and American yellow perch (*Perca flavescens*).

Family	Scientific name	Common name
Cyprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	Common carp
Percidae	<i>Perca flavescens</i>	American yellow perch

### 2.2.3. Non-susceptible species

None known.

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

IHNV predominantly infects salmon and trout salmonid species with fry being the most highly susceptible stage (LaPatra, 1998). Resistance to infection typically increases with fish age until the spawning stage. Returning adult spawning salmon, can be highly infected and shed large amounts of virus in ovarian fluid and milt despite a lack the absence of clinical disease (Dixon *et al.*, 2016).

For the purposes of Table 4.1 rainbow trout alevin and fry (e.g. up to approximately 1 g in weight) may be considered early life stages, fingerlings and ongrowing fish up to 50 g be considered as juveniles and fish over 50 g adults.

### 2.2.5.4. Distribution of the pathogen in the host

IHNV targets the haematopoietic tissue and is most commonly isolated from kidney and spleen tissues. The virus has also been isolated from gill, oral region, pharynx, oesophagus, intestine, stomach, pyloric caeca, liver, brain, heart, thymus, pancreas, adipose tissue, muscle, cartilage, skin, fin and mucous (Brudeseth *et al.*, 2002; Dixon *et al.*, 2016; Drolet *et al.*, 1994; Harmache *et al.*, 2006; LaPatra *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1990a). In spawning fish IHNV has also been isolated in from the ovarian fluid and milt of spawning fish (Mulcahy *et al.*, 1982).

### 2.2.6.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Field surveillance programmes and experimental infection trials have documented subclinical IHNV infections in various salmon and trout species (Knusel *et al.*, 2007; Mulcahy *et al.*, 1984; Pascoli *et al.*, 2015; St-Hilaire *et al.*, 2001; Traxler *et al.*, 1997). Survivors of laboratory exposures have demonstrated IHNV persistence for months to over one-year post-exposure (Drolet *et al.*, 1995; Foott *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2015). With the exception of high viral load occurring in subclinically infected spawning adult salmon, the IHNV levels associated with subclinical infections tend to be lower than in fish undergoing clinical disease.

### 2.2.7.6. Vectors

A single study has demonstrated that adult salmon lice, *Lepeophtheirus salmonis* are capable of acquiring and transmitting IHNV to naïve Atlantic salmon through parasitism (Jakob *et al.*, 2011). Regardless of whether salmon lice acquired IHNV through water bath exposure or after parasitising IHNV-infected fish, the duration of virus association with salmon lice diminished rapidly with infectious virus levels falling below cell culture detection limits within hours. IHNV has also been isolated from freshwater invertebrates (e.g. leeches, copepods, and mayflies), however, their capacity to transmit virus is unknown (Dixon *et al.*, 2016; Garver & Wade, 2017).

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Depending on the species of fish, rearing conditions, temperature, and virus strain, outbreaks of infection with IHNV may range from acute to chronic. An outbreak of infection with IHNV in farmed Atlantic salmon in British Columbia Columbia resulted in cumulative losses on affected farms of between 20 and 94% (Saksida, 2006). In chronic cases, losses are protracted and fish in various stages of disease can be observed in the pond. The prevalence of infection in chronic cases remains unknown. The limited available data indicated that prevalence of infection with IHNV can be high (59%) in endemically infected rainbow trout farms in Europe (reviewed by Dixon *et al.*, 2016).

IHNV is endemic among populations of free-ranging salmonids throughout much of its historical range along the west coast of North America. Sockeye salmon have incurred losses of up to ~~99%~~ 36.9% at the fry stage (~~Kurath *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2003~~). ~~As the fish~~ With ages, the prevalence of infection decreases with in marine phase sockeye salmon smolts, and ~~the prevalence of infection~~ in adults is generally low (<15%) to undetectable. However, the prevalence of infection can again reach high levels in mature adult spawning sockeye salmon, with long-term studies revealing greater than 50% prevalence in wild populations (Meyers *et al.*, 2003).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

Fish with acute infection with IHNV can exhibit lethargy interspersed with bouts of frenzied, abnormal activity. During outbreaks, fish can display spiral swimming, flashing, and have trailing faecal casts. Fish may also show darkening of the skin, exophthalmia, distended abdomen and external haemorrhaging. In instances where fish survive an outbreak, spinal deformities may become evident (Bootland & Leong, 1999).

### 2.3.3 Gross pathology

Gross observations are non-pathognomonic and ~~can involve~~ may include ascites, pale gills, liver, kidney and spleen, petechial haemorrhaging, yellow mucous in the intestine and a lack of food in the stomach (Bootland & Leong, 1999; Traxler, 1986).

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

The transmission of IHNV between fish is primarily horizontal through direct contact with virus contaminated water or via cohabitation with IHNV infected fish (Bootland & Leong, 1999). ~~However, cases of vertical or egg-associated transmission have been recorded (Mulcahy & Pascho, 1985). There is insufficient evidence to demonstrate true vertical transmission. Outbreaks of IHNV as a result of egg movements likely occurred as a result of inadequate disinfection of eggs originating from moderately infected or untested broodstock (Dixon *et al.*, 2016). While egg-associated transmission is significantly reduced by the now common practice of surface disinfection of eggs with an iodophor solution, it is the only mechanism accounting for the appearance of infection with IHNV in new geographical locations among fry originating from eggs that were incubated and hatched in virus-free water (Dixon *et al.*, 2016; Winton, 1991).~~

### 2.3.5. Environmental and management factors

The most important environmental factor affecting the disease progression is water temperature. Experimental trials have demonstrated that IHNV can produce mortality in water temperatures from 3°C to 18°C; however, clinical disease typically occurs below 15°C under natural conditions (LaPatra, 1998).

### 2.3.6. Geographical distribution

Cases of infection with IHNV have been reported from Europe, Asia-Pacific, Africa and the Americas. For recent information on distribution at the country level consult the WAHIS interface ([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en)).

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

Plasmid DNA vaccines containing the gene for the IHNV glycoprotein have proven highly efficacious against infection with IHNV resulting in the licensing of one for commercial use in Atlantic salmon net-pen aquaculture on the west coast of North America (Alonso & Leong, 2013; Salonius *et al.*, 2007). Administered via intramuscular injection, an IHNV DNA vaccine was rapidly disseminated systemically followed by plasmid persistence in muscle at the injection site (Garver *et al.*, 2005); consequently, caution should be employed when testing fish vaccinated with the IHNV DNA vaccine as diagnostic methods targeting viral G-gene nucleotide sequence or protein have the potential to cross react with the vaccine.

#### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

Chemotherapeutics, including natural compounds, have been identified to have anti-IHNV properties; however, these have not found commercial use in aquaculture against IHNV (Winton, 1991). Direct application of anti-IHNV compounds to cell cultures has caused growth inhibition and toxicity that could affect the sensitivity of detecting IHNV in affected cultures (Balmer *et al.*, 2017; Hasobe & Saneyoshi, 1985).

#### 2.4.3. Immunostimulation

Immunostimulants are not used commercially in aquaculture for IHNV (Ooi *et al.*, 2008).

#### 2.4.4. Breeding resistant strains

Experimental trials of triploid or inter-species hybrids have been conducted (Barroso *et al.*, 2008; Winton, 1991) with resistance typically determined early in the infection process and associated with lower early viral replication (Purcell *et al.*, 2010). However, no resistant strains are commercially available.

#### 2.4.5. Inactivation methods

IHNV is readily inactivated by common disinfectants with active ingredients such as sodium hypochlorite, iodophor, benzalkonium chloride, saponated cresol, formaldehyde and potassium permanganate solution (Yoshimizu *et al.*, 2005). As these substances have virucidal properties any carry-over on sampling equipment or contact with samples may result in reduced viral titres.

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Iodophor disinfection of eggs is a common practice to effectively mitigate egg-associated transmission of IHNV (Bovo *et al.*, 2005). Chapter 4.4. of the *Aquatic Code* provides recommendations for surface disinfection of salmonid eggs. Iodine has been shown to inhibit PCRs (Auinger *et al.*, 2008) and could affect **RT-PCR** testing results of disinfected eggs.

#### 2.4.7. General husbandry

In addition to disinfection of eggs (according to Chapter 4.4 of the *Aquatic Code*), use of a virus-free water supply and decreasing rearing densities have significant positive effects in the management of IHNV. Transmission of IHNV increases with host density (Ogut & Reno, 2004).

### 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 ~~are best should be~~ carried out during a period whenever the water temperature is below 14°C, or whenever the water temperature is likely to reach its lowest annual point. All production units (ponds, tanks, net-cages, etc.) ~~must should~~ be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish ~~of any susceptible species, and if they are present, such fish should be selected.~~ Particular attention should be paid to the water outlet area, where weak fish tend to accumulate due to the water current.

For the purposes of disease surveillance, fish to be sampled are selected as follows: If additional fish are required for the sample, healthy individuals should be selected as follows:

- i) Species of the *Oncorhynchus* genus are the most susceptible and should be sampled in preference to species from other genera. Rainbow trout and the Other susceptible species listed in Section 2.2.1 should be sampled proportionally, or following. In addition, risk-based criteria should be employed to preferentially sample for targeted selection of lots or populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. via untreated surface water, wild harvest or replacement with stocks of unknown disease status). In farms with salmonids, if rainbow trout are present, only fish of that species should be selected for sampling. If rainbow trout are not present, the sample has to be obtained from fish of all other IHNV-susceptible species.

- ii) ~~Susceptible species should be sampled following risk-based criteria for targeted selection of populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. via untreated surface water, wild harvest or replacement with stocks of unknown risk status).~~
- ii) 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 (not decomposed) fish are present, such fish should be selected. If such fish are not present, the fish selected should include normal appearing, healthy fish collected in such a way that all parts of the farm as well as all year classes are proportionally represented in the sample.

For disease outbreak investigations, moribund fish or fish exhibiting clinical signs of infection with IHNV 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. There may be no clinical signs or gross pathognomonic lesions in cases of sudden mortality.

### 3.2. Selection of organs or tissues

In populations with clinical disease, the optimal tissue is anterior kidney, spleen and heart or brain (Dixon *et al.*, 2016) However, IHNV can also be found in spleen, heart, liver, gastrointestinal track and brain (Drolet *et al.*, 1994).

In apparently healthy populations, the optimal tissues are anterior kidney and brain as IHNV can persist in tissues of the nervous system during the chronic phase of infection (LaPatra *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 1990b).

When sampling fish of insufficient size to permit dissection of individual tissues, viscera including kidney should be collected or whole fish homogenised after removal of the body behind the anal pore. When sampling broodstock, ovarian fluid and milt can be taken.

The optimal tissues material to be examined is are spleen, anterior kidney, and either heart or brain. In the case of spawning fish, ovarian fluid and milt may be taken examined.

In the case of small fry, whole fish less than 4 cm long can be homogenised (using, for example, sterile scissors or a scapel) after removal of the body behind the anal pore gut opening. If a sample consists of whole fish with a body length between 4 cm and 6 cm, the viscera including kidney should be collected. For larger size fish, kidney, spleen, heart, encephalon, and ovarian fluid from brood fish at the time of spawning, should be the tissues to be sampled. When possible, Samples should be taken in duplicate to permit retesting if needed.

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

IHNV is very sensitive to enzymic degradation, therefore sampling tissues with high enzymatic activities or large numbers of contaminating bacteria, such as the intestine or skin, should be avoided when possible. Given the haematopoietic nature of IHNV, muscle tissue should be avoided as a target tissue. The yolk sac of fry has also shown toxicity to cell lines and should be removed before inoculating cells for virus isolation. Preservatives and fixatives, such as RNAlater and formaldehyde can be toxic to tissue culture cells such as epithelioma papulosum cyprini (EPC) and fathead minnow (FHM), and can impact molecular detection methods (Auinger *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 2018).

### 3.4. Non-lethal sampling

Ovarian fluid and milt are suitable samples for detection of IHNV in spawning adult salmon and trout (Dixon *et al.*, 2016; Meyers *et al.*, 2003). There is evidence that IHNV may be isolated from gill, fin and mucous samples but detection may be impacted by the state of infection, time since exposure and sample size (Burbank *et al.*, 2017; LaPatra *et al.*, 1989).



### 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)*.

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. Alternate storage methods should only be used after consultation with the receiving laboratory.

Before shipment or transfer to the laboratory, pieces of the organs to be examined should be removed from the fish with sterile dissection tools and transferred to sterile plastic tubes containing transport medium, i.e. cell culture medium with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. The combination of 200 International Units (IU) penicillin, 200 µg streptomycin, and 200 µg kanamycin per ml are recommended, although other antibiotics of proven efficacy may also be used. The tissue in each sample should be larger than the analytical unit size required for initial laboratory testing (e.g. between 0.5 and 2 g) and taken in duplicate if retesting may be required.

Tubes containing fish tissues in transport medium for cell cultivation should be placed in insulated containers, such as thick-walled polystyrene boxes, together with sufficient ice or an alternative cooling medium with the similar cooling effect to ensure chilling of the samples during transportation to the laboratory. However, freezing of the samples should be avoided. The temperature of a sample during transit must never exceed 10°C, and ice must still be present in the transport box at receipt or at least one or more freeze blocks must still be partly or completely frozen.

Whole fish may be sent to the laboratory if the temperature requirements referred to in the first paragraph during transportation can be fulfilled. Whole fish should be wrapped up in paper with absorptive capacity and enclosed in a plastic bag. Live fish may also be transported to the laboratory. All packaging and labelling must be performed in accordance with present national and international transport regulations, as appropriate.

The virological examination on cell culture should be started as soon as possible, and no later than 48 hours after the collection of the samples. In exceptional cases, the virological examination may be started at the latest within 72 hours after the collection of the material, provided that the material to be examined is protected by a transport medium, and that the temperature requirements during transportation can be fulfilled.

#### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Samples can be taken from the fish in accordance with the procedure described in Section 3.5.1, using a sterile instrument, and transferred to a sterile plastic tube containing transport medium.

Alternatively, samples may be placed in at least five volumes of RNA stabilisation reagents, according to the recommendation from the manufacturers. Samples in RNA stabilising reagents can be shipped on ice or at room temperature if transport time does not exceed 24 hours.

Whole fish may also be sent to the laboratory (see Section 3.5.1).

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

Tissue samples for histopathology should be immediately fixed at a fixative to tissue ratio of 10:1. A suitable fixative is 10% buffered formalin. To avoid excessive cross-linking, tissue should be transferred to ethanol after 24 hours if methods other than histopathology are used e.g. *in-situ* hybridisation.

### 3.5.4. Fixed Samples for electron microscopy

Not relevant. Samples for electron microscopy are not routinely required and are collected only when it is considered beneficial to facilitate further diagnostic investigation. A 2 mm cubed section from each of the appropriate organs described in section 3.2 should be fixed in glutaraldehyde; the recommended ratio of fixative to tissue is 10:1.

### 3.5.5.4. Samples for other tests

Not relevant.

## 3.6. Pooling of samples

No data are currently available concerning the effect of pooling samples on the detection of IHNV. However, small life stages such as fry can be pooled to provide the minimum amount of material needed for testing. Pooling of samples from more than one individual animal for a given purpose should only be recommended where supporting data on diagnostic sensitivity and diagnostic specificity are available. However, smaller life stages (e.g. fry) can be pooled to provide a minimum amount of material for testing.

## 4. Diagnostic methods

The methods currently available for identifying infection that can be used in i) surveillance of apparently healthy populations), ii) presumptive and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage. The designations used in the Table indicate:

Key:

- +++ = Recommended method(s) validated for the purpose shown and usually to stage 3 of the OIE Validation Pathway;
- ++ = Suitable method(s) but may need further validation;
- + = May be used in some situations, but cost, reliability, lack of validation or other factors severely limits its application;

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.

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

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juvenile s <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juvenile s <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Histopathology <sup>3</sup>						++	++	1				
Cytopathology <sup>3</sup>												
Cell or artificial media culture	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
Real-time PCR	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
Conventional PCR						++	++	++ <u>2</u>	++	++	++	1 <u>2</u>
Amplicon sequencing <sup>4</sup>									+++	+++	+++	<u>3</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
IFAT									++	++	++	2
Ag-ELISA									++	++	++	2
Neutralisation test (antibody or antiserum) <sup>5</sup>									++	++	++	2

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (Chapter 1.1.2); PCR = polymerase chain reaction; LAMP = loop-mediated isothermal amplification. IFAT = indirect fluorescent antibody test; Ag-ELISA = antigen enzyme-linked immunosorbent assay. <sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Early and juvenile life stages have been defined in Section 2.2.3.

<sup>3</sup>Cytopathology and histopathology can be validated if the results from different operators has been statistically compared.

<sup>4</sup>Sequencing of the PCR product.

<sup>5</sup>Specify the test used. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

#### 4.1. Wet mounts

Not relevant

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

Histopathological findings reveal degenerative necrosis in haematopoietic tissues, kidney, spleen, liver, pancreas, and digestive tract. Necrosis of eosinophilic granular cells in the intestinal wall is pathognomonic of IHNV infection (Bootland & Leong, 1999).

The blood of affected fry shows reduced haematocrit, leukopenia, degeneration of leucocytes and thrombocytes, and large amounts of cellular debris. As with other haemorrhagic viraemias of fish, blood chemistry is altered in severe cases (Bootland & Leong, 1999).

Electron microscopy of virus-infected cells reveals bullet-shaped virions of approximately 150–190 nm in length and 65–75 nm in width (Wolf, 1988). The virions are visible at the cell surface or within vacuoles or intracellular spaces after budding through cellular membranes. The virion possesses an outer envelope containing host lipids and the viral glycoprotein spikes that react with immunogold staining to decorate the virion surface

Smears are not appropriate for detection or identification of IHNV.

#### 4.3. Cell or artificial media culture for isolation

##### 4.3.1. Cell lines

The recommended cell lines for IHNV detection are EPC or FHM. Cell lines should be monitored to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

EPC or FHM cells are grown at 20–30°C in suitable medium, e.g. Eagle's minimal essential medium (MEM; or modifications thereof) with a supplement of 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics in standard concentrations. When the cells are cultivated in closed vials, it is recommended to buffer the medium with bicarbonate. The medium used for cultivation of cells in open units may be buffered with Tris-HCl (23 mM) and Na-bicarbonate (6 mM). The pH must be  $7.6 \pm 0.2$ . Cell culture plates should be seeded 4–48 hours and not 100% confluent prior to inoculation. 15–30 minutes prior to sample inoculation, cells should be pre-treated with 7% (w/v) PEG-20,000 solution (10–15  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) (Batts & Winton, 1989; [Wang et al., 2016](#)).

##### 4.3.2. Sample preparation and inoculation

Note: Tissue and fluid samples should be kept cool throughout sample preparation procedures.

- i) Homogenise tissue samples using mortar and pestle ~~or a tissue homogeniser, stomacher, polytron or equivalent~~. A small volume of media (MEM-4 or Hank's balanced salt solution with antibiotics) may be needed to achieve complete homogenisation.
- ii) Adjust the volume of media to a final ratio of 10:1 (media:tissue) and mix thoroughly. For fluid samples adjust the volume of media to a final ratio of 1:1.
- iii) Centrifuge the homogenate or fluid samples at 2000–4000 **g** for 15 minutes at 2–5°C.
- iv) Remove the supernatant and pass through a 0.45  $\mu\text{M}$  membrane filter (if available).
- v) If the sample cannot be inoculated within 48 hours after collection, the supernatant may be stored at –80°C provided virological examination is carried out within 14 days.
- vi) If samples originate from an area where infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is present, supernatants may be treated with IPNV antiserum. Mix the supernatant with equal parts of a suitably diluted pool of antisera to the indigenous serotypes of IPNV and incubate for a minimum of 1 hour at 15°C or up to 18 hours at 4°C. The titre of the antiserum must be at least 1/2000 in a 50% plaque neutralisation test.

- vii) Samples are inoculated into cell cultures in at least two dilutions, i.e. the primary dilution and a 1:10 dilution thereof, resulting in final dilutions of tissue material in cell culture medium of 1:100 and 1:1000, respectively. The ratio between inoculum size and volume of cell culture medium should be about 1:10. For each dilution and each cell line, a minimum of about 2 cm<sup>2</sup> cell area, corresponding to one well in a 24-well cell culture tray, has to be used. Use of cell culture trays is recommended, but other units of similar or with larger growth area are acceptable as well.
- viii) Inoculated cell cultures are incubated at 15°C for 7–10 days. Using a microscope with 40–150x magnification, cultures should be inspected for toxicity the day after inoculation, particularly if supernatant was not filtered in step iv. The use of a phase-contrast microscope is recommended.
- ix) ~~Monitor~~ The cells are monitored regularly (2–3 times a week) for the presence of cytopathic effect (CPE).

#### Interpretation of results

If CPE is observed, virus identification confirmatory testing is required to identify IHNV using tests recommended in Section 6. If no CPE is observed in after the primary incubation period, culture or subcultivation, the sample is negative is performed.

#### Subcultivation

- i) Remove cell culture supernatant from the primary culture and inoculate a newly (<48 hours) seeded cell culture plate.
- ii) Incubate inoculated plates at 15°C and monitor for 7–10 days as described above.

If CPE is observed, virus identification is required using tests recommended in Section 6. If no CPE is observed after the primary incubation period and subcultivation, the sample is negative

## 4.4. Nucleic acid amplification

### 4.4.1. Real-time PCR

There are several ~~reverse-transcription~~ real-time reverse-transcription (RT) PCR assays available for the detection of IHNV. Two assays are described, a two-step real-time PCR and a one-step real-time PCR.

The first assay described is a stage 3 validated two-step real-time TaqMan PCR assay that amplifies a region of the nucleoprotein gene of all known IHNV genogroups with some E-genogroup isolates (D332-92, FV23, and FV91-40) having reduced amplification efficiency due to single nucleotide polymorphism within the probe sequence (Hoferer *et al.*, 2019; Purcell *et al.*, 2013).

Positive and negative controls should be run with each stage of the assay: extraction, reverse transcription and real-time PCR. Due to the sensitive nature of PCR-based assays, it is important to be able to distinguish a true positive from the positive control material. This may be achieved using an artificial positive control as employed by Purcell *et al.* (2013). It is also highly recommended that master mix, template addition and PCR amplification occur in designated hoods or spatially separated areas.

#### *RNA extraction and reverse-transcription (RT)*

- i) Total RNA from infected cells and/or tissues is extracted using a phase-separation method (e.g. phenol-chloroform or Trizol) or by use of a commercially available RNA isolation kit used according to the manufacturer's instructions.
- ii) Extracted RNA is reverse transcribed non-discriminately into cDNA using random primers. The cDNA synthesis reactions and cycling conditions are best performed using the manufacturer's instructions for commercially available kits which have been extensively tested with a variety of RNA templates, including GC- and AU-rich targets and RNase expressed at low levels.

### *Real-time PCR*

The TaqMan real-time PCR assay uses forward primer IHNv N 796F (5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3'), reverse primer IHNv N 875R (5'-TTC-TTT-GCG-GCT-TG-GTT-GA-3') and FAM-labelled probe, IHNv N 818T (5'-6FAM-TGA-GAC-TGA-GCG-GGA-CA-MGBNFQ-3'). Primers are used at a final concentration of 900 nM each and the final probe concentration is 250 nM. 2.5 µl cDNA product is added to each 25 µl rPCR reaction. Thermal cycling conditions are 50°C 2 minutes, 95°C 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute.

The sample is negative if no Ct (threshold cycle) is recorded, while samples with a Ct are considered positive for IHNv.

### One step real-time RT-PCR

The one step real-time RT-PCR is performed using the SuperScript III Platinum One - Step qRT - PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany) or the AgPath - ID One - Step RT - PCR Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. For all quantitative assays, the following unique parameters were used: (a) total volume of 25 µl consisting of 20 µl mastermix and 5 µl of RNA; (b) 900 nM of each primer; (c) 200 nM of IHNv probe and 250 nM of VHSV probe, respectively; (d) hard - shell 96 - well skirted plates with white shell (Bio - Rad, Munich, Germany, cat. No HSP9601); (e) Microseal B adhesive optical clear seals (Bio - Rad, cat. no MSB 1001); (f) run on a C1000TM Thermal Cycler controlled by the CFX96TM Real - Time PCR Detection System (Bio - Rad); and (g) use of the CFX Manager software (Bio - Rad) for data analysis. The threshold was set automatically (Hoferer *et al.*, 2019).

The one-step real-time RT-PCR test does not differ significantly in performance to the two-step test (Cuenca *et al.*, 2020).

### **4.4.2. Conventional RT-PCR**

Several conventional RT-PCR assays are available with limited validation data.

The RT-PCR assay described recognises a broad range of genotypes by targeting a central region of the IHNv G gene (Emmenegger *et al.*, 2000), and produces a PCR amplicon that is used for identification of genetic strains and for epidemiological tracing of virus movements (Kurath *et al.*, 2003).

Positive and negative controls should be run with each stage of the assay: extraction, RT-PCR and second round PCR. Due to the sensitive nature of PCR-based assays it is highly recommended that master mix, template addition and PCR amplification occur in designated hoods or spatially separated areas.

### *RNA extraction*

Total RNA may be prepared as described in Section 4.4.1.

### *Conventional RT-PCR (Round 1)*

The first round RT-PCR combines cDNA synthesis and PCR amplification into one step by using an IHNv-specific primer set that generates the first-strand synthesis of IHNv RNA and subsequent PCR amplification through 30 cycles. The first round PCR produces a 693 bp PCR amplicon using forward primer (5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3') and reverse primer (5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3') at a final concentration of 200 nM each. The thermal cycling conditions are one cycle of 50°C for 30 minutes; one cycle of 95°C for 2 minutes; 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, 72°C for 60 seconds; one cycle of 72°C for 7 minutes and 4°C hold.

A sample is IHNv positive if a 693 bp PCR amplicon is observed and no bands were observed in the negative controls. If no band is observed for a sample and the positive controls passed proceed to the second round nested PCR.

#### *Second round (nested PCR)*

Due to the sensitivity of the test along with the need for repetitive handling of tubes, nested PCR is prone to contamination and good sterile technique must be practiced.

The first round positive and negative controls are carried over and included with the nested PCR assay. In addition, a separate negative and positive control specific to the nested assay are required.

The second round PCR produces a 483 bp PCR amplicon using forward primer (5'-TCA-CCC-TGC-CAG-ACT-CAT-TGG-3') and reverse primer (5'-ATA-GAT-GGA-GCC-TTT-GTG-CAT-3') at a final concentration of 200 nM each. The thermal cycling conditions are: 95°C for 2 minutes followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, 72°C for 60 seconds; one cycle of 72°C for 7 minutes and 4°C hold.

A sample is IHNV positive if a 483 bp PCR amplicon is observed and no band(s) are observed in the negative controls. A sample is negative if no bands are observed and positive controls passed.

#### **4.4.3. Other nucleic acid amplification methods**

To date, no other nucleic acid amplification method capable of universal IHNV detection has been sufficiently validated.

### **4.5. Amplicon sequencing**

Nucleotide sequencing of the conventional PCR product (Section 4.4.2) is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. This central region of IHNV glycoprotein gene is used for identification of genetic strains and for epidemiological study (Kurath *et al.*, 2003). It is recommended to forward any sequence data obtained to the OIE Reference Laboratory, particularly in the event where isolate sequences differ from any of the target sequences of the recommended molecular assays.

### **4.6. *In-situ* hybridisation**

Not relevant.

### **4.7. Immunohistochemistry**

Not relevant.

### **4.8. Bioassay**

Not relevant.

### **4.9. Antibody- or antigen-based detection methods**

Antibody- and antigen-based detection methods may be used to confirm the presence of IHNV in cell culture. Kits and antibodies are commercially available and should be used according to manufacturer's instructions. Sensitivity, specificity and sample preparation can influence the results; a negative result should be viewed with caution. These techniques should not be used as a screening method.

#### **4.9.1. Neutralisation test (identification in cell culture)**

- i) Collect the culture medium of the cell monolayers exhibiting CPE and centrifuge an aliquot at 2000 g for 15 minutes at 4°C, or filter through a 0.45 µm (or 450 nm) pore membrane to remove cell debris.
- ii) Dilute virus-containing medium from 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup>.
- iii) Mix aliquots (for example 200 µl) of each dilution with equal volumes of an IHNV antibody solution. The neutralising antibody solution must have a 50% plaque reduction titre of at least 2000. Likewise, treat a set of aliquots of each virus dilution with cell culture medium to provide a non-neutralised control.

- iv) In parallel, a neutralisation test must be performed against a homologous IHNV strain (positive neutralisation test) to confirm the reactivity of the antiserum.
- v) Incubate all the mixtures at 15°C for 1 hour.
- vi) Transfer aliquots of each of the above mixtures on to 24-hour-old monolayers overlaid with cell culture medium containing 10% FBS (inoculate two wells per dilution) and incubate at 15°C; 24- or 12-well cell culture plates are suitable for this purpose, using a 50 µl inoculum.
- vii) Check the cell cultures for the onset of CPE and read the results for each suspect IHNV sample and compare to the occurrence of CPE of non-neutralised controls. Results are recorded either after a simple microscopic examination (phase contrast preferable) or after discarding the cell culture medium and staining cell monolayers with a solution of 1% crystal violet in 20% ethanol.
- viii) The tested virus is identified as IHNV when CPE is prevented or noticeably delayed in the cell cultures that received the virus suspension treated with the IHNV-specific antibody, whereas CPE is evident in all other cell cultures.

Other neutralisation tests of demonstrated performance may be used instead.

#### **4.9.2. Indirect fluorescent antibody test (IFAT) (identification in cell culture)**

- i) Prepare monolayers of cells in 2 cm<sup>2</sup> wells of cell culture plastic plates or on cover slips in order to reach around 80% confluency, which is usually achieved within 24 hours of incubation at 22°C – the optimal temperature of the cell line in question (e.g. 26°C for EPC and 20°C for RTG) (seed six cell monolayers per virus isolate to be identified, plus two for positive and two for negative controls). The FBS content of the cell culture medium can be reduced to 2–4%. If numerous virus isolates have to be identified, the use of black 96-well plates for immunofluorescence is recommended.
- ii) When the cell monolayers are ready for infection (i.e. on the same day or on the day after seeding) inoculate the virus suspensions to be identified by making tenfold dilution steps directly in the cell culture wells or flasks.
- iii) Dilute the control virus suspension of IHNV in a similar way, in order to obtain a virus titre of about 5,000–10,000 plaque-forming units (PFU)/ml in the cell culture medium.
- iv) Incubate at 15°C for 24 hours.
- v) Remove the cell culture medium, rinse once with 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, then three times briefly with a cold mixture of acetone 30%/ethanol 70% (v/v) (stored at –20°C).
- vi) Let the fixative act for 15 minutes. A volume of 0.5 ml is adequate for 2 cm<sup>2</sup> of cell monolayer.
- vii) Allow the cell monolayers to air-dry for at least 30 minutes and process immediately or freeze at –20°C.
- viii) Prepare a solution of purified IHNV antibody or serum in 0.01 M PBS, pH 7.2, containing 0.05% Tween-80 (PBST), at the appropriate dilution (which has been established previously or is given by the reagent supplier).
- ix) Rehydrate the dried cell monolayers by four rinsing steps with the PBST solution and remove this buffer completely after the last rinsing.
- x) Treat the cell monolayers with the antibody solution for 1 hour at 37°C in a humid chamber and do not allow evaporation to occur (e.g. by adding a piece of wet cotton to the humid chamber). The volume of solution to be used is 0.25 ml/2 cm<sup>2</sup> well.
- xi) Rinse four times with PBST as above.
- xii) Treat the cell monolayers for 1 hour at 37°C with a solution of fluorescein isothiocyanate- or tetramethylrhodamine-5-(and-6-) isothiocyanate-conjugated antibody to the immunoglobulin used in the first layer and prepared according to the instructions of the supplier. These conjugated antibodies are most often rabbit or goat antibodies.
- xiii) Rinse four times with PBST.
- xiv) Examine the treated cell monolayers on plastic plates immediately, or mount the cover slips using, for example, glycerol saline, pH 8.5 prior to microscopic observation.



- xv) Examine under incident UV light using a microscope with × 10 eye pieces and × 20–40 objective lens having numerical aperture >0.65 and >1.3, respectively. Positive and negative controls must be found to give the expected results prior to any other observation.

Other IFAT or immunocytochemical (alkaline phosphatase or peroxidase) techniques of demonstrated performance may be used instead.

#### **4.9.3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

- i) Coat the wells of microplates designed for ELISAs with appropriate dilutions of purified immunoglobulins (Ig) or serum specific for IHNV, in 0.01 M PBS, pH 7.2 (200 µl/well).
- ii) Incubate overnight at 4°C.
- iii) Rinse four times with 0.01 M PBS containing 0.05% Tween-20 (PBST).
- iv) Block with skim milk (5% in PBST) or other blocking solution for 1 hour at 37°C (200 µl/well).
- v) Rinse four times with PBST.
- vi) Add 2% Triton X-100 to the virus suspension to be identified.
- vii) Dispense 100 µl/well of two- or four-step dilutions of the virus to be identified and of IHNV control virus, and a heterologous virus control (e.g. viral haemorrhagic septicaemia virus). Allow the samples to react with the coated antibody to IHNV for 1 hour at 20°C.
- viii) Rinse four times with PBST.
- ix) Add to the wells either biotinylated polyclonal IHNV antiserum or MAb to N protein specific for a domain different from the one of the coating MAb and previously conjugated with biotin.
- x) Incubate for 1 hour at 37°C.
- xi) Rinse four times with PBST.
- xii) Add streptavidin-conjugated horseradish peroxidase to those wells that have received the biotin-conjugated antibody, and incubate for 1 hour at 20°C.
- xiii) Rinse four times with PBST. Add the substrate and chromogen. Stop the course of the test when positive controls react and read the results.
- xiv) Interpretation of the results is according to the optical absorbencies achieved by negative and positive controls and must follow the guidelines for each test, e.g. absorbency at 450 nm of positive control must be minimum 5–10 × A450 of negative control.

The above biotin–avidin-based ELISA version is given as an example. Other ELISA versions of demonstrated performance may be used instead.

#### **4.10. Other serological methods**

Not applicable

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

Virus isolation in cell culture or real-time RT-PCR are the recommended tests for surveillance to demonstrate freedom from infection with IHNV.

### **6. Corroborative diagnostic criteria**

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

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

## 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>15</sup>

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

### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

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

- i) Positive result by real-time RT-PCR;
- ii) IHNV-typical CPE ~~Cytopathic effect~~ in cell culture.

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with IHNV is considered to shall be confirmed if, ~~in addition to the criteria in Section 6.1.1, positive results has been obtained on at least one animal from two test used in the following combination one or more of the following criteria is met:~~

- i) ~~Positive result by real-time RT-PCR followed by and detection of IHNV in a tissue sample by a positive result from a conventional~~ RT-PCR targeting a non-overlapping region of the genome and amplicon sequencing;
- ii) ~~CPE Isolation of virus in cell culture confirmed by identified as IHNV by real-time RT-PCR, conventional RT-PCR, IFAT, or Ag-ELISA, or by a neutralisation test and a positive result followed by and detection of IHNV in a tissue sample~~ by real-time RT-PCR;
- iii) ~~CPE Isolation of virus in cell culture confirmed by identified as IHNV by real-time RT-PCR, conventional RT-PCR, IFAT, or Ag-ELISA, or by a neutralisation test and followed by and detection of IHNV in a tissue sample~~ by conventional RT-PCR and amplicon sequencing.
- iv) ~~Positive result by real-time RT-PCR followed by isolation of virus in cell culture confirmed by identified as IHNV by real-time RT-PCR, conventional PCR, IFAT, Ag-ELISA, or by a neutralisation test and amplicon sequencing.~~

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

## 6.2. Clinically affected animals

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

### 6.2.1. Definition of suspect case in clinically affected animals

The presence of infection with 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) ~~Positive result by real-time RT-PCR;~~

<sup>15</sup> For example transboundary commodities.

ii) Histopathological changes characteristic of infection with IHNV;

iii) IHNV-typical CPE Cytopathic effect in cell culture;

iv) Positive result by real-time RT-PCR;

v) Positive result by conventional RT-PCR.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with IHNV is considered to shall be confirmed if, in addition to the criteria in Section 6.2.1, positive results has been obtained on at least one animal from two tests used in the following combination one or more of the following criteria is met:

- i) Positive result by real-time RT-PCR followed by and detection of IHNV in a tissue sample a positive result from a conventional RT-PCR targeting a non-overlapping region of the genome and amplicon sequencing;
- ii) CPE Isolation of virus in cell culture confirmed by identified as IHNV by real-time RT-PCR, conventional RT-PCR, IFAT, or Ag-ELISA, or by a neutralisation test and a positive result followed by and detection of IHNV in a tissue sample by real-time RT-PCR;
- iii) CPE Isolation of virus in cell culture confirmed by identified as IHNV by real-time RT-PCR, conventional RT-PCR, IFAT, or Ag-ELISA, or by a neutralisation test and followed by and detection of IHNV in a tissue sample by conventional RT-PCR and amplicon sequencing.
- iv) Positive result by real-time RT-PCR followed by isolation of virus in cell culture confirmed by identified as IHNV by real-time RT-PCR, conventional PCR, IFAT, Ag-ELISA, or by a neutralisation test and amplicon sequencing.

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

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with IHNV is provided in Table 6.3. 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 is only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

**Table 6.3. Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis**

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSP (n)	Reference test	Citation
Real-time RT-PCR	Diagnosis	Experimentally infected salmon	Kidney	Steelhead Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	100 (50)	100 (50)	Animals of known infection status	Purcell <i>et al.</i> , 2013
RT-PCR (single step)	Diagnosis	Experimentally infected salmon	Kidney	Steelhead Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	58 (50)	100 (50)	Animals of known infection status	Purcell <i>et al.</i> , 2013
Virus Isolation	Diagnosis	Experimentally infected salmon	Kidney	Steelhead Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	84 (50)	100 (50)	Animals of known infection status	Purcell <i>et al.</i> , 2013
		Field samples	Kidney and spleen	Atlantic salmon ( <i>Salmo salar</i> )	80-86 (50)	100 (50)	Clinical signs – history	McClure <i>et al.</i> , 2008

DSe = diagnostic sensitivity; DSP = diagnostic specificity; *n* = number of samples used in the study;  
RT-LAMP: = real-time loop mediated isothermal amplification. \*Listed as suitable test

## 7. References

- ALONSO M. & LEONG J. (2013). Licensed DNA vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Recent Pat. DNA Gene Seq.*, **7**, 62–65.
- AUINGER B.M., PFANDL K. & BOENIGK J. (2008). Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2505–2510.
- BALMER B.F., POWERS R.L., ZHANG T.-H., LEE J., VIGANT F., LEE B., JUNG M.E., PURCELL M.K., SNEKVIK K. & AGUILAR H.C. (2017). Inhibition of an aquatic rhabdovirus demonstrates promise of a broad-spectrum antiviral for use in aquaculture. *J. Virol.*, **91** (4), e02181–02116.
- BARLIC-MAGANJA D., STRANCAR M., HOSTNIK P., JENCIC V. & GROM J. (2002). Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods for routine diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **25**, 73–80.
- BARROSO R.M., WHEELER P.A., LAPATRA S.E., DREW R.E. & THORGAARD G.H. (2008). QTL for IHNV resistance and growth identified in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) X Yellowstone cutthroat (*Oncorhynchus clarki bouvieri*) trout cross. *Aquaculture*, **277**, 156–163.
- BATTS W.N. & WINTON J.R. (1989). Concentration of infectious hematopoietic necrosis virus from water samples by tangential flow filtration and polyethylene glycol precipitation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 964–968.
- BOOTLAND L.M. & LEONG J.C. (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. *In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections*, Woo P.T.K. & Bruno D.W., eds. CAB International, Oxon, UK, 57–121.
- BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S.E., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. & MIDTLING P.J. (2005). Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents. Available at: <http://www.crl-fish.eu/upload/sites/crl-fish/reports/links/fishegtrade%20wp1.pdf>
- BRUDESETH B.E., CASTRIC J. & EVENSEN O. (2002). Studies on pathogenesis following single and double infection with viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Pathol.*, **39**, 180–189.**
- BURBANK D.R., FEHRINGER T.R. & CHIARAMONTE L.V. (2017). Comparison of selected nonlethal samples from adult steelhead for detection of infectious hematopoietic necrosis virus using cell culture. *J. Aquat. Anim. Health*, **29**, 67–73.
- BURKE J. & MULCAHY D. (1983). Retention of infectious haematopoietic necrosis virus infectivity in fish tissue homogenates and fluids stored at three temperatures. *J. Fish Dis.*, **6**, 543–547.
- CIESLAK M., WAHLI T., DISERENS N., HAENEN O.L.M. & SCHUTZE H. (2017). Phylogeny of the infectious hematopoietic necrosis virus in European aquaculture. *PloS one*, **12** (9), e0184490.
- CUENCA A., VENDRAMIN N. & OLESEN N.J. (2020). Analytical validation of one-step realtime RT-PCR for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **40**, 259–272.**
- DIXON P., PALEY R., ALEGRIA-MORAN R. & OIDTMANN B. (2016). Epidemiological characteristics of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV): a review. *Vet. Res.*, **47**, 63.
- DROLET B.S., CHIOU P.P., HEIDEL J. & LEONG J.A. (1995). Detection of truncated virus particles in a persistent RNA virus infection *in vivo*. *J. Virol.*, **69**, 2140–2147.
- DROLET B.S., ROHOVEC J.S. & LEONG J.C. (1994). The route of entry and progression of infectious haematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemical study. *J. Fish Dis.*, **17**, 337–347.
- EMMENEGGER E.J., MEYERS T.R., BURTON T.O. & KURATH G. (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska. *Dis. Aquat. Org.*, **40**, 163–176.

- ENZMANN P.J., CASTRIC J., BOVO G., THIERY R., FICHTNER D., SCHÜTZE H. & WAHLI T. (2010). Evolution of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV), a fish rhabdovirus, in Europe over 20 years: implications for control. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 9–15.
- ENZMANN P.J., KURATH G., FICHTNER D. & BERGMANN S.M. (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: Monophyletic origin of European IHNV isolates from North-American genogroup M. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 187–195.
- FOOTT J.S., FREE D., MCDOWELL T., ARKUSH K.D. & HEDRICK R.P. (2006). Infectious hematopoietic necrosis virus transmission and disease among juvenile Chinook salmon exposed in culture compared to environmentally relevant conditions. *San Franc. Estuary Watershed Sci.*, **4** (1).
- GARVER K.A., CONWAY C.M., ELLIOTT D.G. & KURATH G. (2005). Analysis of DNA-vaccinated fish reveals viral antigen in muscle, kidney and thymus, and transient histopathologic changes. *Mar. Biotechnol.*, **7**, 540–553. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-5129>
- GARVER K.A., BATTS W.N. & KURATH G. (2006). Virulence comparisons of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) U and M genogroups in sockeye salmon and rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health*, **18**, 232–243. doi: 10.1577/h05-038.
- GARVER K.A., MAHONY-GRANT A.M., STUCCHI D.J., RICHARD J., VAN WOENSEL C. & FOREMAN M.G.G. (2013). Estimation of parameters influencing waterborne transmission of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *PLoS One*, **8** (12), e82296. doi: 10.1371/journal.pone.0082296. pmid:24340016.
- GARVER K.A. & WADE J. (2017). Characterization of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV). *Canadian Science Advisory Secretariat (CSAS)*, **073**.
- GOSTING L.H. & GOULD R.W. (1981). Thermal inactivation of infectious hematopoietic necrosis and infectious pancreatic necrosis viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1081–1082.
- HARMACHE A., LEBERRE M., DROINEAU S., GIOVANNINI M. & BREMONT M. (2006). Bioluminescence imaging of live infected salmonids reveals that the fin bases are the major portal of entry for Novirhabdovirus. *J. Virol.*, **80**, 3655–3659.
- HASOBE M. & SANEYOSHI M. (1985). On the approach to the viral chemotherapy against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) *in vitro* and *in vivo* on salmonid fishes. *Fish Pathol.*, **20**, 343–351.
- HOFERER M., AKIMKIN V., SKRYPISKI J., SCHÜTZE H. & STING R. (2019). Improvement of a diagnostic procedure in surveillance of the listed fish diseases IHN and VHS. *J. Fish Dis.*, **42**, 559–572.
- HOSTNIK P., BARLIC-MAGANJA D., STRANCAR M., JENCIC V., TOPLAK I. & GROM J. (2002). Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by cell culture isolation and RT-PCR methods. *Dis. Aquat. Org.*, **52**, 179–184.
- JAKOB E., BARKER D.S. & GARVER K.A. (2011). Vector potential of the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* in the transmission of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.*, **97**, 155–165.
- JOHANSSON T., EINER-JENSEN K., BATTS W.N., AHRENS P., BJÖRKBLOM C., KURATH G., BJÖRKLUND H. & LORENZEN N. (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. *Dis. Aquat. Org.*, **86**, 213–221.
- KAMEI Y., YOSHIMIZU M., EZURA Y. & KIMURA T. (1987). Effects of estuarine and marine waters on the infectivities of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Uni.*, **38**, 271–285.
- KELL A.M., WARGO A.R. & KURATH G. (2014). Viral fitness does not correlate with three genotype displacement events involving infectious hematopoietic necrosis virus. *Virology*, **464**, 146–155.
- KIM C.H., DUMMER D.M., CHIOU P.P. & LEONG J.A. (1999). Truncated particles produced in fish surviving infectious hematopoietic necrosis virus infection: mediators of persistence? *J. Virol.*, **73**, 843–849.

KNUSEL R., BERGMANN S.M., EINER-JENSEN K., CASEY J., SEGNER H. & WAHLI T. (2007). Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? *J. Fish Dis.*, **30**, 559–568. doi: JFD842 [pii]

KOŁODZIEJEK J., SCHACHNER O., DURRWALD R., LATIF M. & NOWOTNY N. (2008). “Mid-G” region sequences of the glycoprotein gene of Austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates form two lineages within European isolates and are distinct from American and Asian lineages. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 22–30.

KURATH G., GARVER K.A., TROYER R.M., EMMENEGGER E.J., EINER-JENSEN K. & ANDERSEN E.D. (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J. Gen. Virol.*, **84**, 803–814.

LAPATRA S.E. (1998). Factors affecting pathogenicity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) for salmonid fish. *J Aquat Anim Health*, **10**, 121–131.

LAPATRA S.E., LAUDA K.A., JONES G.R., WALKER S.C., SHEWMAKER B.S. & MORTON A.W. (1995). Characterization of IHNV isolates associated with neurotropism. *Vet. Res.*, **26**, 433–437.

LAPATRA S.E., ROHOVEC J.S. & FRYER J.L. (1989). Detection of infectious hematopoietic necrosis virus in fish mucus. *Fish Pathol.*, **24**, 197–202.

MCCLURE C., SAKSIDA S., KARREMAN G., CONSTANTINE J., ROBINSON J., TRAXLER G. & HAMMELL L. (2008). Evaluation of a reverse transcriptase polymerase chain reaction test and virus isolation on field samples collected for the diagnosis of infectious hematopoietic necrosis virus in cultured Atlantic salmon in British Columbia. *J. Aquat. Anim. Health*, **20**, 12–18.

MEYERS T.R., KORN D., BURTON T.M., GLASS K., FOLLETT J.E., THOMAS J.B., SULLIVAN J., STARKEY N., SHORT S. & LIPSON K. (2003). Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in Alaskan sockeye salmon culture from 1973 to 2000: annual virus prevalences and titers in broodstocks compared with juvenile losses. *J. Aquat. Anim. Health*, **15**, 21–30.

MORZUNOV S.P., WINTON J.R. & NICHOL S.T. (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res.*, **38**, 175–192.

MULCAHY D., BURKE J., PASCHO R. & JENES C.K. (1982). Pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis virus in spawning sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**, 1144–1149. 10.1111/j.1365-2761.2007.00842.x.

MULCAHY D., JENES C.K. & PASCHO R. (1984). Appearance and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their spawning migration. *Arch. Virol.*, **80**, 171–181.

~~MULCAHY D. & PASCHO R.J. (1985). Vertical transmission of infectious haematopoietic necrosis virus in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum): isolation of virus from dead eggs and fry. *J Fish Dis*, **8**, 393–396.~~

MULEI I.R., NYAGA P.N., MBUTHIA P.G., WARUIRU R.M., XU C., EVENSEN Ø. & MUTOLOKI S. (2019). First detection and isolation of infectious haematopoietic necrosis virus from farmed rainbow trout in Nyeri County, Kenya. *J. Fish Dis.*, **42**, 751–758. doi: 10.1111/jfd.12979. Epub 2019 Feb 26.

MULLER A., SUTHERLAND B.J.G., KOOP B.F., JOHNSON S.C. & GARVER K.A. (2015). Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) persistence in Sockeye Salmon: influence on brain transcriptome and subsequent response to the viral mimic poly(I:C). *BMC Genomics*, **16**, 1–19.

NISHIZAWA T., KINOSHITA S., KIM W.S., HIGASHI S. & YOSHIMIZU M. (2006). Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 267–272.

OGUT H. & RENO P. (2004). Effects of fish density on spread of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Israeli J. Aquaculture*, **56**, 218–225.

OOI E.L., VERJANA N., HARAGUCHIA I., OSHIMA T., KONDO H., HIRONO I, AOKI T., KIYONO H & YUKI Y. (2008). Innate immunomodulation with recombinant interferon-alpha enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Dev. Comp. Immunol.*, **32**, 1211–1220.

PASCOLI F., BILO F., MARZANO F.N., BORGHESAN F., MANCIN M., MANFRIN A. & TOFFAN A. (2015). Susceptibility of genotyped marble trout *Salmo marmoratus* (Cuvier, 1829) strains to experimental challenge with European viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Aquaculture*, **435**, 152–156.

PHAM P.H., SOKEECHAND B.S., GARVER K.A., JONES G., LUMSDEN J.S. & BOLS N.C. (2018). Fish viruses stored in RNAlater can remain infectious and even be temporarily protected from inactivation by heat or by tissue homogenates. *J. Virol. Methods*, **253**, 31–37.

PIETSCH J.P., AMEND D.F. & MILLER C.M. (1977). Survival of infectious hematopoietic necrosis virus held under various environmental conditions. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 1360–1364.

PURCELL M.K., LAPATRA S.E., WOODSON J.C., KURATH G. & WINTON J.R. (2010). Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish Shellfish Immunol.*, **28**, 98–105.

PURCELL M.K., THOMPSON R., GARVER K.A., HAWLEY L.M., BATTS W.N., SPRAGUE L., SAMPSON C. & WINTON J.R. (2013). Universal reverse-transcriptase real-time PCR for infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Dis. Aquat. Org.*, **106**, 103–115.

SAKSIDA S.M. (2006). Infectious haematopoietic necrosis epidemic (2001 to 2003) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in British Columbia. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 213–223.

SALONIUS K., SIMARD N., HARLAND R. & ULMER J.B. (2007). The road to licensure of a DNA vaccine. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **8**, 635–641.

ST-HILAIRE S., RIBBLE C., TRAXLER G., DAVIES T. & KENT M.L. (2001). Evidence for a carrier state of infectious hematopoietic necrosis virus in chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 173–179.

TRAXLER G.S. (1986). An epizootic of infectious hematopoietic necrosis in 2-year-old kokanee, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) at Lake Cowichan, British Columbia. *J. Fish Dis.*, **9**, 545–549.

TRAXLER G.S., ROOME J.R., LAUDA K.A. & LAPATRA S. (1997). Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during their migration and maturation period. *Dis. Aquat. Org.*, **28**, 31–38.

WANG J., LIU Y., YU L., JIA P., CHEN B., SHI X., ZHENG X., LAN W., HE J. & LIU H. (2016). Characterization of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idellus*) Ovary Cell Line and Its Susceptibility to Spring Viremia of Carp Virus. *Prog. Fish. Sci.*, **37**, 56–60.

WINTON J.R. (1991). Recent advances in the detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in aquaculture. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **1**, 83–93.

WINTON J.R. & EINER-JENSEN K. (2002). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: *Molecular Diagnosis of Salmonid Diseases*, Cunningham C.O., ed. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 49–79.

WOLF K. (1988). Infectious hematopoietic necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, pp. 83–114.

YAMAMOTO T., BATTS W.N., ARAKAWA C.K. & WINTON J.R. (1990a). Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: Whole-body assay and immunohistochemistry. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 271–280.

YAMAMOTO T. & CLERMONT T.J. (1990b). Multiplication of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus in Rainbow Trout following Immersion Infection: Organ Assay and Electron Microscopy. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**, 261–270.

YOSHIMIZU M., YOSHINAKA T., HATORI S. & KASAI H. (2005). Survivability of fish pathogenic viruses in environmental water, and inactivation of fish viruses. *Bull. Fish Res. Agency*, **2**, 47–54.

\*  
\* \*

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

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with viral haemorrhagic septicaemia virus

[Retour à l'ordre du jour](#)



## CHAPTER 2.3.10.

## INFECTION WITH VIRAL HAEMORRHAGIC SEPTICAEMIA VIRUS

---

### 1. Scope

Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) means infection with the pathogenic agent viral haemorrhagic septicaemia virus of the Genus *Novirhabdovirus* and Family *Rhabdoviridae*.

### 2. Disease information

#### 2.1. Agent factors

##### 2.1.1. Aetiological agent

VHSV is a bullet-shaped particle, approximately 70 nm in diameter and 180 nm in length, that contains a negative-sense, single-stranded RNA genome of approximately 11,000 nucleotides, and possesses an envelope that contains the membrane glycoprotein, which is the neutralising surface antigen. The genome encodes six proteins: a nucleoprotein N; a phosphoprotein P (formerly designated M1); a matrix protein M (formerly designated M2); a glycoprotein G; a non-virion protein NV and a polymerase L (Walker *et al.*, 2000).

G-gene nucleotide sequences have been used to classify VHSV isolates into four major genotypes (I, II, III and IV) and nine subtypes (Ia–Ie and IVa–IVd) with almost distinct geographical distributions (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Elsayed *et al.*, 2006). The host range and the pathogenicity appear, at least to some extent, to be linked to the genotype of VHSV.

##### i) Genotype Ia

Almost all VHSV isolates causing outbreaks in European rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms cluster in sub-lineage Ia, of which isolates have been reported from most continental European countries (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Kahns *et al.*, 2012; Snow *et al.*, 2004; Toplak *et al.*, 2010). However, genotype Ia isolates have also been detected in other **finfish** species **in Europe** such as brown trout (*Salmo trutta*), pike (*Esox lucius*) and grayling (*Thymallus thymallus*) (de Kinkelin & Le Berre, 1977; Jonstrup *et al.*, 2009). Genotype Ia isolates have generally caused outbreaks in **freshwater-farmed rainbow trout European freshwater farms**, but isolates have also been obtained from **sea-reared** rainbow trout **in seawater net pens** and turbot (*Scophthalmus maximus* ~~syn. *Psetta maxima*~~) (Schlotfeldt *et al.*, 1991; Snow *et al.*, 2004). Genotype Ia can be further subdivided into two major subpopulations, Ia-1 and Ia-2, with a distinct geographic distribution within Europe (Kahns *et al.*, 2012).

##### ii) Genotype Ib

~~The isolates included in this genotype~~ Viruses have been ~~isolated~~ obtained from **finfish** in the marine environment in the Baltic Sea, Kattegat, Skagerrak, the North Sea and the English Channel (Einer-Jensen *et al.*, 2004; Skall *et al.*, 2005b; Snow *et al.*, 2004) and as far north as latitude 70°N close to Nordkapp in Norway (Sandlund *et al.*, 2014). A single case was observed in Japan (Nishizawa *et al.*, 2002). None of the isolations from wild fish has been associated with clinical disease outbreaks (Johansen *et al.*, 2013). Genotype Ib has been associated with evidence of transfer between wild fish and farmed rainbow trout in only two cases in pen-reared rainbow trout in Sweden in 1998 and 2000 (Nordblom, 1998; Nordblom & Norell, 2000; Skall *et al.*, 2005a).

iii) Genotype Ic

This genotype ~~consists of~~ is a smaller group ~~consisting~~ of Danish isolates from freshwater farmed rainbow trout isolates from earlier dates. Isolates of this genotype have also been ~~identified~~ detected in Germany and Austria (Jonstrup *et al.*, 2009).

iv) Genotype Id

This group ~~The isolates included in this genotype~~ consists of some old Scandinavian isolates from the 1960s ~~and from until the first VHS outbreaks of infection with VHSV occurred~~ in Finland in sea-reared rainbow trout in 2000. ~~These outbreaks occurred in~~ at two different areas ~~where and all of the isolates sampled were~~ proved to be clustered in the Id genotype group. In infection trials, it was demonstrated that the isolates were pathogenic to rainbow trout, but less virulent than most Ia isolates (Raja-Halli *et al.*, 2006).

v) Genotype Ie

These isolates included in this genotype have been obtained from both freshwater and marine (the Black Sea) environments in Georgia and Turkey. Isolations were from both farmed and wild turbot (Jonstrup *et al.*, 2009; Kalayci *et al.*, 2006; Nishizawa *et al.*, 2006) and from rainbow trout (Einer-Jensen *et al.*, 2004). VHSV Ie has also been ~~identified~~ isolated from in whiting (*Merlangius merlangus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ~~from in~~ the Black Sea (Altuntas & Ogut, 2010).

vi) Genotype II

The ~~members~~ isolates included in of this group ~~genotype consist of~~ have been primarily detected in marine isolates from wild finfish, in particular especially from Atlantic herring (*Clupea harengus*), from in the Baltic Sea, including the Gulf of Bothnia and the Gulf of Finland, (Gadd *et al.*, 2011; Snow *et al.*, 2004). Genotype II isolates have also been detected in lamprey (*Lampetra fluviatilis*) caught in freshwater from the rivers Kalajoki and Lestijoki, which have an outlet into the Gulf of Bothnia (Gadd *et al.*, 2010).

vii) Genotype III

These isolates included in this genotype originate from wild and farmed finfish in the North Atlantic Sea from the Flemish Cap (Lopez-Vazquez *et al.*, 2006b) to the Norwegian coast (Dale *et al.*, 2009), the North Sea around the British Isles, Skagerrak and Kattegat. ~~VHS outbreaks~~ Outbreaks of infection with VHSV in sea-farmed turbot in the United Kingdom and Ireland in the 1990s were attributed due to infection with genotype III isolates, and in 2007 an outbreak in sea-reared rainbow trout at the Norwegian west coast was due to VHSV genotype III. ~~VHS Outbreaks of infection with VHSV~~ in five species of wrasse used as cleaner fish around the Shetland Islands were also due to this genotype (Munro *et al.*, 2015).

viii) Genotype IVa

The isolates included in this genotype have been detected originate in finfish from the coastal environments of North America spanning from California to Alaska in the west and around the northeastern United States up through Newfoundland, Canada. This genotype has also been reported both the east and west coasts of North America, as well as from the Asian countries of South Korea and Japan. Genotype IVa isolates in North America have caused severe epidemics in numerous wild marine species such as Pacific herring (*Clupea pallasii pallasii*) (Meyers & Winton, 1995), which can serve as a reservoir of virus to sympatric sea-farmed not pen-farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Garver *et al.*, 2013). In Asia, genotype IVa isolates have caused disease outbreaks in olive flounder bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*) (Ogut & Altuntas, 2014).

ix) Genotype IVb

The isolates included in this genotype have been detected originate in finfish in fresh water originate from the North America Laurentian Great Lakes region (Gagne *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2011; Winton *et al.*, 2008) and where they have caused die-offs events in numerous fish species. ~~and have been detected in a micro-invertebrate (Diporeia spp.)~~ (Faisal & Winters, 2011).

x) Genotype IVc

The isolates included in this genotype originate have been detected from finfish from the estuarine waters of New Brunswick and Nova Scotia, Canada (Gagne *et al.*, 2007; Pierce & Stepien, 2012; Stepien *et al.*, 2015).

xi) Genotype IVd

The isolates included in this genotype originate have been detected in from Iceland where they were identified in wild and sea-farmed lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) (Gudmundsdottir *et al.*, 2019).

### 2.1.2. Survival and stability in processed or stored samples

VHSV survival in host tissue is dependent on the conditions for storage. VHSV can remains infectious for long time periods while stored frozen in fish tissue. However, VHSV-infected fish subjected to the at-commercial freezing process temperatures (core block temperature of  $-24^{\circ}\text{C}$ ) had a 90% reduction in viral titre after the tissue was thawed (Arkush *et al.*, 2006). VHSV is sensitive to enzymatic degradation, environments with high bacterial load and high temperatures (above  $28^{\circ}\text{C}$ ). Fresh (unfrozen) muscle tissue from VHSV-infected rainbow trout could transmit infection with VHSV to naïve fish (Oidtmann *et al.*, 2011a). VHSV is also-tolerant of high salt concentrations such as in brine-treated fish (Skall *et al.*, 2015) or while stored in concentrated ammonium sulphate solution (Pham *et al.*, 2018). For optimal retention of VHSV in fish tissue, the sample should be placed in transport medium with antibiotics and kept on ice without freezing and processed within 24 hours after sampling.

### 2.1.3. Survival and stability outside the host

VHSV survival outside the host is dependent on the physico-chemical conditions of the aqueous medium (Ahne, 1982) and on temperature: the virus survives for longer periods at  $4^{\circ}\text{C}$  compared with  $20^{\circ}\text{C}$  (Parry & Dixon, 1997).

VHSV is significantly more stable in freshwater than seawater-saltwater. The virus has been documented to persist in freshwater for 28–35 days at  $4^{\circ}\text{C}$  (Parry & Dixon, 1997) and has been found to be infective for 1 year at  $4^{\circ}\text{C}$  in filtered freshwater (Hawley & Garver, 2008). In raw freshwater at  $15^{\circ}\text{C}$ , the 99.9% inactivation time was 13 days, but in seawater the virus was inactivated within 4 days (Hawley & Garver, 2008). In another study using seawater at  $15^{\circ}\text{C}$ , the infectivity of the virus was reduced by 50% after 10 hours, but could still be recovered after 40 hours (Kocan *et al.*, 2001). There appears to be no consistent correlation between the origin and stability of the virus isolates: freshwater isolates are not always the most stable in freshwater and seawater isolates are not consistently more stable in seawater (Hawley & Garver, 2008).

The virus remains stable for a longer time if sterile organic materials are added to the water, such as ovarian fluids or blood products, such as bovine serum (Kocan *et al.*, 2001). When the seawater was sterilised by autoclaving, or when passed through a  $0.22\ \mu\text{m}$  membrane, virus survival was prolonged significantly (60 days at  $15^{\circ}\text{C}$  and 32 days at  $20^{\circ}\text{C}$ ), suggesting the bacterial load in the water is an important factor of viral decay.

## 2.2. Host factors

### 2.2.1. Susceptible host species

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

Family	Scientific name	Common name	Genotype
Ammodytidae	<i>Ammodytes hexapterus</i>	Pacific sand lance	IVa
Aralichthyidae	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Bastard halibut	IVa
Carangidae	<i>Trachurus mediterraneus</i>	Mediterranean horse mackerel	Ie
Centrarchidae	<i>Ambloplites rupestris</i>	Rock bass	IVb
	<i>Lepomis gibbosus</i>	Pumpkinseed	IVb
	<i>Lepomis macrochirus</i>	Bluegill	IV, IVb
	<i>Micropterus dolomieu</i>	Smallmouth bass	IVb
	<i>Micropterus salmoides</i>	Largemouth bass	IVb
	<i>Pomoxis nigromaculatus</i>	Black crappie	IVb
Clupeidae	<i>Alosa immaculata</i>	Pontic shad	Ie
	<i>Sardina pilchardus</i>	Pilchard	ND
	<i>Clupea harengus</i>	Atlantic herring	Ib, III
	<i>Clupea pallasii pallasii</i>	Pacific herring	IVa
	<i>Dorosoma cepedianum</i>	American gizzard shad	IVb
	<i>Sardinops sagax</i>	South American pilchard	IVa
	<i>Sprattus sprattus</i>	European sprat	Ib
Cyclopteridae	<i>Cyclopterus lumpus</i>	Lumpfish	IVd
Cyprinidae	<i>Danio rerio</i>	Zebra fish	IVa
	<i>Notropis hudsonius</i>	Spottail shiner	IVb

Family	Scientific name	Common name	Genotype
	<i>Notropis atherinoides</i>	Emerald shiner	IVb
	<i>Pimephales notatus</i>	Bluntnose minnow	IVb
	<i>Pimephales promelas</i>	Fathead minnow	IVb
Embiotocidae	<i>Cymatogaster aggregata</i>	Shiner perch	IVa
Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i>	European anchovy	le
Esocidae	<i>Esox lucius</i>	Northern pike	la, IVb
	<i>Esox masquinongy</i>	Muskellunge	IVb
Fundulidae	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Mummichog	IVc
Gadidae	<i>Gadus macrocephalus</i>	Pacific cod	IVa
	<i>Gadus morhua</i>	Atlantic cod	Ib, III
	<i>Merlangius merlangus</i>	Whiting	le
	<i>Micromesistius poutassou</i>	Blue whiting	Ib, III
	<i>Trisopterus esmarkii</i>	Norway pout	Ib, III
Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Three-spine stickleback	IVc
Gobiidae	<i>Neogobius melanostomus</i>	Round goby	IVb
	<i>Pomatoschistus minutus</i>	Sand goby	Ib
Ictaluridae	<i>Ictalurus Ameiurus nebulosus</i>	Brown bullhead	IVb
Labridae	<i>Centrolabrus exoletus</i>	Rock cook wrasse	III
	<i>Ctenolabrus rupestris</i>	Goldsinny wrasse	III
	<i>Labrus bergylta</i>	Ballan wrasse	III
	<i>Labrus mixtus</i>	Cuckoo wrasse	III
	<i>Symphodus melops</i>	Corkwing wrasse	III
Lotidae	<i>Gaidropsarus vulgaris</i>	Three-bearded rockling	le
Moronidae	<i>Morone americana</i>	White perch	IVb
	<i>Morone chrysops</i>	White bass	IVb
	<i>Morone saxatilis</i>	Striped bass	IVb, IVc
Mullidae	<i>Mullus barbatus</i>	Red mullet	le
Osmeridae	<i>Thaleichthys pacificus</i>	Eulachon	IVa
Percidae	<i>Sander vitreus</i>	Walleye	IVb
	<i>Perca flavescens</i>	Yellow perch	IVb
Petromyzontidae	<i>Lampetra fluviatilis</i>	River lamprey	II
Pleuronectidae	<i>Limanda limanda</i>	Common dab	Ib
	<i>Platichthys flesus</i>	European flounder	Ib
	<i>Pleuronectes platessus</i>	European plaice	III
Rajidae	<i>Raja clavata</i>	Thornback ray	le
Salmonidae	<i>Coregonus artedii</i>	Lake cisco	IVb
	<i>Coregonus clupeaformis</i>	Lake whitefish	IVb
	<i>Coregonus lavaretus</i>	Common whitefish	Ia
	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Coho salmon	IVa
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout	Ia-e, III, IVb
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Oncorhynchus kisutch</i> hybrids	Rainbow trout X coho salmon hybrids	Ia
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon	IVa, IVb
	<i>Salmo marmoratus</i>	Marble trout	Ia
	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	Ia, Ib, II, III, IVa
	<i>Salmo trutta</i>	Brown trout	Ia, Ib
	<i>Salvelinus namaycush</i>	Lake trout	Ia, IVa, IVb
<i>Thymallus thymallus</i>	Grayling	la	
Scophthalmidae	<i>Scophthalmus maxima</i>	Turbot	Ib, III
Sciaenidae	<i>Aplodinotus grunniens</i>	Freshwater drum	IVb
Scombridae	<i>Scomber japonicus</i>	Pacific chub mackerel	IVa
Soleidae	<i>Solea senegalensis</i>	Senegalese sole	III
Uranoscopidae	<i>Uranoscopus scaber</i>	Atlantic stargazer	le

ND: Not determined.

### 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 VHSV according to Chapter 1.5 of the Aquatic Code include are:

Family	Scientific name	Common name	Genotype
Adrianichthyidae	<i>Oryzias latipes</i>	Japanese rice fish	IVb
	<i>Oryzias dancena</i>	Marine medaka	IVa
Ammodytidae	<i>Ammodytes personatus</i>	Sandeel	Ib
Anguillidae	<i>Anguilla anguilla</i>	European eel	III

Family	Scientific name	Common name	Genotype
Argentinidae	<i>Argentina sphyraena</i>	Lesser Argentine	Ib
Belonidae	<i>Belone belone</i>	Garfish	Ie
Carangidae	<i>Seriola dumerili</i>	Greater amberjack	IVa
Catostomidae	<i>Catostomus commersonii</i>	White sucker	IVb
	<i>Moxostoma anisurum</i>	Silver redhorse	IVb
	<i>Moxostoma macrolepidotum</i>	Shorthead redhorse	IVb
Centrarchidae	<i>Pomoxi annularis</i>	White crappie	IVb
Clupeidae	<i>Alosa pseudoharengus</i>	Alewife	IVb
	<i>Clupea harengus</i> *	Atlantic herring*	IVa
Cottidae	<i>Cottus pollux</i>	Japanese fluvial sculpin	IVb
Cyprinidae	<i>Semotilus corporalis</i>	Fallfish	IVb
	<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Golden shiner	IVb
Esocidae	<i>Esox lucius</i> X <i>E. masquinongy</i> hybrids	Tiger muskellunge ( <i>Esox masquinongy</i> X <i>E. lucius</i> or <i>E. lucius</i> X <i>E. masquinongy</i> )	IVb
Fundulidae	<i>Fundulus diaphanus</i>	Banded killifish	IVb
Gadidae	<i>Gadiculus argenteus</i>	Silvery pout	Ib
	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Haddock	III
	<i>Theragra chalcogramma</i>	Alaska pollock	IVa
	<i>Trisopterus minutus</i>	Poor cod	III
Ictaluridae	<i>Ictalurus punctatus</i>	Channel catfish	IVb
Liparidae	<i>Liparis tessellatus</i>	Cubed snailfish	IV
Lotidae	<i>Lota lota</i>	Burbot	IVb
	<i>Enchelyopus cimbrius</i>	Fourbeard rockling	Ib
Merlucciidae	<i>Merluccius productus</i>	North Pacific hake	IVa
Moronidae	<i>Dicentrarchus labrax</i>	European sea bass	Ia
Mugilidae	<i>Mugil cephalus</i>	Flathead grey mullet	IV
Ophidiidae	<i>Hoplobrotula armata</i>	Armoured cusk	IV
Osmeridae	<i>Hypomesus pretiosus</i>	Surf smelt	ND
Oxudercidae	<i>Rhinogobius</i> sp. (undescribed species)	Yoshinobori	IVb
Percopsidae	<i>Percopsis omiscomaycus</i>	Trout perch	IVb
<b>Petromyzontinae</b>	<b><i>Petromyzon marinus</i></b>	<b>Sea lamprey</b>	<b>IVb</b>
Pleuronectidae	<i>Glyptocephalus stelleri</i>	Blackfin flounder	IVa
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Atlantic halibut	III
	<i>Reinhardtius hippoglossoides</i>	Greenland halibut	III
Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Salvelinus alpinus</i> hybrids	Rainbow trout X Arctic charr hybrids	Ia
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Salvelinus namaycush</i> hybrids	Rainbow trout X lake trout hybrids	Ia
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> X <i>Salmo trutta</i> hybrids	Rainbow trout X brown trout hybrids	Ia
	<i>Salvelinus alpinus</i>	Arctic charr	Ia
	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Brook trout	Ie
Sciaenidae	<i>Larimichthys polyactis</i>	Yellow croaker	IV
Scorpaenidae	<i>Scorpaena porcus</i>	Black scorpionfish	Ie
	<i>Scorpaena izensis</i>	Izu scorpionfish	IV
Scyliorhinidae	<i>Scyliorhinus torazame</i>	Claudy catshark	IV
Stromateidae	<i>Pampus argenteus</i>	Silver pomfret	IV
Trichiuridae	<i>Trichiurus lepturus</i>	Largehead hairtail	IV
Triglidae	<i>Eutrigla gurnardus</i>	Gray gurnard	III

ND: Not determined.

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

### 2.2.3. Non-susceptible species

None known.

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

Rainbow trout is the most susceptible species to VHSV infection with genotype Ia. For VHSV genotypes Ib, II and III, shoaling wild-living species such as Atlantic herring and European sprat (~~*Sprattus sprattus*~~) are likely to be the natural hosts, while for genotype IVa, Pacific herring is the natural host. VHSV genotype III has caused disease in farmed turbot and wrasse and genotype IVa in sea-farmed Atlantic salmon, turbot, and ~~olive flounder~~ bastard halibut.

Infection with VHSV may cause disease and mortality in all life stages of susceptible fish. VHSV does not infect fish eggs (Munro & Gregory, 2010).

In surveys of wild marine fish, VHSV has been isolated from most year classes. Few fry have been tested however, as they are usually not caught during the surveys. The highest prevalence of virus in sampled wild populations was found in shoaling fish, such as Atlantic herring, European sprat and Norway pout (~~*Sprattus sprattus*~~) (Skall *et al.*, 2005a).

For the purposes of Table 4.1 rainbow trout alevin and fry (e.g. up to approximately 1 g in weight) may be considered early life stages, fingerlings and ongrowing fish up to 50 g be considered as juveniles and fish over 50 g adults.

### 2.2.5.4. Distribution of the pathogen in the host

In fish showing clinical signs, the virus is abundant in all tissues including gill, skin and muscles (Sandlund *et al.*, 2014). Target organs are anterior kidney, heart and spleen, as these are the sites in which virus is most abundant. In chronic stages, virus titres can become high in the brain (Smail & Snow, 2011; Wolf, 1988).

### 2.2.6.5. Aquatic animal reservoirs of infection

Some survivors of epizootics will become long-term carriers of the virus. Pacific herring surviving infection with VHSV genotype IVa have transmitted disease to naïve cohabitants (Gross *et al.*, 2019). Almost all isolations of VHSV genotype Ib, II and III from wild free-living fish species are from individuals with no clinical signs of infection with VHSV and with low virus titres (Skall *et al.*, 2005a).

### 2.2.7.6. Vectors

VHSV has been detected in numerous species of animals, which are not susceptible species and may therefore may act as vectors. However, there is no demonstrated transmission of VHSV by vectors has not been demonstrated. VHSV has been isolated from common snapping turtle (*Chelra serpentina*), leech

(*Myzobdella lugubris*), northern map turtle (*Graptemys geographicas*) and water flea (*Moina macrocopa*) and these species are considered may be potential to be vectors for transmission of VHSV rather than true susceptible species (Faisal & Schultz, 2009; Goodwin & Merry, 2011; Ito & Olesen, 2017). VHSV has also been isolated from the amphipods *Hyalella* spp. and *Diporeia* spp., suggesting that benthic macroinvertebrates may be vectors for VHSV IVb in endemically affected systems. In contrast VHSV was not detected in mussels or sediments in the same water environment (Faisal & Winters 2011; Throckmorton *et al.*, 2017). VHSV has also been isolated from leech, *Myzobdella lugubris*, in the Great Lakes ~~but whether the leech or amphipods can transmit VHSV from one fish to another is unknown~~ (Faisal & Schulz, 2009; Faisal & Winters, 2011).

Piscivorous birds may act as VHSV vectors by carrying the virus, for example, on their beaks and feet (Olesen & Jorgensen, 1982), or through regurgitation of infected fish (Peters & Neukirch, 1986).

## 2.3. Disease pattern

### 2.3.1. Mortality, morbidity and prevalence

Mortality varies, depending on many environmental and physiological conditions, most of which have not been fully determined. The disease is, in general, a cool or cold water disease with highest mortality at temperatures around 9–12°C. Small rainbow trout fry (0.3–3 g) are most susceptible to genotype Ia with mortalities close to 100%, but all sizes of rainbow trout can be affected with mortalities ranging from 5 to 90% (Skall *et al.*, 2004). Immersion infection trials also induced up to 100% mortality in Pacific herring when challenged with genotype IVa (Hershberger *et al.*, 2010a). Mortality in free-living-wild-fin fish also varies from no observable deaths to severe die-offs. The prevalence of VHSV genotype Ib, II and III varies from 0 to 16.7% in Northern European waters (Skall *et al.*, 2005b).

### 2.3.2. Clinical signs, including behavioural changes

The occurrence of the following clinical signs is characteristic of infection with VHSV: rapid onset of mortality, lethargy, darkening of the skin, exophthalmia, anaemia (pale gills), haemorrhages at the base of the fins or in the gills, eyes or skin, abnormal swimming such as flashing and spiralling, and a distended abdomen due to oedema in the peritoneal cavity. In rainbow trout, the clinical appearance is typically lethargic dark fish with exophthalmia at the pond shores and the outlet. Characteristically, diseased fish will not attempt to escape when netted.

Infection with some genotypes of VHSV results in have specific predominant clinical signs of infection with VHSV in some susceptible species. Skin lesions in cod and herring from the Pacific and Atlantic Oceans (including the North Sea), and in haddock from the North Sea, have been described frequently (Jensen & Larsen, 1979; Meyers *et al.*, 1992; Meyers & Winton, 1995; Smail, 2000; Vestergard Jorgensen & Olesen, 1987). In farmed Japanese flounder bastard halibut, an 'anaemic' form (pale gills) of infection with VHSV has also been described (Isshiki *et al.*, 2001).

### 2.3.3 Gross pathology

Gross pathology includes generalised petechial haemorrhaging in the skin, muscle tissue (especially in dorsal muscles) and internal organs. It is important to examine the dorsal musculature for the presence of petechial bleeding, which is a very common sign of infection with VHSV. The kidney is dark red in the acute phase and can demonstrate severe necrosis in moribund fish. The spleen is moderately swollen. The liver is often pale and mottled. The gastrointestinal tract, especially the hindgut, is pale and devoid of food.

### 2.3.4. Modes of transmission and life cycle

Transmission primarily occurs horizontally through water, with excretion of virus in the urine, and directly from the skin (Smail & Snow, 2011). Oral transmission was also demonstrated indicating that preying on infected fish and vectors may transfer the disease (Schonherz *et al.* 2012).

Experimentally it has been demonstrated that feeding fresh (unfrozen) muscle tissue from VHSV-infected rainbow trout can transmit VHSV to naïve fish (Oidtmann *et al.*, 2011<sup>a</sup>).

There are no indications or evidence of true vertical transmission of VHSV (Bovo *et al.*, 2005a; Munro & Gregory, 2010).

### 2.3.5. Environmental and management factors

Disease generally occurs at temperatures between 4°C and 14°C. At water temperatures between 15°C and 18°C, the disease generally takes a short course with low levels of mortality.

Low water temperatures (1–5°C) generally result in an extended disease course with low daily mortality but high accumulated mortality. Outbreaks of infection with VHSV occur during all seasons but are most common in spring when water temperatures are rising or fluctuating.

Field observations and experimental studies suggest that warmer water temperatures greatly reduce or inhibit transmission. Natural outbreaks of infection with VHSV are not observed at water temperatures greater than 18°C. In challenge trials, fish exposed to VHSV and reared at temperatures below 15°C displayed high mortality whereas those infected and reared at 20°C did not (Arkush *et al.*, 2006; Castric & de Kinkelin, 1984). For more detailed reviews, see Wolf (1988) and Smail & Snow (2011).

### 2.3.6. Geographical distribution

Until the late 1980s, VHSV was considered to be restricted to farmed rainbow trout in continental Europe, with the occasional isolation from a restricted number of other freshwater fish species (e.g. brown trout, pike [Moier & Jorgensen, 1980; Schlotfoldt & Ahne, 1988]). With the detection and isolation of VHSV from Pacific salmon off the Pacific North American coast in the late 1980s, subsequent studies have demonstrated that infection with VHSV occurs in numerous farmed and wild fish species along the Pacific and Atlantic North American coast (Skall *et al.*, 2005), in the Great Lakes area of North America (Thompson *et al.*, 2011), the seas around the UK (Skall *et al.*, 2005), the Baltic Sea, Skagerrak and Kattegat (Skall *et al.*, 2005), in the waters around Japan (Skall *et al.*, 2005), and in the Black Sea area, with the distinct genotype 1c (Nishizawa *et al.*, 2006).

Infection with VHSV in farmed rainbow trout has been reported from countries in Europe, North America and North Asia. Some countries in these regions have declared freedom from infection with VHSV, almost all European and Middle East countries and from China (People's Rep. of) and Russia. However, a number of countries in Europe, such as Denmark, Ireland, Norway, Sweden and UK, are officially declared free of infection with VHSV. Infection with VHSV. The disease has never been reported from the Southern Hemisphere.

For recent information on distribution at the country level consult the WAHIS interface ([https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home/index/newlang/en)).

## 2.4. Biosecurity and disease control strategies

### 2.4.1. Vaccination

Although research on vaccine development for VHSV has been ongoing for more than four decades, the only commercial vaccine available is against VHSV genotype IVa for bastard halibut in Korea a commercial vaccine is not yet available. Candidate vaccines have included killed vaccines, attenuated live vaccines, a recombinant vaccine in prokaryotic and eukaryotic expression systems, and DNA-based vaccines. For a review see Lorenzen & LaPatra (2005). No vaccines currently affect the diagnostic sensitivity and specificity of tests for infection with VHSV diagnostics.

### 2.4.2. Chemotherapy including blocking agents

No therapies are currently available.

### 2.4.3. Immunostimulation

Several immunostimulants, such as yeast-derived beta-glucans, IL-1 $\beta$ -derived peptides, and probiotics have been assessed for enhancing protection against infection with VHSV (Peddie *et al.*, 2003). Several researchers report positive effects, but no immunostimulant directed specifically at enhanced resistance to infection with VHSV is available. Furthermore, it remains unknown as to whether their use can affect sensitivity and specificity of infection with VHSV assays diagnostics.



#### 2.4.4. Breeding resistant strains

Additive genetic variation in rainbow trout ~~has been detected~~ for resistance to infection with VHSV has been demonstrated (Dorson *et al.*, 1995; Henryon *et al.*, 2002a; 2002b). In a study by Henryon *et al.* (2005), the heritability of resistance to VHSV was 0.11 for time to death on a logarithmic timescale. Identification of a major quantitative trait loci (QTL) for VHSV resistance in rainbow trout may pave the way for genetic selection for VHSV resistant fish (Verrier *et al.*, 2013), however, no resistant rainbow trout strains are yet commercially available.

#### 2.4.5. Inactivation methods

VHSV is sensitive to a number of common disinfectants (e.g. UV light, chlorine, iodophore, sodium hypochlorite), to temperatures above 30°C, to bacterial degradation in sediments and enzymatic activity in decomposing fish. For a review see Bovo *et al.*, 2005b.

#### 2.4.6. Disinfection of eggs and larvae

Disinfection of newly fertilised or eyed and green eggs is an efficient and cost-effective preventative measure for stopping the spread of the disease in salmonids (for the recommended protocol see Chapter 4.4. of the *Aquatic Code*).

#### 2.4.7. General husbandry

Poor water quality, high fish density, high feeding rate, infection with other diseases such as proliferative kidney disease, ichthyophthiriasis, bacterial kidney disease, etc. can influence the course and severity of infection with VHSV. In general, an increase in temperature, restricted feeding, reduced fish density and restricted handling may reduce mortality. In endemically infected farms, stocking with naïve fry is usually done at a high when the water temperatures is at near maximum levels as possible.

### 3. Specimen selection, sample collection, transportation and handling

#### 3.1. Selection of populations and individual specimens

Clinical inspections should be carried out during a period when the water temperature is below 14°C or whenever the water temperature is likely to reach its lowest annual point. All production units (ponds, tanks, net-cages, etc.) should be inspected for the presence of dead, weak or abnormally behaving fish. Particular attention should be paid to the water outlet area where weak fish tend to accumulate due to the water current.

Fish to be sampled are selected as follows:

- i) For genotype I, in farms where rainbow trout are present, ~~only~~ fish of that species should be selected for sampling. If rainbow trout are not present, the sample should be obtained from fish of all other VHSV-susceptible species present (as listed in Tables 2.1) ~~and or from species with incomplete evidence for susceptibility (as listed in Table 2.2)~~. However, the species should be proportionally represented in the sample. For other genotypes (II, III, and IV), species of known susceptibility to the genotype in question should be sampled.
- ii) Susceptible species should be sampled following risk-based criteria for targeted selection of populations with a history of abnormal mortality or potential exposure events (e.g. via untreated surface water, wild harvest or introduction of stocks of unknown risk status).
- iii) If more than one water source is used for fish production, fish from all water sources should be included in the sample.

#### 3.2. Selection of organs or tissues

The optimal tissues material to be examined is are spleen, anterior kidney, heart and encephalon. When sampling broodstock, in some cases, ovarian fluid and milt can be taken must be examined.

In case of small fry, whole fish less than 4 cm long can be minced with sterile scissors or a scalpel after removal of the body behind the anal pore gut opening. If a sample consists of whole fish with a body length between 4 cm and 6 cm, the viscera including kidney should be collected. For larger size fish, kidney, spleen, heart and encephalon, and ovarian fluid from brood fish at the time of spawning should be the tissues to be sampled.

In populations with clinical disease, the optimal tissues are anterior kidney, spleen and heart (Lovy *et al.*, 2012; Oidtmann *et al.*, 2011).

In apparently healthy populations, the optimal tissues are anterior kidney and heart and, during the chronic phase of infection, brain, as VHSV can persist in tissues of the nervous system (Hershberger, 2010b; Lovy *et al.*, 2012; Oidtmann *et al.*, 2011b).

When sampling fish too small in size to permit dissection of individual tissues, viscera including kidney should be collected or whole fish homogenised after removal of the body behind the anal pore. When sampling broodstock, ovarian fluid and milt can be taken.

### 3.3. Samples or tissues not suitable for pathogen detection

When possible, tissues with high enzymatic activity such as liver and viscera should be avoided as VHSV is very sensitive to enzymatic degradation, therefore, sampling tissues with high enzymatic activities, such as viscera and liver, or large numbers of contaminating bacteria, such as the intestine or skin, should be avoided. When performing cell culture assays tissues containing high bacteria counts, such as the intestine or skin, should be avoided to minimise risk of bacterial contamination of tissue culture cells. Preservatives and fixatives, such as RNAlater and formaldehyde can be toxic to tissue culture cells such as epithelioma papulosum cyprini (EPC) and fathead minnow (FHM), and can impact molecular detection methods (Auinger *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 2018).

### 3.4. Non-lethal sampling

Fin and gill biopsies were shown to be effective nonlethal samples for detection of VHSV genotype IVb (Cornwell *et al.*, 2013) in clinically diseased fish and nested RT-PCR on blood samples from infected fish was also shown to be effective-efficient for VHSV detection (Lopez-Vazquez *et al.*, 2006a). In the case of brood fish, ovarian fluid and milt can be used for testing as an alternative to lethal testing. However, ~~no~~ non-lethal samplings methods have not been fully validated for detection of all VHSV genotypes ~~and are therefore not prescribed in this chapter.~~

### 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)*.

The success of pathogen isolation and results of bioassay depend strongly heavily on the quality of samples (level of autolysis of fish 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. Alternate storage methods should be used only after consultation with the receiving laboratory.

Before transfer to the laboratory, pieces of the organs to be examined should be removed from the fish with sterile dissection tools and transferred to sterile plastic tubes containing at least 4 ml transport medium, i.e. cell culture medium with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. The combination of 200 International Units (IU) penicillin, 200 µg streptomycin, and 200 µg kanamycin per ml are recommended, although other antibiotics of proven efficiency may also be used. The tissue in each sample should be larger than the analytical unit size required for initial laboratory testing (e.g. between 0.5 and 2 g) and taken in duplicate if retesting may be required.

Tubes containing fish tissues in transport medium for cell cultivation should be placed in insulated containers, such as thick walled polystyrene boxes, together with sufficient ice or an alternative cooling medium with the similar cooling effect to ensure chilling of the samples during transportation to the laboratory. However, freezing of the samples should be avoided. The temperature of a sample during transit must never exceed 10°C and ice must still be present in the transport box at receipt or one or more freeze blocks must still be partly or completely frozen.

Whole fish may be sent to the laboratory if the temperature requirements referred to in the first paragraph during transportation can be fulfilled. Whole fish should be wrapped up in paper with absorptive capacity and enclosed in a plastic bag. Live fish may also be transported to the laboratory. All packaging and labelling must be performed in accordance with present current national and international transport regulations, as appropriate.

The virological examination for isolation in cell culture should be started as soon as possible and no later than 48 hours after the collection of the samples. In exceptional cases, the virological examination may be started at the latest within 72 hours after the collection of the material, provided that the material to be examined is protected by a transport medium and that the temperature requirements during transportation can be fulfilled.

### 3.5.2. Preservation of samples for molecular detection

Samples can be taken from the fish in accordance with the procedure described in Section 3.5.1, using a sterile instrument, and transferred to a sterile plastic tube containing transport medium.

Alternatively, samples may be placed in at least five volumes of RNA stabilisation reagents according to the recommendation from the manufacturers. Samples in RNA stabilising reagents can be shipped on ice or at room temperature if transport time does not exceed 24 hours.

Whole fish may also be sent to the laboratory (see Section 3.5.1).

Samples may also be frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  and kept frozen until assayed (Siah *et al.*, 2014).

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

Tissue samples for histopathology should be fixed in 10% neutral buffered formalin immediately after collection. The recommended ratio of fixative to tissue is 10:1. To avoid excessive cross-linking, tissue should be transferred to ethanol after 24 hours if methods other than histopathology are used e.g. *in-situ* hybridisation.

### 3.5.4. Fixed Samples samples for electron microscopy

Sampling for electron microscopy should be done according to standard procedures (for an example, see Chapter 2.2.9 *Infection with yellow head virus genotype 1*). Sampling for electron microscopy is not relevant for diagnostic purposes. Samples for electron microscopy are not routinely required and are collected only when it is considered beneficial to facilitate further diagnostic investigation. A 2 mm cubed section from each of the appropriate organs described in section 3.2 should be fixed in glutaraldehyde; the recommended ratio of fixative to tissue is 10:1.

### 3.5.5-4. Samples for other tests

If samples are processed for ELISA or other immunochemical assays, the procedures described in Section 3.5.1 for pathogen isolation should be followed.

## 3.6. Pooling of samples

The effect of pooling on diagnostic sensitivity has not been evaluated, therefore, larger fish should be processed and tested individually. However, samples, especially fry or specimens up to 0.5 g, can be pooled to obtain enough 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 populations), ii) presumptive and iii) confirmatory diagnostic purposes are listed in Table 4.1. by life stage. The designations used in the Table indicate:

Key:

- +++ = Recommended method(s) validated for the purpose shown and usually to stage 3 of the OIE Validation Pathway;
- ++ = Suitable method(s) but may need further validation;
- + = May be used in some situations, but cost, reliability, lack of validation or other factors severely limits its application;

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, and 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.

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

Method	A. Surveillance of apparently healthy animals				B. Presumptive diagnosis of clinically affected animals				C. Confirmatory diagnosis <sup>1</sup> of a suspect result from surveillance or presumptive diagnosis			
	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juvenile s <sup>2</sup>	Adults	LV	Early life stages <sup>2</sup>	Juveniles <sup>2</sup>	Adults	LV
Wet mounts												
Immunohistopathology <sup>3</sup> Immunohistochemistry <sup>3</sup>									++	2- <u>++</u>	2- <u>++</u>	2
Histopathology <sup>3</sup>						++	++	<u>1</u>				
Cell culture	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
Real-time PCR	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3
Conventional RT-PCR	++	++	++	3	+++	++	+++	3	+++	++	+++	3
Amplicon sequencing <sup>4</sup>									+++	+++	+++	<u>3</u>
<i>In-situ</i> hybridisation												
Bioassay												
LAMP												
Ab-ELISA		+	++	2								
Ag-ELISA									+ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	1
IFAT					++	++	++	2	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	++ <sup>5</sup>	2
Serum neutralisation for Ab detection		+	++	2								

LV = level of validation, refers to the stage of validation in the OIE Pathway (chapter 1.1.2); RT-PCR = reverse-transcription 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;

<sup>1</sup>For confirmatory diagnoses, methods need to be carried out in combination (see Section 6). <sup>2</sup>Early and juvenile life stages have been defined in Section 2.2.3. <sup>3</sup>Histopathology and cytopathology can be validated if the results from different operators has been statistically compared. <sup>4</sup>Sequencing of the PCR product. <sup>5</sup>only for identification of cultured pathogen. Shading indicates the test is inappropriate or should not be used for this purpose.

#### 4.1. Wet mounts

Not relevant.

#### 4.2. Histopathology and cytopathology

The kidney, liver and spleen show extensive focal necrosis and degeneration – cytoplasmic vacuoles, pyknosis, karyolysis, and lymphocytic invasion. While the skeletal muscle does not appear to be a **primary** site of infection, erythrocytes can accumulate in the skeletal muscle bundles and fibres without causing damage to the muscle *per se* (Evensen *et al.*, 1994).

#### 4.3. Cell **or artificial media** culture for isolation

The recommended cell lines for VHSV detection are bluegill fry (BF-2), **Chinook salmon embryo (CHSE-214)**, epithelioma papulosum cyprini (EPC) ~~or fathead minnow (FHM)~~ **or rainbow trout gonad (RTG-2)**. Susceptibility of a cell line to VHSV infection will depend on a range of parameters, including cell-line lineage or viral strain differences. Generally, VHSV isolates belonging to either genotypes I, II, or III culture best on BF-2 (Lorenzen *et al.*, 1999), while genotype IV isolates culture best on the EPC cell line (US Department of the Interior, 2007).

##### 4.3.1. Cell lines

Cell lines should be monitored regularly (e.g. every 6 months) to ensure that susceptibility to targeted pathogens has not changed.

Cells are grown at 20–24°C in a suitable medium, e.g. Eagle's minimal essential medium (MEM) (or modifications thereof) with a supplement of 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics in standard concentrations. When the cells are cultivated in closed vials, it is recommended to buffer the medium with bicarbonate. The medium used for cultivation of cells in open units may be buffered with Tris/HCl (23 mM) and Na-bicarbonate (6 mM), or with HEPES-buffered medium (HEPES=N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethanesulphonic acid). The pH must be maintained at  $7.6 \pm 0.2$ . Cell cultures to be used for inoculation with tissue material should be young (4–48 hours old) and actively growing (not confluent) at inoculation. Cell susceptibility can be enhanced by reducing the amount of FBS to 2%. Pre-treatment of cells with 7% (w/v) PEG-20,000 solution (10–15  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) 15–30 minutes prior to sample inoculation has also been shown to increase detection of VHSV in culture (Batts *et al.*, 1991).

##### 4.3.2. Sample preparation and inoculation

- i) **Note:** Tissue and fluid samples should be kept cool throughout sample preparation procedures. Homogenise tissue samples using mortar and pestle, ~~stomacher, polytron or equivalent~~ or a tissue homogeniser. A small volume of medium (MEM-4 or HBSS [Hank's balanced salt solution] + antibiotics) may be needed to achieve complete homogenisation.
- ii) Adjust the volume of medium to a final ratio of 10:1 (medium:tissue) and mix thoroughly. For fluid samples adjust the volume of medium to a final ratio of 1:1.
- iii) Centrifuge the homogenate or fluid samples at 2000–4000 **g** for 15 minutes at 2–5°C.
- iv) Remove the supernatant and pass through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (if available) or treat for either 4 hours at 15°C or overnight at 4°C with antibiotics, e.g. gentamicin 1  $\text{mg ml}^{-1}$ .

If the sample cannot be inoculated within 48 hours after collection, the supernatant may be stored at –80°C provided virological examination is carried out within 14 days.

- v) If samples originate from an area where infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) is present, supernatants may be treated with IPNV antiserum. Mix the supernatant with equal parts of a suitably diluted pool of antisera to the indigenous serotypes of IPNV and incubate for a minimum of one hour at 15°C or up to 18 hours at 4°C. The titre of the antiserum must be at least 1/2000 in a 50% plaque neutralisation test.

Treatment of all inocula with antiserum to IPNV (a virus that in some parts of Europe occurs in 50% of fish samples) aims at preventing cytopathic effect (CPE) caused by IPNV from developing in inoculated cell cultures. This will reduce the duration of the virological examination as well as the number of cases in which occurrence of CPE would have to be considered potentially indicative of VHSV. When samples come from production units that are considered free from infection with IPNV, treatment of inocula with antiserum to IPNV may be omitted.

- vi) Samples are inoculated into cell cultures in at least two dilutions, i.e. the primary dilution and a 1:10 dilution thereof, resulting in final dilutions of tissue material in cell culture medium of 1:100 and 1:1000, respectively. The ratio between inoculum size and volume of cell culture medium should be about 1:10. For each dilution and each cell line, a minimum of about 2 cm<sup>2</sup> cell area, corresponding to one well in a 24-well cell culture tray, has to be used. Use of cell culture trays is recommended, but other units of similar or with larger growth area are also acceptable.
- vii) Inoculated cell cultures are incubated at 15°C for 7–10 days. Using a microscope with 40–150x magnification, cultures should be inspected for toxicity the day after inoculation, particularly if supernatant was not filtered in step iv. The use of a phase-contrast microscope is recommended.
- viii) Monitor the cells regularly (2–3 times a week) for the presence of CPE.

If CPE is observed, virus identification is required using tests recommended in Section 6. If no CPE is observed after the primary incubation period, subcultivation is performed.

#### *Subcultivation*

- i) Remove cell culture supernatant from the primary culture and inoculate a newly (<48 hours) seeded cell culture plate.
- ii) Incubate inoculated plates at 15°C and monitor for 7–10 days as described above.

If CPE is observed, virus identification is required using tests recommended in Section 6. If no CPE is observed after the primary incubation period or subcultivation, the sample is negative.

## 4.4. Nucleic acid amplification

Use of molecular tests (conventional RT-PCR and real-time RT-PCR) is common because of their rapidity, sensitivity and specificity. Real-time RT-PCR tests are generally more sensitive than conventional RT-PCR tests. The use of these tests for virus detection and identification during the acute stage of disease has been justified for a number of years. At In the acute stage of infection, the sensitivity of some conventional RT-PCR (Kim *et al.*, 2018) and real-time RT-PCR tests (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2013) is comparable to detection by cell culture and subsequent identification. The molecular methods described in this chapter are all targeting the Nnucleoprotein gene, as it is the highest transcribed gene in the VHSV genome (Chico *et al.*, 2006).

Recently, a novel one-step RT-PCR test was developed and validated (Kim *et al.*, 2018) to be used instead of the previously recommended conventional RT-PCR for detecting VHSV. This novel assay has a higher sensitivity detecting all VHSV genotypes, and outperforms the old method, particularly in detecting genotype IV.

For detecting all genotypes of VHSV with real-time RT-PCR, the one-step methods of Jonstrup *et al.* (2013) and Garver *et al.* (2011) have been validated to stage 3 validated, showing a sensitivity similar to detection by cell culture. These methods, have having high analytical and diagnostic sensitivity and specificity, and has been shown to be highly are robust across laboratories (Garver *et al.*, 2011; Jonstrup *et al.*, 2013; Warg *et al.*, 2014a; 2014b).

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

#### 4.4.1. Real-time RT-PCR

Total RNA can be purified from: aliquots of cell culture medium from infected monolayer cells; or tissue/organs homogenised in MEM specified in Section 4.3.1, tissue samples in RNA stabilising reagent, fresh or frozen tissue samples, ovarian fluid.

In the case of culture medium from infected monolayer cells, or in tissue homogenised in MEM, aliquots should be centrifuged at 1000 *g* for 5 minutes to remove cell debris.

One-step (Jonstrup *et al.*, 2013) and two-step (Garver *et al.*, 2011) real-time RT-PCR assays targeting the nucleoprotein gene of VHSV have been stage 3 validated and are described herein.

Positive and negative controls should be included with each stage of the assay: extraction, reverse-transcription (two-step assay only) and real-time RT-PCR. An internal (endogenous) PCR control can be included however given the large number of fish species susceptible to infection with VHSV, the selection of an internal control is not trivial. If an endogenous control is to be used, primers and probes have to be designed, optimised and validated for each fish species to be tested.

Total RNA from infected cells and/or tissues is extracted using a phase-separation method (e.g. phenol-chloroform or Trizol) or by use of a commercially available RNA isolation kit used according to the manufacturer's instructions.

##### *One-step real-time RT-PCR*

In one-step RT-PCR gene-specific primers are used both to generate a cDNA transcript and for real-time RT-PCR. Both reactions occur in the same tube, which minimises the risk probability of contamination. The one-step real-time RT-PCR amplification can be performed using forward primer 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3', reverse primer: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3', and FAM-labelled probe: 6'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1. Primers are used at a final concentration of 900 nM and the final probe concentration is 250 nM. 5 µl of extracted RNA (50 ng–2 µg) is added to each 25 µl RT-PCR reaction. The assay was validated using Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions and is recommended as other one-step kits have demonstrated reduced sensitivity (Jonstrup *et al.*, 2013). Thermal cycling conditions are 50°C for 30 minutes, 95°C for 15 minutes, 40 cycles of 94°C for 15 seconds, 60°C for 40 seconds, 72°C for 20 seconds.

##### *Two-step real-time RT-PCR*

###### i) Step 1: Reverse-transcription

Extracted RNA is reverse transcribed non-discriminately into cDNA using random primers. The cDNA synthesis reactions and cycling conditions are best performed using manufacturer's instructions for commercially available kits which have been extensively tested with a variety of RNA templates, including GC- and AU-rich targets and RNase expressed at low levels.

###### ii) Step 2: Real-time PCR

The TaqMan real-time PCR assay uses forward primer 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3', reverse primer 5'-TGT-AGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC and FAM-labelled probe 5'-6FAM-TAC-GCC-ATC-ATG-ATG-AGT-MGBNFQ-3'. Primers are used at a final concentration of 600 nM, and the final concentration of the probe is 200 nM. 2.5 µl of cDNA product is added to each 25 µl PCR reaction. Thermal cycling conditions are 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes followed by 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute (Garver *et al.*, 2011).

A sample is negative if no Ct (threshold cycle) is recorded, while samples with a Ct are considered positive for VHSV. Cut-off value depends on the set-up in each laboratory but is usually set at Ct ≥ 40.

#### 4.4.2. Conventional RT-PCR

RNA isolation is done as in Section 4.4.1. Positive and negative controls should be run with each stage of the assays: extraction and RT-PCR and second round PCR. Due to the sensitive nature of PCR-based assays it is highly recommended that master mix, template addition and RT-PCR amplification occur in designated hoods or spatially separated areas.



A one-step RT-PCR should be performed as described by Kim *et al.* (2018) with 3F2R primer set: forward primers (3F, 5'-(GGG-ACA-GGA-ATG-ACC-ATG-AT-3') and reverse primer (2R, (5'-TCT-GTC-ACC-TTG-ATC-CCC-TCC-AG-3') targeting a 319 nt region in the nucleoprotein gene (positions 658–977).

The RT-PCR can be performed using, e.g. Qiagen OneStep RT-PCR System (Qiagen, Germany) or similar kit, according to the manufacturer's instructions. Briefly, the reaction mixture is adjusted to a final volume of 25 µl including 5 µl of extracted viral RNA, 5 µl 5 × One Step RT-PCR Buffer containing 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> (final concentration 2.5 mM), 10 pM of each primer, and 1 µl of enzyme mix.

The following cycles are recommended: 50°C for 30 minutes, 95°C for 15 minutes, 35 cycles at 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 68°C for 60 seconds. Subsequently, the reaction is held at 68°C for 7 minutes.

#### 4.4.3. Other nucleic acid amplification methods

To date, no other nucleic acid amplification method capable of universal VHSV detection has been sufficiently validated.

### 4.5. Amplicon sequencing

The VHSV genotype can be identified by sequencing the amplicon generated by the conventional RT-PCR using the 3F2R primer set (Kim *et al.*, 2018). Nucleotide sequencing of the glycoprotein gene is commonly used for identification of genetic strains and for epidemiological study and is recommended as one of the final steps for confirmatory diagnosis. There are several conventional RT-PCR assays available that amplify the central (669 nt) or full (1524 nt) glycoprotein gene coding sequence, but there are limited validation data. The glycoprotein gene can be amplified by conventional RT-PCR using the primer sets and concentrations listed in Table 4.2. The reverse transcription and subsequent PCR amplification can be done using a kit designed for that purpose according to the manufacturer's instructions.

Table 4.2. Primer sets for the conventional RT-PCR, sequencing and phylogenetic analysis

Primer	Sequence (5'–3')	Product size (bp)	Final primer concentration	Reference
GB+	GTC-GAA-GAA-GAG-ATA-GGC	1757	0.6 µM	Einer-Jensen <i>et al.</i> , 2004 Gudmundsdottir <i>et al.</i> , 2019
GB-	GTT-GGG-TCG-CCA-TGT-TTC-T		0.6 µM	
G330+	ACT-ACC-TAC-ACA-GAG-TGA-C	914	0.2 µM	Garver <i>et al.</i> , 2013
G1243-	CAA-TTT-GTC-CCC-GAA-TAT-CAT		0.2 µM	
G422+	TCC-CGT-CAA-GAG-GCC-AC	669	0.2 µM	
G1179-	TTC-CAG-GTG-TTG-TTT-ACC-G		0.2 µM	

### 4.6. *In-situ* hybridisation

Not relevant in relation to primary diagnosis and surveillance of infection with VHSV.

### 4.7. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry reveals VHSV-positive endothelial cells, primarily in the vascular system (Evensen *et al.*, 1994). Specific polyclonal and monoclonal antibodies for immunohistochemistry are commercially available.

### 4.8. Bioassay

Not relevant in relation to primary diagnostics and surveillance of infection with VHSV.

## 4.9. Antibody- or antigen-based detection methods

Antibody- and antigen-based detection methods should not be used as a method of screening healthy populations  
method.

### 4.9.1. Antigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

- i) Coat the wells of microplates designed for enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) with appropriate dilutions of protein-A purified immunoglobulins (Ig) from rabbit anti sera against VHSV in carbonate buffer, pH 9.6 (50 µl well<sup>-1</sup>).
- ii) Incubate overnight at 4°C.
- iii) Rinse in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 (PBST).
- iv) Add 1% Triton X-100 to the virus suspension to be identified.
- v) Dispense 50 µl well<sup>-1</sup> of two- or four-step dilutions (in PBST containing 1% bovine serum albumin) of the virus to be identified and of VHSV control virus, as well as a negative control (e.g. infectious haematopoietic necrosis virus [IHNV]), and allow to react with the coated antibody to VHSV for 1 hour at 37°C.
- vi) Rinse in PBST.
- vii) Add to the wells monoclonal antibodies to VHSV N protein (IP5B11) 50 µl well<sup>-1</sup>.
- viii) Incubate for 1 hour at 37°C.
- ix) Rinse in PBST.
- x) Add to the wells (50 µl well<sup>-1</sup>) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated monoclonal anti-mouse antibodies.
- xi) Incubate for 1 hour at 37°C.
- xii) Rinse in PBST.
- xiii) Visualise the reaction using TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) and measure the absorbance at a wavelength of 450 nm.

The above ELISA version is given as an example. Other ELISA versions of demonstrated performance may be used instead.

For positive controls, use cell culture supernatant from cultures inoculated with known VHSV isolate.

For negative controls, use cell culture supernatant from same cell line inoculated with heterologous virus (e.g. IHNV) or from non-infected culture.

### 4.9.2. Indirect fluorescent antibody test (IFAT)

- i) Prepare monolayers of cells in 2 cm<sup>2</sup> wells of cell culture plastic plates or on cover-slips to reach around 80% confluence, which is usually achieved within 24 hours of incubation at 22°C (seed six cell monolayers per virus isolate to be identified, plus two for positive and two for negative controls). The FCS content of the cell culture medium can be reduced to 2–4%. If numerous virus isolates have to be identified, the use of Terasaki plates is strongly recommended.
- ii) When the cell monolayers are ready for infection, i.e. on the same day or on the day after seeding, inoculate the virus suspensions to be identified by making tenfold dilution steps directly in the cell culture wells or flasks.

- iii) Dilute the control virus suspension of VHSV in a similar way, in order to obtain a virus titre of about 5000–10,000 plaque-forming units (PFU) ml<sup>-1</sup> in the cell culture medium.
- iv) Incubate at 15°C for 24 hours.
- v) Remove the cell culture medium, rinse once with 0.01 M PBS, pH 7.2, then three times briefly with a cold mixture of acetone 30% and ethanol 70% (v/v) (stored at –20°C).
- vi) Let the fixative act for 15 minutes. A volume of 0.5 ml is adequate for 2 cm<sup>2</sup> of cell monolayer.
- vii) Allow the cell monolayers to air-dry for at least 30 minutes and process immediately or freeze at –20°C.
- viii) Prepare a solution of purified VHSV antibody or serum in 0.01 M PBST, pH 7.2, at the appropriate dilution (which has been established previously or is given by the reagent supplier).
- ix) Rehydrate the dried cell monolayers by using four rinsing steps with the PBST solution and remove this buffer completely after the last rinse.
- x) Treat the cell monolayers with the antibody solution for 1 hour at 37°C in a humid chamber and do not allow evaporation to occur, e.g. by adding a piece of wet cotton in the humid chamber. The volume of solution to be used is 0.25 ml per 2 cm<sup>2</sup> well<sup>-4</sup>.
- xi) Rinse four times with PBST as above.
- xii) Treat the cell monolayers for 1 hour at 37°C with a solution of fluorescein isothiocyanate (FITC)- or tetramethylrhodamine-5-(and-6-) isothiocyanate (TRITC)-conjugated antibody to the immunoglobulin used as the primary antibody and prepared according to the instructions of the supplier. These conjugated antibodies are most often rabbit or goat antibodies.
- xiii) Rinse four times with PBST.
- xiv) Examine the treated cell monolayers on plastic plates immediately, or mount the cover-slips using, for example glycerol saline, pH 8.5 prior to microscopic observation.
- xv) Examine under incident UV light using a microscope with ×10 eye pieces and ×20–40 objective lens having numerical aperture >0.65 and >1.3 respectively. Positive and negative controls must yield the expected results prior to any other observation.

Other IFAT or immunocytochemical (alkaline phosphatase or peroxidase) techniques of demonstrated performance may be used instead.

Always include positive control such as wells or coverslip with cells infected with a known VHSV isolate.

#### **4.10. Other serological methods**

##### **4.10.1. Neutralisation test**

- i) Collect the culture medium of the cell monolayers exhibiting CPE and centrifuge it at 2000 **g** for 15 minutes at 4°C, or filter through a 0.45 µm (or 450 nm) pore membrane to remove cell debris.
- ii) Dilute virus-containing medium from 10<sup>-2</sup> to 10<sup>-4</sup>.
- iii) Mix aliquots (for example 200 µl) of each dilution with equal volumes of a VHSV antibody solution and, likewise, treat aliquots of each virus dilution with cell culture medium. The neutralising antibody [NAb] solution must have a 50% plaque reduction titre of at least 2000.

- iv) In parallel, another neutralisation test must be performed against a homologous virus strain (positive neutralisation test).
- v) If required, a similar neutralisation test may be performed using antibodies to IPNV.
- vi) Incubate all the mixtures at 15°C for 1 hour.
- vii) Transfer aliquots of each of the above mixtures on to 24–48 hour-old monolayers, overlaid with cell culture medium containing 10% FCS (inoculate two wells per dilution), and incubate at 15°C; 24- or 12-well cell culture plates are suitable for this purpose, using a 50 µl inoculum.
- viii) Check the cell cultures for the onset of CPE and read the result as soon as it occurs in non-neutralised controls (cell monolayers being protected in positive neutralisation controls). Results are recorded either after a simple microscopic examination (phase contrast preferable) or after discarding the cell culture medium and staining cell monolayers with a solution of 1% crystal violet in 20% ethanol.
- ix) The tested virus is identified as VHSV when CPE is prevented or noticeably delayed in the cell cultures that received the virus suspension treated with the VHSV-specific antibody, whereas CPE is evident in all other cell cultures.
- x) In the absence of any neutralisation by NAb to VHSV, it is mandatory to conduct an RT-PCR, an ELISA or IFAT, using the suspect sample. Some cases of antigenic drift of surface antigen have been observed, resulting in occasional failure of the neutralisation test using NAb to VHSV.

Other neutralisation tests of demonstrated performance may be used instead.

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

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

### 6.1. Apparently healthy animals or animals of unknown health status<sup>16</sup>

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

#### 6.1.1. Definition of suspect case in apparently healthy animals

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

- i) VHSV-typical CPE in cell cultures ~~before confirmation~~;

<sup>16</sup> For example transboundary commodities.

- ii) A positive result from a real-time **RT-PCR** assay;
- iii) A positive result from a conventional **RT-PCR** assay.

~~iv) Detection of antibodies (by Ab-ELISA or serum neutralisation in adults only).~~

### 6.1.2. Definition of confirmed case in apparently healthy animals

The presence of infection with VHSV is considered to be confirmed if, ~~in addition to the criteria in Section 6.1.1.,~~ one or more of the following criteria is met:

- ~~i) VHSV isolation in cell culture followed by virus identification by conventional RT-PCR, and by sequencing of the amplicon;~~
- i) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, ~~or IFAT and detection of VHSV in tissue preparations or~~ by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;
- ~~ii) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, or IFAT and detection of VHSV in tissue preparations by real-time RT-PCR;~~
- ii) Detection of VHSV in tissue preparations by real-time RT-PCR, and by a conventional RT-PCR (targeting a non-overlapping region of the genome) and sequencing of the amplicon.
- iii) Detection of VHSV in tissue preparations by immunohistochemistry, and by a conventional RT-PCR and sequencing 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

No clinical signs are pathognomonic for infection with VHSV 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 VHSV shall be suspected if at least one of the following criteria is met:

- i) Gross pathology or clinical signs associated with infection with VHSV as described in this chapter, with or without elevated mortality;
- ii) Histopathological changes consistent with infection with VHSV as described in this chapter;
- iii) A positive result from real-time **RT-PCR**, ~~conventional PCR, or IFAT~~;
- iv) A positive result from a conventional **RT-PCR**;
- v) A positive result by IFAT;
- vi) VHSV-typical CPE-Cytopathic effect in cell culture.

### 6.2.2. Definition of confirmed case in clinically affected animals

The presence of infection with VHSV shall be confirmed if, ~~in addition to the criteria in Section 6.2.1., positive results has been obtained on at least one animal from two tests used in the following combination one or more of the following criteria is met:~~

- ~~i) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, or IFAT and detection of VHSV in tissue preparations or by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;~~
- ii) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, or IFAT and detection of VHSV in tissue preparations by real-time RT-PCR;
- iii) Detection of VHSV in tissue preparations by real-time RT-PCR, and by a conventional RT-PCR (targeting a non-overlapping region of the genome) and sequencing of the amplicon.

**iii) Detection of VHSV in tissue preparations by immunohistochemistry, and by a conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon.**

- i) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by conventional RT-PCR, and sequencing of the amplicon;
- ii) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, or IFAT and detection of VHSV in tissue preparations by conventional RT-PCR and sequencing of the amplicon;
- iii) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, or IFAT and detection of VHSV in tissue preparations by real-time RT-PCR;
- iv) VHSV isolation in cell culture, followed by virus identification by real-time RT-PCR, Ag-ELISA, or IFAT and a positive result from immunohistopathology);
- v) Detection of VHSV in tissue preparations by real-time RT-PCR and by conventional RT-PCR, followed by sequencing of the amplicon.

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

### 6.3. Diagnostic sensitivity and specificity for diagnostic tests

The diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis of infection with VHSV is provided in Table 6.3. This information can be used for the design of surveys for infection with VHSV, however, it should be noted that diagnostic performance is specific to the circumstances of each diagnostic accuracy study (including the test purpose, source population, tissue sample types and host species) and diagnostic performance may vary under different conditions. Data is only presented where tests are validated to at least level two of the validation pathway described in Chapter 1.1.2 and the information is available within published diagnostic accuracy studies.

**Table 6.3. Diagnostic performance of tests recommended for surveillance or diagnosis**

Test type	Test purpose	Source populations	Tissue or sample types	Species	DSe (n)	DSp (n)	Reference test	Citation
Cell culture	Surveillance	Experimentally infected fish	Kidney, heart and spleen	Rainbow trout	86 (84)	-	Real-time RT-PCR	Jonstrup <i>et al.</i> , 2013
Cell culture	Clinical diagnosis	Experimentally infected fish	Kidney	Atlantic salmon	100 (100)	94.4 (100)	Pseudo-gold standard*	Garver <i>et al.</i> , 2011
Real-time RT-PCR	Surveillance	Experimentally infected fish	Kidney	Atlantic salmon	93 (30)	100 (70)	Cell culture	Garver <i>et al.</i> , 2011
Real-time RT-PCR	Surveillance	Experimentally infected fish	Kidney, heart and spleen	Rainbow trout	90 (84)	100 (43)	Cell culture	Jonstrup <i>et al.</i> , 2013

\* a compilation of 8 test results to evaluate both the real-time RT-PCR and virus isolation assay (Garver *et al.*, 2011);  
DSe = diagnostic sensitivity, DSp = diagnostic specificity; n = number of samples used in the study .

## 7. References

- AHNE W. (1982). Vergleichende Untersuchung über die Stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV) (Comparative studies on the stability of four fish-pathogenic viruses [VHSV, PFR, SVCV, IPNV]). *Zentralbl. Veterinarmed. [B]*, **29**, 457–476. (In German).
- ALTUNTAS C. & OGUT H. (2010). Monthly occurrence and prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in whiting *Merlangius merlangus*. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 107–113.
- ARKUSH K.D., MENDONCA H.L., MCBRIDE A.M., YUN S., MCDOWELL T.S. & HEDRICK R.P. (2006). Effects of temperature on infectivity and of commercial freezing on survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **69**, 145–151.

- AUINGER B.M., PFANDL K. & BOENIGK J. (2008). Improved methodology for identification of protists and microalgae from plankton samples preserved in Lugol's iodine solution: combining microscopic analysis with single-cell PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2505–2510.
- BATTS W.N., TRAXLER G.S. & WINTON J.R. (1991). Factors affecting the efficiency of plating for selected fish rhabdoviruses. *In: Proceeding of the 2nd International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates*, Fryer J.L., ed. July 29–31, Oregon University, Corvallis, OR, 17–24.
- BOVO G., HÅSTEIN T., HILL B., LAPATRA S., MICHEL C., OLESEN N.J., SHCHELKUNOV I., STORSET A., WOLLFROM T. & MIDTLYING P.J. (2005a). QLK2-CT-2002-01546: Fish Egg Trade Work package 1 report: Hazard identification for vertical transfer of fish disease agents, 1–35. VESO, P.O. Box 8109, Dep., N-0032 Oslo, Norway.
- BOVO G., HILL B., HUSBY A., HÅSTEIN T., MICHEL C., OLESEN N.J., STORSET A. & MIDTLYING P. (2005b). Fish Egg Trade Work package 3 report: Pathogen survival outside the host, and susceptibility to disinfection, 1–53. VESO, P.O. Box 8109 Dep., N-0032 Oslo, Norway. Available at: [http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp\\_3.ashx?la=da](http://www.eurl-fish.eu/-/media/Sites/EURL-FISH/english/activities/scientific%20reports/fisheggtrade%20wp_3.ashx?la=da)
- CASTRIC J. & DE KINKELIN P. (1984). Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*), to viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, **41**, 203–212.
- CHICO V., GOMEZ N., ESTEPA A. & PEREZ L. (2006). Rapid detection and quantitation of viral hemorrhagic septicemia virus in experimentally challenged rainbow trout by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, **132**, 154–159.
- CORNWELL E.R., BELLMUND C.A., GROOCCOCK G.H., WONG P.T., HAMBURY K.L., GETCHELL R.G. & BOWSER P.R. (2013). Fin and gill biopsies are effective nonlethal samples for detection of viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **25**, 203–209.
- DALE O.B., ORPETVEIT I., LYNGSTAD T.M., KAHNS S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & DANNEVIG B.H. (2009). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III. *Dis. Aquat. Org.*, **85**, 93–103.
- DE KINKELIN P. & LE BERRE M. (1977). Isolation of a pathogenic rhabdovirus of brown trout (*Salmo trutta* L., 1766). *C.R. Hebd. Séances Acad. Sci.*, **284**, 101–104.
- DORSON M., QUILLET E., HOLLEBECQ M.G., TORHY C. & CHEVASSUS B. (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. *Vet. Res.*, **26**, 361–368.
- EINER-JENSEN K., AHRENS P., FORSBERG R. & LORENZEN N. (2004). Evolution of the fish rhabdovirus viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Gen. Virol.*, **85**, 1167–1179.
- ELSAIED E., FAISAL M., THOMAS M., WHELAN G., BATTS W. & WINTON J. (2006). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from muskellunge, *Esox masquinongy* (Mitchill), in Lake St Clair, Michigan, USA reveals a new sublineage of the North American genotype. *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.
- EVENSEN Ø., MEIER W., WAHLI T., OLESEN N.J., JØRGENSEN P.E.V. & HÅSTEIN T. (1994). Comparison of immunohistochemistry and virus cultivation for detection of viral haemorrhagic septicaemia virus in experimentally infected rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**, 101–109.
- FAISAL M. & SCHULZ C.A. (2009). Detection of Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from the leech *Myzobdella lugubris* Leidy, 1851. *Parasit. Vectors*, **2**, 45.
- FAISAL M. & WINTERS A.D. (2011). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (Pontoporeiidae, Amphipoda) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit. Vectors*, **4**, 2.
- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., EINER-JENSEN K., ARIEL E., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2010). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype II isolated from European river lamprey *Lampetra fluviatilis* in Finland during surveillance from 1999 to 2008. *Dis. Aquat. Org.*, **88**, 189–198.

- GADD T., JAKAVA-VILJANEN M., TAPIOVAARA H., KOSKI P. & SIHVONEN L. (2011). Epidemiological aspects of viral haemorrhagic septicaemia virus genotype II isolated from Baltic herring, *Clupea harengus membras* L. *J. Fish Dis.*, **34**, 517–529.
- GAGNE N., MACKINNON A.M., BOSTON L., SOUTER B., COOK-VERSLIOT M., GRIFFITHS S., & OLIVIER G. (2007). Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus from mummichog, stickleback, striped bass and brown trout in eastern Canada. *J. Fish Dis.*, **30**, 213–223.
- GARVER K.A., HAWLEY L.M., McCLURE C.A., SCHROEDER T., ALDOUS S., DOIG F., SNOW M., EDES S., BAYNES C. & RICHARD J. (2011). Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 97–112.
- GARVER K.A., TRAXLER G.S., HAWLEY L.M., RICHARD J., ROSS J.P. & LOVY J. (2013). Molecular epidemiology of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in British Columbia, Canada, reveals transmission from wild to farmed fish. *Dis. Aquat. Org.*, **104**, 93–104. doi: 10.3354/dao02588.
- GOODWIN A.E. & MERRY G.E. (2011). Mortality and carrier status of bluegills exposed to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVb at different temperatures. *J. Aquat. Anim. Health*, **23**, 85–91.
- GROSS L., RICHARD J., HERSHBERGER P. & GARVER K. (2019). Low susceptibility of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* to viral hemorrhagic septicemia virus genotype IVa. *Dis. Aquat. Org.*, **135**, 201–209. doi: 10.3354/dao03398
- GUDMUNDSDOTTIR S., VENDRAMIN N., CUENCA A., SIGURDARDOTTIR H., KRISTMUNDSSON A., IBURG T.M. & OLESEN N.J. (2019). Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus Genotype IV. *J. Fish Dis.*, **42**, 47–62. <https://doi.org/10.1111/jfd.12910>
- HAWLEY L.M. & GARVER K.A. (2008). Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. *Dis. Aquat. Org.*, **82**, 171–178.
- HENRYON M., BERG P., OLESEN N.J., KJÆR T.E., SLIERENDRECHT W.J., JOKUMSEN A. & LUND I. (2005). Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. *Aquaculture*, **250**, 621–636.
- HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002a). Erratum to “Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout” (*Aquaculture*, 2002, **209**, 59–76). *Aquaculture*, **216**, 389–390.
- HENRYON M., JOKUMSEN A., BERG P., LUND I., PEDERSEN P.B., OLESEN N.J. & SLIERENDRECHT W.J. (2002b). Genetic variation for growth rate, feed conversion efficiency, and disease resistance exists within a farmed population of rainbow trout. *Aquaculture*, **209**, 59–76.
- HERSHBERGER P., GREGG J., GRADY C., COLLINS R. & WINTON J. (2010a). Kinetics of viral shedding provide insights into the epidemiology of viral hemorrhagic septicemia in Pacific herring. *Marine Ecology-Progress Series*, 400:187e93.
- HERSHBERGER P.K., GREGG J.L., GRADY C.A., TAYLOR L. & WINTON J.R. (2010b). Chronic and persistent viral hemorrhagic septicemia virus infections in Pacific herring. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 43–49.
- ISSHIKI T., NISHIZAWA T., KOBAYASHI T., NAGANO T. & MIYAZAKI T. (2001). An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 87–99.
- ITO T. & OLESEN N.J. (2017). Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) remains viable for several days but at low levels in the water flea *Moina macrocopa*. *Dis. Aquat. Org.*, **127**, 11–18.
- JENSEN N.J. & LARSEN J.L. (1979). The Ulcus-syndrome in cod (*Gadus morhua*). I. A pathological and histopathological study. *Nord Vet. Med.*, **31**, 222–228.



- JOHANSEN R., BERGH Ø., MODAHL I., DAHLE G., GJERSET B., HOLST J.C., SANDLUND N. (2013). High prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in Norwegian spring-spawning herring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **478**, 223–230.
- JONSTRUP S.P., GRAY T., KAHNS S., SKALL H.F., SNOW M. & OLESEN N.J. (2009). FishPathogens.eu/vhsv: a user-friendly viral haemorrhagic septicaemia virus isolate and sequence database. *J. Fish Dis.*, **32**, 925–929. [www.fishpathogens.eu](http://www.fishpathogens.eu)
- JONSTRUP S.P., KAHNS S., SKALL H.F., BOUTRUP T.S. & OLESEN N.J. (2013). Development and validation of a novel Taqman based real time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *J. Fish Dis.*, **36**, 9–23.
- KAHNS S., SKALL H.F., KAAS R.S., KORSHOLM H., JENSEN B.B., JONSTRUP S.P., DODGE M.J., EINER-JENSEN K., STONE D. & OLESEN, N. J. (2012). European freshwater VHSV genotype Ia isolates divide into two distinct subpopulations. *Dis. Aquat. Org.*, **99**, 23–35.
- KALAYCI G., INCOGLU S. & OZKAN B. (2006). First isolation of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) virus from turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in the Trabzon coastal area of the Black Sea in Turkey. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **26**, 157–162.
- KIM H.J., CUENCA A. & OLESEN N.J. (2018). Validation of a novel one-step reverse transcription polymerase chain reaction method for detecting viral haemorrhagic septicaemia virus. *Aquaculture*, **492**, 170–183.
- KOCAN R.M., HERSHBERGER P.K., ELDER N.E. & WINTON J.R. (2001). Survival of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in filtered seawater and seawater containing ovarian fluid, crude oil and serum-enriched culture medium. *Dis. Aquat. Org.*, **44**, 75–78.
- LOPEZ-VAZQUEZ C., DOPAZO C.P., OLVEIRA J.G., BARJA I. & BANDÍN J.L. (2006a). Development of a rapid, sensitive and non-lethal diagnostic assay for the detection of viral haemorrhagic septicaemia virus *J. Virol. Methods*, **133**, 167–174.
- LOPEZ-VAZQUEZ C., RAYNARD R.S., BAIN N., SNOW M., BANDÍN I. & DOPAZO C.P. (2006b). Genotyping of marine viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from the Flemish Cap by nucleotide sequence analysis and restriction fragment length polymorphism patterns. *Dis. Aquat. Org.* **73**, 23–31.
- LORENZEN E., CARSTENSEN B. & OLESEN N.J. (1999). Inter-laboratory comparison of cell lines for susceptibility to three viruses: VHSV, IHNV and IPNV. *Dis. Aquat. Org.*, **37**, 81–88.
- LORENZEN N. & LAPATRA S.E. (2005). DNA vaccines for aquacultured fish. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24**, 201–213.
- LOVY J., LEWIS N.L., HERSHBERGER P.K., BENNETT W. & GARVER K.A. (2012). Viral tropism and pathology associated with viral hemorrhagic septicemia in larval and juvenile Pacific herring from British Columbia. *Vet. Microbiol.*, **161**, 66–76.
- MEIER W. & JORGENSEN P.E.V. (1980). Isolation of VHS virus from pike fry (*Esox lucius*) with hemorrhagic symptoms. In: Fish Diseases, Third COPRAQ Session, Ahne W., ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany and New York, USA, 8–17.
- MEYERS T.R., SULLIVAN J., EMMENEGGER E., FOLLETT J., SHORT S., BATTS W.N. & WINTON J.R. (1992). Identification of viral haemorrhagic septicaemia virus from Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 167–175.
- MEYERS T.R. & WINTON J.R. (1995). Viral haemorrhagic septicaemia virus in North America. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **5**, 3–24.
- MUNRO E.S. & GREGORY A. (2010). The risk associated with vertical transmission of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **30**, 154–158.

MUNRO E.S., MCINTOSH R.E., WEIR S.J., NOGUERA P.A., SANDILANDS J.M., MATEJUSOVA I., MAYES A.S. & SMITH R. (2015). A mortality event in wrasse species (Labridae) associated with the presence of viral haemorrhagic septicaemia virus *J. Fish Dis.*, **38**, 335–341.

NISHIZAWA T., IIDA H., TAKANO R., ISSHIKI T., NAKAJIMA K. & MUROGA K. (2002). Genetic relatedness among Japanese, American and European isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) based on partial G and P genes. *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.

NISHIZAWA T., SAVAS H., ISIDAN H., ÜSTÜNDAG C., IWAMOTO H. & YOSHIMIZU M. (2006). Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (*Psetta maxima*) in a Turkish coastal area of the Black Sea. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 2373–2378.

NORDBLOM B. (1998) Report on an Outbreak of Viral Haemorrhagic Septicaemia in Sweden. Report for the Standing Veterinary Committee, Swedish Board of Agriculture, Department for Animal Production and Health.

NORDBLOM B. & NORELL A.W. (2000). Report on an Outbreak of VHS (Viral Hemorrhagic Septicaemia) in Farmed Fish in Sweden. Report for the Standing Veterinary Committee, Swedish Board of Agriculture, Department for Animal Production and Health.

OGUT H. & ALTUNTAS C. (2014). Survey of viral haemorrhagic septicaemia virus in wild fishes in the southeastern Black Sea. *Dis. Aquat. Org.*, **109**, 99–106. doi: 10.3354/dao02728.

OIDTMANN B., JOINER C., REESE R.A., STONE D., DODGE M. & DIXON P. (2011a). Risks Associated with Commodity Trade: Transmission of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus (VHSV) to Rainbow Trout Fry from VHSV-Carrying Tissue-Homogenates. *Transbound. Emerg. Dis.*, **58**, 224–231.

OIDTMANN B., JOINER C., STONE D., DODGE M., REESE R.A. & DIXON P. (2011b). Viral load of various tissues of rainbow trout challenged with viral haemorrhagic septicaemia virus at various stages of disease. *Dis. Aquat. Org.*, **93**, 93–104.

OLESEN N.J. & JORGENSEN P.E. (1982). Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **2**, 48.

PARRY L. & DIXON P.F. (1997). Stability of nine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) isolates in seawater. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **17**, 31–36.

PEDDIE S., MCLAUCHLAN P.E., ELLIS A.E. & SECOMBES C.J. (2003). Effect of intraperitoneally administered IL-1b-derived peptides on resistance to viral haemorrhagic septicaemia in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 195–200.

PETERS F. & NEUKIRCH M. (1986). Transmission of some fish pathogenic viruses by the heron, *Ardea cinerea*. *J. Fish Dis.*, **9**, 539–544.

PHAM P.H., SOKEECHAND B.S.H., GARVER K.A., JONES G., LUMSDEN J.S. & BOLS N.C. (2018). Fish viruses stored in RNA later can remain infectious and even be temporarily protected from inactivation by heat or by tissue homogenates. *J. Virol. Methods*, **253**, 31–37.

PIERCE L.R. & STEPIEN C.A. (2012). Evolution and biogeography of an emerging quasispecies: Diversity patterns of the fish Viral Hemorrhagic Septicemia virus (VHSV). *Mol. Phyl. Evol.*, **63**, 327–341.

RAJA-HALLI M., VEHMAS T.K., RIMAILA-PÄRNÄNEN E., SAINMAA S., SKALL H.F., OLESEN N.J. & TAPIOVAARA H. (2006). Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) outbreaks in Finnish rainbow trout farms. *Dis. Aquat. Org.*, **72**, 201–211.

SANDBLUND N., GJERSET B., BERGH Ø., MODAHL I., OLESEN N.J. & JOHANSEN R. (2014). Screening for Viral Hemorrhagic Septicemia Virus in Marine Fish along the Norwegian Coastal Line. *PLoS ONE* 9(9): e108529. doi:10.1371/journal.pone.0108529

~~SCHLOTTFELDT H.J. & AHNE W. (1988). Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1. *J. Appl. Ichthyol.*, **4**, 147–148.~~

SCHLOTTFELDT H.-J., AHNE W., JØRGENSEN P.E.V. & GLENDE W. (1991). Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) – a natural outbreak. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **11**, 105–107.

SCHONHERZ A.A., HANSEN M.H., JØRGENSEN H.B., BERG P., LORENZEN N. & EINER-JENSEN K. (2012). Oral transmission as a route of infection for viral haemorrhagic septicaemia virus in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.*, **35**, 395–406.

SIAM A., DUESEND H., FRISCH H., NYLUND A., MCKENZIE & SAKSIDA S. (2014). Development of a Multiplex Assay to Measure the Effects of Shipping and Storage Conditions on the Quality of RNA Used in Molecular Assay for Detection of Viral Haemorrhagic Septicemia Virus. *J. Aquat. Anim. Health*, **26**, 173–180.

SKALL H.F., JØRGENSEN C. & OLESEN N.J. (2015). Evaluation of the effect of percolation and NaCl solutions on viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) under experimental conditions. *Aquaculture*, **448**, 507–511.

SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005a). Viral haemorrhagic septicaemia virus in marine fish and its implications for fish farming – a review. *J. Fish Dis.*, **28**, 509–529.

SKALL H.F., OLESEN N.J. & MELLERGAARD S. (2005b). Prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus in Danish marine fishes and its occurrence in new host species. *Dis. Aquat. Org.*, **66**, 145–151.

SKALL H.F., SLIERENDRECHT W.J., KING J.A. & OLESEN N.J. (2004). Experimental infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with viral haemorrhagic septicaemia virus isolates from European marine and farmed fishes. *Dis. Aquat. Org.*, **58**, 99–110.

SMAIL D.A. (2000). Isolation and identification of Viral Haemorrhagic Septicaemia (VHS) viruses from cod *Gadus morhua* with uncus syndrome and from haddock *Melanogrammus aeglefinus* having skin haemorrhages in the North Sea. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 231–235.

SMAIL D.A. & SNOW M. (2011). Viral Haemorrhagic Septicaemia. In: Fish Diseases and Disorders, Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections, Second Edition, Woo P.T.K. & Bruno D.W. eds. CABI, Wallingford, UK, 110–142.

SNOW M., BAIN N., BLACK J., TAUPIN V., CUNNINGHAM C.O., KING J.A., SKALL H.F. & RAYNARD R.S. (2004). Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). *Dis. Aquat. Org.*, **61**, 11–21.

STEPIEN C.A., PIERCE L.R., LEAMAN D.W., NINER M.D. & SHEPHERD B.S. (2015). Gene Diversification of an Emerging Pathogen: A Decade of Mutation in a Novel Fish Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS) Substrain since Its First Appearance in the Laurentian Great Lakes. *PLoS one*, 1–25.

THOMPSON T.M., BATTIS W.N., FAISAL M., BOWSER P., CASEY J.W., PHILLIPS K., GARVER K.A., WINTON J. & KURATH G. (2011). Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. *Dis. Aquat. Org.*, **96**, 29–43. doi: [10.3354/dao02362](https://doi.org/10.3354/dao02362)

THROCKMORTON E., BRENDEN T., PETERS A.K., NEWCOMB T.J., WHELAN G.E. & FAISAL M. (2017). Potential Reservoirs and Risk Factors for VHSV IVb in an Enzootic System: Budd Lake, Michigan. *J. Aquat. Anim. Health*, **29**, 31–42. doi: 10.1080/08997659.2016.1254121

TOPLAK I., HOSTNIK P., RIHTARIČ D., OLESEN N.J., SKALL H.F. & JENČIČ V. (2010). First isolation and genotyping of viruses from recent outbreaks of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Slovenia. *Dis. Aquat. Org.*, **92**, 21–2.

UNITED STATES DEPARTMENT OF THE INTERIOR, US GEOLOGICAL SURVEY (2007). Detection of viral hemorrhagic septicemia virus. USGS FS 2007-3055. US Department of the Interior, US Geological Survey. Fact Sheets.

VESTERGARD JØRGENSEN P.E. & OLESEN N.J. (1987). Cod ulcus syndrome rhabdovirus is indistinguishable from the Egtved (VHS) virus. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **7**, 73.

WALKER P.J., BENMANSOUR A., DIETZGEN R. ET AL. (2000). Family Rhabdoviridae. In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al., eds. 563–583.

WARG J.V., CLEMENT T., CORNWELL E.R., CRUZ A., GETCHELL R.G., GIRAY C., GOODWIN A.E., GROOCCOCK G.H., FAISAL M., KIM R., MERRY G.E., PHELPS N.B.D., REISING M.M., STANDISH I., ZHANG Y. & TOOHEY-KURTH K. (2014a). Detection and surveillance of viral hemorrhagic septicemia virus using real-time RT-PCR. I. Initial comparison of four protocols. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 1–13.

WARG J.V., CLEMENT T., CORNWELL E.R., CRUZ A., GETCHELL R.G., GIRAY C., GOODWIN A.E., GROOCCOCK G.H., FAISAL M., KIM R., MERRY G.E., PHELPS N.B.D., REISING M.M., STANDISH I., ZHANG Y. & TOOHEY-KURTH K. (2014b). Detection and surveillance of viral hemorrhagic septicemia virus using real-time RT-PCR. II. Diagnostic evaluation of two protocols. *Dis. Aquat. Org.*, **111**, 15–22.

VERRIER E.R., DORSON M., MAUGER S., TORHY C., CIOBOTARU C., HERVET C., DECHAMP N., GENET C., BOUDINOT P. & QUILLET E. (2013). Resistance to a Rhabdovirus (VHSV) in Rainbow Trout: Identification of a Major QTL Related to Innate Mechanisms. *PLoS ONE* **8**(2): e55302. doi:10.1371/journal.pone.0055302

WINTON J., KURATH G. & BATTS W. (2008). Molecular epidemiology of viral hemorrhagic septicemia virus in the Great Lakes region (USGS Fact Sheet 2008-3003). Available at <http://wfrc.usgs.gov/products/fs20083003.pdf>

WOLF K. (1988). Viral hemorrhagic septicemia. *In*: Fish Viruses and Fish Viral Diseases. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 217–249.

\*

\*\*

**NB:** There are OIE Reference Laboratories for Infection with viral haemorrhagic septicaemia virus (see Table at the end of this *Aquatic Manual* or consult the OIE web site for the most up-to-date list:

<http://www.oie.int/en/scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> ).

Please contact the OIE Reference Laboratories for any further information on infection with viral haemorrhagic septicaemia virus

[Retour à l'ordre du jour](#)

---

© **Organisation mondiale de la santé animale (OIE), 2021**

---

Le présent document a été préparé par des spécialistes réunis par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). En attendant son adoption par l'Assemblée mondiale des Délégués, les points de vue qui y sont exprimés traduisent exclusivement l'opinion de ces spécialistes.

Toutes les publications de l'OIE sont protégées par la législation internationale sur les droits d'auteur. Des extraits peuvent être copiés, reproduits, traduits, adaptés ou publiés dans des périodiques, documents, ouvrages, supports électroniques ou tout autre média destiné au public, dans un but informatif, éducatif ou commercial, sous réserve de l'autorisation écrite préalable de l'OIE.

Les désignations et dénominations employées ainsi que la présentation des données de cette publication ne reflètent aucune prise de position de l'OIE quant au statut de quelque pays, territoire, ville ou zone que ce soit, à leurs autorités, aux délimitations de leur territoire ou au tracé de leurs frontières.

Les points de vue exprimés dans les articles signés relèvent de la seule responsabilité de leurs auteurs. La mention de sociétés commerciales ou de produits fabriqués, brevetés ou non, n'implique pas que ces sociétés ou produits soient approuvés ou recommandés par l'OIE de préférence à d'autres, de nature similaire et non cités.