

PUBLICATION DIVERSE SPÉCIALE 31 (ÉDITION REVISÉE)

Règlement sur la protection de la santé des poissons

GUIDE DE PROCÉDURES

Ottawa 1984 (révisé en 2004)



Fisheries and Oceans
Canada

Pêches et Océans
Canada

Canada

Excellence scientifique Protection et conservation des ressources Bénéfices aux Canadiens

Ministre de Travaux publics et Services gouvernementaux Canada 1984 (révisé en 2004)
Réimprimé en 1986
Réimprimé en 1989
N° de cat. Fs 41-31/31-1984
ISBN 0-662-53060-8
MPO/4281

On devra référer comme suit à cette publication :

Ministère des Pêches et Océans. 1984 (révisé en 2004). Règlement sur la protection de la santé des poissons : guide de procédures. Serv. pêches mar. Publ. div. spéc. 31 (avec ajout de modifications) : iv + 50 p.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iv
I. Introduction.....	1
II. Règlement sur la protection de la santé des poissons.....	3
Guide de procédures	
III. Lignes directrices pour les producteurs.....	6
IV. Rôle des inspecteurs sanitaires des poissons.....	14
V. Rôle des agents locaux de protection de la santé des poissons.....	16
VI. Règles d'échantillonnage.....	17
VII. Transport des échantillons.....	21
VIII. Traitement des échantillons.....	22
IX. Techniques de détection de certaines bactéries pathogènes chez les poissons.....	23
X. Techniques de détection des virus.....	31
XI. Techniques de détection de certains parasites.....	36
XII. Techniques de désinfection des œufs.....	39
Bibliographie	40
Annexe 1. Registre national de la santé des animaux aquatiques.....	42
Annexe 2. Administration régionale.....	43
Annexe 3. Titres et qualités des inspecteurs sanitaires des poissons.....	45
Annexe 4. Certificat de santé du poisson.....	46
Annexe 5. Rapport de laboratoire sur l'état pathologique des poissons.....	48

RÉSUMÉ

Ce guide révisé explique l'application du *Règlement sur la protection de la santé des poissons* établi en vertu de la *Loi sur les pêches*. Il présente les pratiques administratives et les méthodes d'inspection à suivre ainsi que les méthodes, étape par étape, concernant la manipulation des échantillons de poisson à analyser en vue de détecter chez les salmonidés les agents pathogènes importants de type bactérien, viral, et myxosporidiens.

Aucun transport de poisson vers le Canada ou entre les provinces ne doit se faire sans permis. Ce dernier ne sera délivré qu'au producteur détenant un certificat de santé du poisson prévu par le RPS, prouvant que ses installations ont été inspectées conformément au présent Guide de procédures et déclarées exemptes des agents pathogènes désignés.

Les techniques d'échantillonnage se fondent sur la probabilité de détecter un agent pathogène, prenant pour acquis qu'il existe une certaine prédominance d'agents pathogènes décelables dans un lot. Le choix, le transport et la manipulation en laboratoire des échantillons y sont décrits de façon détaillée.

Les méthodes mentionnées permettent de détecter les agents pathogènes suivants : la bactérie de la maladie de la bouche rouge (*Yersinia ruckeri*); la bactérie de la furonculose (*Aeromonas salmonicida*); les protozoaires causant le tournis (*Myxobolus cerebralis*) et la cératomyxose (*Ceratomyxa shasta*); les virus causant la septicémie hémorragique virale, la nécrose hématopoïétique infectieuse et la nécrose pancréatique infectieuse; et d'autres organismes pathogènes qui doivent être déclarés, notamment la bactérie de la maladie du rein (*Renibacterium salmoninarum*).

I. INTRODUCTION

L'avenir de la pisciculture, de la pêche récréative et de la pêche commerciale repose, au Canada, sur des stocks de poisson en santé. Le transport à l'étranger et entre les provinces des espèces d'élevage connaît une expansion rapide, ce qui favorise la propagation de maladies infectieuses graves. Des programmes efficaces de prévention et de surveillance se révèlent donc nécessaires afin d'empêcher la dissémination des agents pathogènes des poissons et ainsi atténuer l'important obstacle qu'elle oppose à la mise en valeur de ces types de pêches. Ce guide révisé de procédures a pour but d'expliquer la mise en application du *Règlement sur la protection de la santé des poissons* établi en vertu de la *Loi sur les pêches*. Il présente des lignes directrices pour les producteurs, définit le rôle des inspecteurs sanitaires des poissons et celui des agents locaux de protection de la santé des poissons et fixe des méthodes d'échantillonnage, de manutention et de diagnostic à utiliser lors des inspections faites aux fins de la délivrance de certificats de santé du poisson.

Le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* figure à la section II, tel qu'il est publié dans la *Gazette du Canada*. Il s'applique à toutes les espèces ou hybrides provenant des espèces de poisson de la famille des Salmonidés des genres énumérés à l'annexe I. Le Règlement vise à empêcher la propagation d'agents pathogènes infectieux grâce à l'inspection des stocks de poissons sauvages et d'élevage, et à contrôler les déplacements des poissons contaminés vers le Canada et/ou entre provinces et territoires. Il s'applique aux poissons d'élevage vivants, aux poissons d'élevage morts non éviscérés, aux œufs (y compris tout produit sexuel fécondé ou non fécondé) de poissons sauvages et d'élevage et aux produits de poissons d'élevage morts non éviscérés destinés à entrer au Canada ou à traverser les limites provinciales à l'intérieur du pays. Les procédures de saisie et autres pouvoirs prévus par la *Loi sur les pêches* s'appliquent aussi à toute infraction au Règlement.

En vertu du Règlement, quatre inspections satisfaisantes consécutives sur une période d'au moins 18 mois doivent être effectuées à une installation détenant des œufs et/ou des poissons d'état sanitaire inconnu avant l'octroi du certificat. Les inspections doivent être effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours au cours de la période précédant l'octroi de celui-ci. Les installations aquacoles ne désirant exporter que des œufs désinfectés ne seront soumises qu'à une inspection de dépistage d'agents viraux. Lorsque des œufs ou des poissons sont transférés d'une source, le certificat de santé du poisson pour l'installation réceptrice sera modifié en fonction de l'état sanitaire de l'installation source (si des œufs désinfectés sont transférés, seul l'élément concernant des virus figurant à l'annexe II sera modifié pour l'installation réceptrice). L'installation devra reprendre le calendrier d'inspection du début et faire l'objet de quatre inspections sur une période d'au moins 18 mois, à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours pour obtenir un nouveau certificat.

Une nouvelle installation utilisant une source d'eau isolée exempte de toute espèce de poisson, débutant avec des stocks provenant d'une installation certifiée, peut obtenir un certificat après une seule inspection. Dans ce cas, le profil sanitaire de cette dernière et les résultats de l'inspection doivent paraître sur le certificat. Pour qu'une installation de production conserve son certificat, des inspections satisfaisantes consécutives doivent être effectuées deux fois l'an à des intervalles d'environ six mois (pas moins de 90 jours ni plus de 270 jours). Dans la mesure du possible, les inspections doivent être faites au cours du printemps et de l'automne, la dernière inspection ne

remontant pas à plus de 270 jours avant la date d'entrée d'un envoi de poissons dans une province. Les procédures données dans le guide doivent être suivies. Pour faire reclasser un certificat de façon à ce qu'il passe de la mention positive à la mention négative pour la présence d'un agent pathogène, le propriétaire ou l'exploitant d'une installation doit mettre en oeuvre un programme d'éradication de l'agent pathogène, et l'installation doit faire l'objet de quatre inspections satisfaisantes (où l'agent pathogène n'ont pas dépisté) consécutives sur une période d'au moins 18 mois, à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours.

Le concept de *zonage*, qui consiste à établir la présence ou l'absence de maladies données dans des zones ou régions du Canada, est en voie d'être appliqué. L'identification de ces zones permettra de protéger celles libres de maladies au moment de l'importation d'animaux aquatiques au Canada et du transfert entre provinces, ainsi que d'assurer la conformité du Canada au Code sanitaire international des animaux aquatiques de l'Office international des épizooties (OIE) et à l'Accord sanitaire et phytosanitaire (ASP) de l'Organisation mondiale du commerce (OMC). La délimitation de ces zones, qui reposera sur des données sur la santé des animaux aquatiques, relève du Bureau de santé des animaux aquatiques.

Pour tout éclaircissement concernant l'interprétation du présent règlement, veuillez communiquer avec le Bureau de santé des animaux aquatiques, Registre national de la santé des animaux aquatiques, Ministère des Pêches et des Océans, Ottawa (Ontario), K1A 0E6 (courriel : nrfd@dfompo.gc.ca).

II. RÈGLEMENT SUR LA PROTECTION DE LA SANTÉ DES POISSONS

L'inclusion dans le Guide de procédure du *Règlement sur la protection de la santé des poissons* vise à faciliter l'utilisation de ce document. À toutes fins d'interprétation et d'application de cette mesure réglementaire, consulter le Règlement modifié, tel qu'enregistré par le greffier du Conseil privé et publié dans la *Gazette du Canada, Partie II*.

Titre abrégé

1. Le présent règlement peut être cité sous le titre : *Règlement sur la protection de la santé des poissons*.

Interprétation

2. Dans le présent règlement,
 - «agent local de protection de la santé du poisson» désigne une personne approuvée comme agent local de protection de la santé du poisson et chargée de l'administration et de l'application du présent règlement; (*local fish health officer*)
 - «approuvé» signifie approuvé par le ministre; (*approved*)
 - «certificat» désigne un certificat visé à l'article 6; (*certificate*)
 - «importer» signifie introduire dans toute province du Canada des produits en provenance de l'étranger ou d'une autre province du Canada; (*import*)
 - «inspecteur sanitaire des poissons» désigne une personne approuvée pour inspecter le poisson et les sources de poisson aux fins du présent règlement; (*fish health official*)
 - «licence d'importation» désigne une licence visée à l'article 4; (*import permit*)
 - «ministre» désigne le ministre des Pêches et des Océans; (*Minister*)
 - «poisson d'élevage» désigne un poisson visé à l'annexe 1, introduit par l'homme dans une piscifaculture, et comprend les œufs de ce poisson; (*cultured fish*)
 - «poisson sauvage» désigne un poisson visé à l'annexe I, autre que le poisson introduit par l'homme dans une piscifaculture; (*wild fish*)

Interdiction

3. (1) Sous réserve du paragraphe (2) il est interdit d'importer du poisson d'élevage ou des œufs de poisson sauvage sans une licence d'importation.
(2) Le paragraphe (1) ne s'applique pas au poisson d'élevage éviscéré.

Licences

4. Sous réserve de l'article 5, un agent local de protection de la santé du poisson d'une province peut délivrer une licence d'importation à quiconque en fait la demande, l'autorisant ainsi à importer du poisson d'élevage ou des œufs de poisson sauvage dans cette province.
5. Une licence d'importation n'est délivrée que si la personne qui en fait la demande a obtenu un certificat et si, selon le cas :

- a) le certificat précise qu'aucune maladie ni aucun agent pathogène visés aux annexes II a IV n'ont été dépistés;
- b) l'agent local de protection de la santé du poisson est convaincu qu'aucune maladie ni aucun agent pathogène indiqués sur le certificat ne nuiront à la conservation et à la protection du poisson dans la province d'importation.

Certificats

- 6. Le certificat visé à l'article 5 est délivré par un inspecteur sanitaire des poissons et :
 - a) précise que la source d'où provient le poisson a été inspectée de la manière approuvée;
 - b) indique, le cas échéant, quelles maladies ou quels agents pathogènes visés aux annexes II à IV ont été dépistés au cours de l'inspection ou des inspections.

ANNEXE I Poissons

Toutes les espèces ou hybrides provenant des espèces de poisson de la famille des Salmonidés, y compris les genres suivants :

Saumon du Pacifique	<i>Oncorhynchus</i> spp.
Saumon du Danube et taimen	<i>Hucho</i> spp.
Saumon de l'Atlantique	<i>Salmo</i> spp.
Truite	<i>Salmo</i> spp.
Ombre	<i>Salvelinus</i> spp.
Ombre	<i>Thymallus</i> spp.
Lenok	<i>Brachymystax</i> spp.
Inconnu	<i>Stenodus</i> spp.
Corégone	<i>Coregonus</i> spp.
Ménomini	<i>Prosopium</i> spp.
Ayu	<i>Plecoglossus</i> spp.

ANNEXE II Maladies ou agents pathogènes trouvés chez les poissons vivants ou dans leur source

- 1. Tout agent de répliation filtrable susceptible de causer des effets cytopathologiques dans les cultures cellulaires du poisson indiquées par le ministre et comprenant, entre autres, les affections suivantes :
 - a) Septicémie hémorragique virale (virus Egtved, SHV)
 - b) Nécrose hématopoïétique infectieuse (NHI)
 - c) Nécrose pancréatique infectieuse (NPI)

2. Tournis (*Myxobolus cerebralis*)
3. Cératomyxose (*Ceratomyxa shasta*)
4. Furunculose (*Aeromonas salmonicida*)
5. Maladie bactérienne de la bouche rouge (*Yersinia ruckeri*)

ANNEXE III

Maladies ou agents pathogènes trouvés chez les poissons morts ou dans leur source

1. Septicémie hémorragique virale (Egtved) (virus Egtved, SHV)
2. Tournis (*Myxobolus cerebralis*)

ANNEXE IV

Maladies ou agents pathogènes trouvés chez les poissons vivants ou dans leur source

1. Infections myxobactériennes
2. Septicémie à aéromonades motiles (*Aeromonas* sp. motile)
3. Septicémie à pseudomonades (*Pseudomonas* spp.)
4. Vibriose (*Vibrio* spp.)
5. Maladie bactérienne du rein (*Renibacterium salmoninarum*)

III. LIGNES DIRECTRICES POUR LES PRODUCTEURS

Le Règlement sur la protection de la santé des poissons s'applique à toutes les installations d'où proviennent des poissons d'élevage vivants et morts, des oeufs fécondés et des gamètes de poissons sauvages et d'élevage, ainsi que des produits de poissons d'élevage morts non éviscérés de toutes les espèces de la famille des Salmonidés mentionnées à l'annexe I qui seront envoyés au Canada ou transférés d'une province à une autre. Les « installations » comprennent tous les endroits servant à la propagation ou à la stabulation d'oeufs et/ou de poissons. Les personnes qui désirent importer du poisson doivent se familiariser avec tous les règlements (fédéraux, provinciaux et municipaux) de la région où ils prévoient le faire puisqu'il peut exister des exigences autres que celles du *Règlement sur la protection de la santé des poissons*.

Voir la partie A (Importation d'oeufs et de poissons) ci-dessous pour obtenir de plus amples renseignements sur l'importation d'oeufs et de poissons. Une licence d'importation est obligatoire pour tout envoi de poissons ou d'oeufs désignés ci-dessus, à l'exception d'envois entre les provinces de poissons d'élevage morts au Canada. Ces licences ne peuvent être accordées qu'aux producteurs qui peuvent fournir la preuve que les conditions sanitaires de leur installation ont été certifiées (voir la partie B ci-dessous) après inspection de leurs stocks de poisson par un inspecteur sanitaire des poissons autorisé. On peut obtenir une liste des inspecteurs sanitaires des poissons autorisés à délivrer des certificats en s'adressant au Registre national de la santé des animaux aquatiques, du ministère des Pêches et des Océans, Ottawa.

Au Canada, le producteur qui désire obtenir un certificat pour son installation de production doit, aux fins de l'inspection, fournir à ses frais le poisson. Les espèces de poisson, autres que celles énumérées à l'annexe I, que le producteur élève dans son installation peuvent également être soumises à un échantillonnage par l'inspecteur sanitaire des poissons. L'inspecteur sanitaire des poissons peut à son gré établir le moment et la fréquence de l'échantillonnage et choisir les poissons : il doit avoir accès aux registres où sont consignés les introductions, les pertes, la fréquence des maladies et les traitements.

Bien que le Règlement ne le stipule pas expressément, la désinfection superficielle des oeufs avant tout envoi est fortement recommandé, sauf indication contraire. La section XII du présent guide propose un procédé de désinfection.

Il peut arriver qu'un inspecteur sanitaire des poissons souhaite modifier les procédures d'inspection et/ou les conditions de délivrance d'un certificat de santé du poisson, lorsque les circonstances ne permettent pas d'appliquer facilement le Règlement et/ou les modalités du présent guide (p. ex. installations piscicoles spécialisées, installations de recherche, activités saisonnières, etc.). Les précédents en cette matière peuvent lui être communiqués par le responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques.

Dans certains cas, les laboratoires chargés d'établir les diagnostics sur l'état pathologique du poisson sera situé dans une autre province que celle où a eu lieu l'inspection, nécessitant ainsi le transport des échantillons de poisson de part et d'autre des limites provinciales. De tels échantillons doivent être manipulés de façon à éviter toute contamination. Toute personne œuvrant dans le domaine de la recherche sur les pêches doit se conformer aux exigences et aux termes du Règlement et être au courant des exigences régionales.

A. IMPORTATION D'OEUFS ET DE POISSONS

Il est nécessaire d'obtenir, avant l'envoi d'oeufs ou de poissons, une licence d'importation délivrée par l'agent local de protection de la santé du poisson de la province/du territoire à laquelle/auquel l'envoi est destiné. Une licence d'importation doit accompagner tout envoi d'oeufs ou de poissons. L'annexe II donne une liste des bureaux où l'on peut rejoindre les agents locaux de protection de la santé du poisson.

Pour obtenir une licence d'importation, les producteurs doivent présenter un exemplaire du certificat de santé du poisson (annexe 4) dont la partie DÉCLARATION DE L'EXPORTATEUR a été remplie et signée par le propriétaire ou le directeur de l'installation d'origine. La partie RENSEIGNEMENTS SUR L'IMPORTATEUR doit aussi être remplie, signée et datée par l'importateur.

La licence d'importation autorise un transport direct du poisson d'une installation certifiée à sa destination. Le fait de remplir d'eau un camion ou tout autre contenant servant à l'envoi dans un endroit autre qu'un établissement de statut sanitaire certifié égal ou supérieur ou à partir d'une source d'eau isolée exempte de toute espèce de poisson équivaut à introduire dans une installation du poisson provenant d'une source non certifiée, et rend nulle la licence d'importation.

Importation d'œufs désinfectés de poissons sauvages ou d'élevage

La source des œufs doit avoir été inspectée par un inspecteur sanitaire des poissons, et un certificat de santé du poisson doit avoir été délivré, qui indique la présence ou l'absence d'agents viraux filtrables répliquables et en précise, à la demande de la province réceptrice, la souche ou le sérotype. La liste des agents viraux recherchés comprend, entre autres :

- le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV)
- le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI)
- le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI)

Un inspecteur sanitaire des poissons peut, après examen du certificat de santé du poisson, délivrer une licence d'importation d'oeufs si cela ne risque pas de donner lieu à l'introduction dans la province réceptrice ou le territoire récepteur d'un agent viral ou d'une souche ou d'un sérotype d'agent pathogène mentionné dans la liste ci-dessus.

En l'absence de données sanitaires indiquant la présence de certains agents pathogènes, l'agent local de protection de la santé du poisson peut désigner certaines zones d'une province comme exemptes de certains agents pathogènes, même si ces derniers ont été décelés dans d'autres parties de la province. L'agent peut donc refuser des demandes d'importation d'œufs, provenant d'une source dans laquelle les tests ont démontré la présence d'un agent pathogène donné, vers une zone désignée comme exempte de ce pathogène. Les œufs doivent être accompagnés d'une licence d'importation délivrée par l'agent local de protection de la santé du poisson de la province réceptrice.

Les installations sources des œufs désinfectés n'ont à fournir que de l'information sur les tests de dépistage des virus quand elles demandent une licence d'importation. Les œufs doivent être

désinfectés à la source et à l'installation réceptrice. Si les œufs ne sont pas désinfectés, il faut fournir de l'information sur toutes les maladies et tous les agents pathogènes mentionnés dans l'annexe II du Règlement (ce qui comprend les bactéries et les parasites).

Importation de poissons d'élevage vivants

La source des poissons d'élevage vivants doit avoir été inspectée par un inspecteur sanitaire des poissons, et un certificat de santé du poisson doit avoir été délivré, qui indique la présence ou l'absence des maladies et des agents pathogènes mentionnés dans l'annexe II du RPSP, ce qui comprend des agents viraux filtrables répliquables, y compris leurs souches et sérotypes, à la demande de la province réceptrice ou du territoire récepteur. Les agents viraux recherchés comprennent entre autres :

- le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV)
- le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI)
- le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (VNPI)

Les agents pathogènes suivants figurent aussi à l'annexe II du RPSP :

- *Aeromonas salmonicida*
- *Yersinia ruckeri*
- *Myxobolus cerebralis*
- *Ceratomyxa shasta*

L'agent local de protection de la santé du poisson peut, après examen du certificat de santé du poisson, délivrer une licence d'importation si l'importation de ces poissons ne risque pas de donner lieu à l'introduction d'un agent viral ou d'une souche ou d'un sérotype d'agent pathogène mentionné dans la liste ci-dessus et dont la présence n'est pas signalée dans la province réceptrice ou le territoire récepteur.

En l'absence de données sanitaires indiquant la présence de certains agents pathogènes, l'agent local de protection de la santé du poisson peut désigner certaines zones d'une province comme exemptes de certains agents pathogènes, même si ces derniers ont été décelés dans d'autres parties de la province. L'agent peut donc refuser des demandes d'importation de poissons d'élevage vivants, provenant d'une source dans laquelle les tests ont démontré la présence d'un agent pathogène donné, vers une zone désignée comme exempte de ce pathogène.

Lorsque les poissons de l'installation source présentent des signes cliniques d'atteinte d'une maladie ou d'un agent pathogène mentionnés dans l'annexe II, aucun poisson ne doit être transféré tant que l'épisode pathologique n'est pas maîtrisé à la satisfaction d'un vétérinaire. Les poissons doivent être accompagnés d'une licence d'importation délivrée par un agent local de protection de la santé du poisson de la province réceptrice ou du territoire récepteur.

Poissons d'élevage morts non éviscérés

La source des poissons morts d'élevage non éviscérés doit avoir été inspectée par un inspecteur sanitaire des poissons, et un certificat de santé du poisson doit avoir été délivré, qui indique la

présence ou l'absence des maladies et agents pathogènes mentionnés dans l'annexe III du RSP, ce qui comprend :

- le virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV)
- *Myxobolus cerebralis*

L'agent local de protection de la santé du poisson peut, après examen du certificat de santé du poisson, délivrer une licence d'importation si l'importation de ces poissons d'élevage morts non éviscérés ne risque pas de donner lieu à l'introduction d'un agent viral ou d'une souche ou d'un sérotype d'agent pathogène mentionné dans la liste ci-dessus et dont la présence n'est pas signalée dans la province réceptrice.

En l'absence de données sanitaires indiquant la présence de certains agents pathogènes, l'agent local de protection de la santé du poisson peut désigner certaines zones d'une province ou d'un territoire comme exemptes de certains agents pathogènes, même si ces derniers ont été décelés dans d'autres parties de la province ou du territoire. L'agent peut donc refuser des demandes d'importation de poissons d'élevage morts non éviscérés, provenant d'une source dans laquelle les tests ont démontré la présence d'un agent pathogène donné, vers une zone désignée comme exempte de ce pathogène.

B. EXIGENCES RELATIVES À L'OBTENTION D'UN CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON

Installations aquacoles

Une installation existante, pour laquelle l'état sanitaire des œufs ou des poissons n'est pas connu, doit faire l'objet de quatre inspections sur une période d'au moins 18 mois, avant qu'un certificat de santé du poisson ne puisse être délivré. Les inspections doivent être effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours. Une installation ne souhaitant exporter que des œufs désinfectés peut limiter les tests au dépistage des agents viraux.

Lorsque des œufs ou des poissons sont transférés d'une source dont l'état sanitaire est moindre que l'installation réceptrice, le certificat de santé du poisson de l'installation réceptrice est modifié en fonction de l'état sanitaire de la source (si des œufs désinfectés sont transférés, seul va changer l'élément concernant les virus mentionnés dans l'annexe II pour l'installation réceptrice). Si la source ne possède pas un certificat de santé du poisson valide, le certificat de l'installation réceptrice devient invalide. L'installation réceptrice doit alors faire l'objet d'un nouveau programme de quatre inspections réparties sur une période d'au moins 18 mois, à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours, pour obtenir un nouveau certificat de santé du poisson.

Il incombe au propriétaire de l'installation réceptrice d'aviser l'inspecteur sanitaire des poissons de toute modification du statut de son certificat de santé du poisson. L'inspecteur délivre alors un certificat de santé du poisson modifié, dont une copie est transmise au Registre national de la santé des animaux aquatiques. La date d'expiration du certificat modifié demeure la même que celle du certificat annulé.

Une nouvelle installation de production disposant d'une source d'eau isolée exempte de toute espèce de poisson et débutant ses opérations à l'aide de géniteurs provenant d'une source disposant d'un certificat de santé du poisson valide peut obtenir son certificat après une seule inspection. Le certificat doit faire mention du profil sanitaire de l'installation source ainsi que des résultats de l'inspection de l'installation réceptrice.

Une installation détentrice d'un certificat de santé du poisson doit faire l'objet de deux inspections annuelles, à intervalle de six mois environ, pour assurer le maintien de son statut. Les inspections doivent être effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours.

Oeufs de poissons sauvages

Un stock de géniteurs sauvages doit faire l'objet de deux inspections annuelles pendant les deux années passées avant d'obtenir un certificat de santé du poisson. Lorsqu'il n'est pas possible d'échantillonner les mêmes populations sauvages deux années de suite (p. ex. chez les saumons du Pacifique), il faut tester la deuxième année des géniteurs provenant de la même portion du cours d'eau.

Reclassement du certificat

Une personne qui souhaite voir reclasser son certificat de santé du poisson, en passant de la mention positive à la mention négative pour la présence d'un agent pathogène, doit mettre en place un programme d'éradication de l'agent pathogène, et obtenir la mention négative au cours de quatre inspections consécutives (portant sur cet agent pathogène) au cours d'une période minimale de 18 mois. Les inspections doivent être effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours.

C. TESTS DE DÉPISTAGE SUPPLÉMENTAIRES

Un agent local de protection de la santé du poisson d'une province réceptrice ou d'un territoire récepteur peut demander la réalisation de tests supplémentaires, conformément aux politiques ou règlements régionaux ou provinciaux, dans le but de déterminer la souche et/ou le profil des acides nucléiques d'un agent pathogène décelé à l'installation source, s'il dispose de renseignements selon lesquels une nouvelle souche ou un nouveau sérotype d'un agent pathogène mentionné aux annexes II, III et IV pourrait être introduit dans la province réceptrice ou le territoire récepteur par un envoi d'œufs ou de poissons.

Si des tests supplémentaires sont exigés par l'agent local de protection de la santé du poisson, certaines conditions doivent être respectées. Les tests doivent être réalisés et/ou supervisés par un inspecteur sanitaire des poissons ou par un agent local de protection de la santé du poisson. Les tests réalisés doivent présenter un niveau de sensibilité et de spécificité comparable à celui des autres tests diagnostiques courants prévus par la réglementation, et les protocoles doivent être accessibles aux laboratoires publics et privés qui s'occupent d'inspection visant la certification sanitaire. Les tests supplémentaires doivent être réalisés par un diagnosticien fiable dans les meilleurs délais et dans le respect des dispositions visant la continuité de la preuve.

D. PROCÉDURE D'APPEL

Si un agent local de protection de la santé du poisson refuse de délivrer une licence d'importation en vertu du *Règlement sur la protection de la santé du poisson*, il doit fournir par écrit les raisons de son refus. Le demandeur peut en appeler de cette décision en s'adressant au sous-ministre adjoint (SMA) des Sciences, ministère des Pêches et des Océans. La demande doit être présentée sous la forme d'une lettre au SMA, adressée à l'attention du responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques. La demande de révision doit lui être communiquée dans les 30 jours suivant la réception de l'avis concernant la décision de l'agent local de protection de la santé du poisson de ne pas délivrer de licence d'importation.

La demande de révision doit être accompagnée d'une copie de la demande de licence d'importation et d'une copie des raisons données pour refuser la licence, et faire état des raisons de la demande de révision. Le demandeur doit présenter toute information supplémentaire pertinente à l'appui de sa demande de révision. Il incombe au demandeur de démontrer que le refus de lui délivrer la licence d'importation n'était pas conforme au Règlement. Le responsable du Registre national coordonne le processus de révision, nomme un comité de révision, participe à titre de conseiller aux travaux de ce comité de révision, recueille les documents à communiquer au SMA et une fois le dossier complet, le transmet au SMA.

Le responsable du Registre national communique copie de la demande de révision au directeur général régional du MPO intéressé et aux organismes provinciaux compétents, en leur demandant de transmettre par écrit leurs commentaires au comité de révision, et ce, dans les 21 jours civils suivant la réception du dossier.

Le comité de révision est créé dans les 5 jours civils suivant la réception de la demande de révision. Il est formé du responsable du Registre national et de trois personnes indépendantes choisies par ce dernier après consultation du demandeur et des organismes fédéraux et provinciaux compétents. Le responsable du Registre national agit à titre de conseiller au sein du comité de révision. Il ne vote pas sur les recommandations formulées dans le rapport préparé par le comité de révision.

Le rôle du comité de révision est d'ordre consultatif. Il se limite à présenter un rapport, comportant des recommandations, au SMA. La décision définitive de délivrer ou non une licence d'importation est prise par le SMA. Le comité de révision peut demander un avis écrit à toute personne qui, selon l'avis du comité, devrait être consultée.

Le comité de révision rédige un rapport à l'intention du SMA dans les 30 jours suivant la création du comité. Quand des circonstances exceptionnelles le justifient, le comité peut solliciter du demandeur une extension raisonnable de ce délai pour terminer son rapport. Ce rapport fait état des recommandations formulées par le comité au sujet de la demande de licence.

Conformément aux dispositions en vigueur de la *Loi sur l'accès à l'information* et de la *Loi sur la protection des renseignements personnels*, le comité de révision fournit au demandeur copie des documents qui seront communiqués au SMA. Ces documents sont les copies du rapport et des recommandations du comité de révision, des avis écrits du directeur général régional et des organismes provinciaux compétents, et de tout autre avis écrit obtenu par le comité de révision

dans le cadre de ses activités. Le demandeur dispose de 10 jours civils, après réception de ces documents, pour présenter un avis écrit à leur sujet. Cet avis doit prendre la forme d'une lettre au SMA, adressée à l'attention du responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques.

Le responsable du Registre national communique les documents du dossier au SMA pour examen et décision définitive. Le dossier comprend la demande de révision (y compris toute documentation à l'appui accompagnant la demande), les avis écrits du directeur général régional et des organismes provinciaux compétents, et tout autre avis écrit obtenu par le comité de révision dans le cadre de ses activités, le rapport et les recommandations du comité de révision et les commentaires écrits du demandeur.

Le SMA rend une décision finale sur la délivrance d'une licence d'importation et communique, par écrit, cette décision et les raisons qui l'ont motivée dans les 30 jours civils qui suivent. La décision est transmise au demandeur, et une copie en est communiquée au directeur général régional, aux organismes provinciaux compétents et à l'agent local de protection de la santé du poisson par l'intermédiaire du responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques. Si la révision concerne l'expédition d'œufs, tout poisson juvénile qui pourrait naître de ces œufs avant la fin de la procédure de révision sera soumis aux dispositions concernant la santé des poissons vivants du *Règlement sur la protection de la santé du poisson* modifié et des autres politiques et règlements pertinents.

Tableau 1. Résumé de la procédure de révision.

MESURE	PÉRIODE ALLOUÉE	DURÉE PRÉVISIBLE APRÈS LE REFUS DE LA LICENCE
L'ALPSP envoie une lettre au demandeur l'avisant que sa demande d'importation d'œufs ou de poisson est rejetée.	-	Jour zéro
Le demandeur envoie sa demande de révision au Registre national.	30 jours	30 ^e jour
Le Registre national crée le comité de révision.	5 jours	35 ^e jour
Le directeur général régional du MPO et les organismes provinciaux compétents font leurs commentaires au Registre national.	21 jours	
Le comité de révision prépare son rapport et ses recommandations au SMA.	30 jours	65 ^e jour
Le demandeur présente ses commentaires au Registre national sur le rapport et les recommandations du comité de révision.	10 jours	75 ^e jour
Le SMA présente par écrit au demandeur sa décision sur la demande de révision	30 jours	105 ^e jour

IV. RÔLE DES INSPECTEURS SANITAIRES DES POISSONS

L'inspecteur sanitaire des poissons doit être un spécialiste ayant la compétence voulue pour diagnostiquer les maladies du poisson; il doit avoir accès à un laboratoire permettant d'établir un diagnostic selon les méthodes mentionnées dans le guide et avoir reçu l'autorisation du gouvernement du Canada (annexe 3). Ceux qui veulent obtenir cette autorisation doivent communiquer avec le responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques : il leur faut fournir une copie de leur curriculum vitae, trois spécimens de leur signature et une description de leur compétence en laboratoire, et compléter un questionnaire sur le *Règlement sur la santé des poissons* et le Guide de procédures. Un groupe de spécialistes des maladies étudiera toutes les demandes et fera connaître aux candidats les résultats de la sélection. L'autorisation d'agir à titre d'inspecteur sanitaire des poissons sera réévaluée par le Registre national de la santé des animaux tous les trois ans et, le cas échéant, renouvelée pour une autre période de trois ans.

Les inspecteurs sanitaires des poissons doivent éviter et prévenir toute situation qui peut mener à un conflit d'intérêts ou être interprétée comme tel afin de ne pas compromettre leur impartialité et leur objectivité lorsqu'ils inspectent une installation aux termes du Règlement; ils doivent se protéger de toute allégation de conflits d'intérêts et éviter les situations compromettantes. Les conflits d'intérêts incluent les situations où un inspecteur sanitaire a investi des fonds ou à des intérêts financiers dans l'installation qu'il doit inspecter et où l'installation qu'il doit inspecter lui appartient ou il la gère, ou appartient ou est gérée par un membre de sa famille. Un inspecteur sanitaire ne doit pas demander ou accepter des transferts d'avantages économiques, autres que le paiement des services rendus, qui compromettrait son intégrité. En cas de doute, il doit communiquer avec le responsable du Registre national.

S'il est prouvé qu'un inspecteur sanitaire des poissons autorisé ne respecte pas l'esprit du Règlement, c.-à-d. empêcher la propagation d'agents pathogènes infectieux en inspectant soigneusement les sources de production et en contrôlant le transport des stocks contaminés, en ne tenant pas compte délibérément soit des exigences en matière d'inspections ou des résultats des inspections, il sera suspendu ou rayé de la liste des inspecteurs autorisés.

L'inspecteur sanitaire des poissons effectue une inspection en se rendant sur les lieux de production, en visitant tous les secteurs et en suivant les procédures mentionnées aux parties VI à XI du présent guide. L'inspecteur devrait obtenir du propriétaire ou du responsable de l'établissement des renseignements sur l'identification des stocks à inspecter et étudier les registres des introductions, des pertes, de la fréquence des maladies et du traitement du poisson dans l'établissement au cours des deux dernières années ou depuis la date de délivrance du premier certificat. Si l'installation répond à toutes les exigences du Règlement et si les échéances des inspections ont été respectées, l'inspecteur sanitaire des poissons peut délivrer un certificat de santé du poisson (annexe 4), lequel doit être distribué de la façon suivante :

- au propriétaire ou au responsable; un exemplaire de ce dernier doit accompagner chaque demande de licence d'importation;
- au responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques;
- à l'inspecteur sanitaire des poissons pour ses dossiers.

Si les inspecteurs sanitaires des poissons détiennent des renseignements diagnostiques recueillis lors d'un échantillonnage effectué en dehors de périodes désignées du printemps et de l'automne, ou des renseignements diagnostiques étayés provenant d'autres sources fiables, ils doivent les utiliser, avec ceux qui ont été recueillis durant les périodes désignées, pour déterminer l'état de santé des poissons et délivrer des certificats.

De plus, les inspecteurs sanitaires des poissons au Canada doivent remplir en trois exemplaires un rapport de laboratoire sur l'état pathologique des poissons (annexe 5), envoyer une copie au Registre national de la santé des animaux aquatiques, au propriétaire ou au responsable de l'installation, laquelle sert de preuve d'inspection, et garder une copie pour leur dossier. Les rapports de laboratoire sur l'état physiologique des poissons des installations situées à l'extérieur du Canada doivent être envoyés au responsable du Registre national.

S'il est nécessaire d'annuler le certificat d'une installation parce que celle-ci n'a pas respecté les diverses exigences de l'inspection, l'inspecteur sanitaire des poissons doit alors appliquer la procédure suivante : une lettre indiquant les raisons pour révoquer le certificat et les étapes nécessaires pour qu'un certificat soit de nouveau délivré doit être envoyée au producteur et au responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques.

V. RÔLE DES AGENTS LOCAUX DE PROTECTION DE LA SANTÉ DU POISSON

Les agents locaux de protection de la santé du poisson, qui se trouvent dans chaque région du Canada, veillent à la mise en application du Règlement dans leur province ou leur région. Leurs responsabilités comportent entre autres l'examen des certificats et des données relatives à une source de production donnée, à un envoi particulier de poissons ou d'œufs, et aux exigences de leur région sur le plan de la santé des poissons. Conformément à l'article 5 du Règlement, ils peuvent délivrer des licences d'importation aux personnes qui en font la demande afin d'autoriser le passage d'envois acceptables de poissons vivants ou d'œufs entrant au Canada ou transportés entre les provinces/territoires du Canada et de poissons morts non éviscérés entrant au Canada aux points frontaliers. Chaque envoi doit être accompagné d'une licence. Le présent guide ne prévoit pas l'utilisation d'une licence d'importation normalisée étant donné que les provinces ou les régions ont élaboré leur propre licence en vue de répondre à leurs besoins particuliers.

Les agents pathogènes à déclarer mentionnés à l'annexe IV ne sont pas énumérés à l'annexe II ou III mais sont considérés comme importants selon l'inspecteur sanitaire des poissons. Dans des cas particuliers, il peut y avoir des raisons qui justifient la décision de l'agent local de protection de la santé du poisson d'empêcher l'importation de ces agents pathogènes à déclarer ou d'autres organismes contaminant les poissons dans une région donnée.

Les bureaux des agents locaux de protection de la santé du poisson sont indiqués à l'annexe 2. Communiquer avec le Registre national de la santé des animaux aquatiques pour obtenir des renseignements à jour sur une province, un territoire ou une région particulière.

VI. RÈGLES D'ÉCHANTILLONNAGE

A. POISSON D'ÉLEVAGE

1. Échantillonnage par lots

Sauf indication contraire (voir VI.B.1), l'échantillonnage des poissons se fait par lot. Un lot se définit comme suit : poissons du même âge qui ont toujours partagé le même approvisionnement en eau et qui proviennent d'une population donnée de géniteurs. Dans les situations où cette définition de lot ne peut être appliquée, c'est à l'inspecteur sanitaire des poissons de décider lui-même s'il y a lieu de diviser le poisson en lots.

2. Sélection des échantillons

La façon de déterminer le nombre exact de poissons qu'il faut prélever d'un lot donné est basée sur la recherche d'une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans un lot pour lequel on suppose que le taux d'infection décelable est de 5 ou 10 % (tableau 1, p. 18). Il est important de noter que certains agents pathogènes, quand ils se trouvent à l'état de porteurs, sont très difficiles à déceler. L'inspecteur sanitaire des poissons et le producteur doivent être conscients de cette possibilité. Les probabilités statistiques indiquées dans le tableau 1 peuvent ne pas s'appliquer à de telles situations. Les échantillons doivent être prélevés sous la surveillance de l'inspecteur sanitaire des poissons d'une façon et à une période offrant la plus grande possibilité de déceler la présence d'un agent pathogène. Lorsque l'échantillon est prélevé d'un lot gardé dans une seule unité (p. ex. bassin, canal ou étang), l'échantillon sélectionné doit comporter autant de spécimens moribonds et fraîchement morts qu'il y en a disponibles. Si le lot de poisson ci-haut mentionné est gardé dans plus qu'une unité, le nombre total de spécimens à prélever serait le même que précédemment. Cependant, les spécimens qui doivent être prélevés des unités individuelles le seront en nombre tel qu'il reflétera la proportion du lot retenu dans chacune des unités. Là encore, l'échantillon provenant d'une unité donnée doit comprendre autant de poissons moribonds et récemment morts qu'il est possible. Si d'autres poissons sont nécessaires pour compléter l'échantillon, des poissons d'apparence saine peuvent alors être prélevés, ou l'inspecteur sanitaire des poissons peut choisir de revenir en deçà d'une période de 30 jours pour compléter le prélèvement du nombre requis de poissons.

Les échantillons ne doivent pas être prélevés au cours d'un traitement thérapeutique ou immédiatement après. Une documentation de base complète doit être obtenue pour tous les échantillons. Cela comprend les données ayant trait à toute utilisation récente d'agents chimiothérapeutiques, aux antécédents sanitaires de l'installation et aux lots d'où proviennent les échantillons.

Tableau 1. Nombre d'échantillons requis pour déceler un ou plusieurs spécimens contaminés dans des populations (lots) dont on présume que le taux minimum d'infection décelable est de 5 et 10 %. Les calculs sont basés sur un niveau de confiance de 95 %. Pour les populations intermédiaires, on doit prendre le nombre d'échantillons indiqué sur la ligne suivante (Ossiander et Wemeyer 1973).

Taille de la population	Nombre de poissons à échantillonner si l'on présume que l'incidence d'infection décelable est de :	
	5 %	10 %
50	29	20
100	43	23
250	49	25
500	54	26
1 000	55	27
2 500	56	27
5 000	57	27
10 000	57	27
100 000	57	27
Plus de 100 000	60	30

Dans le cas où des symptômes manifestes de maladies sont notés lors de l'échantillonnage, les techniques de détection d'agents pathogènes à déclarer et d'autres organismes pathogènes doivent être utilisées en plus des techniques d'identification des agents pathogènes mentionnées à l'annexe II.

Lorsqu'il faut traiter des échantillons de poissons ou de leur tissu en groupes plutôt qu'individuellement comme dans le cas des analyses virologiques, on doit prendre soin de traiter séparément les poissons d'apparence saine des spécimens moribonds ou récemment morts.

3. Nombre d'échantillons pour le dépistage des virus

- a. Poissons d'élevage (non reproducteurs) : le nombre d'échantillons à prélever est celui qui offre une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans un lot, en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum.
- b. Géniteurs (poissons arrivés à maturité sexuelle qui servent à la reproduction) : on doit viser à la même sensibilité pour la détection des individus contaminés. L'échantillonnage doit être effectué une fois par an à l'époque de la fraie. Chez les espèces qui ne se reproduisent qu'une fois, les échantillons de tissus doivent être prélevés chez tous les poissons concernés jusqu'à un maximum de 60. Pour les espèces qui se reproduisent plusieurs fois, 10 %¹ de tous les géniteurs utilisés jusqu'à un maximum de 30 poissons, doivent être soumis à un échantillonnage légal. Le reste des échantillons nécessaires pour obtenir le taux qui offre une probabilité de 95 % de déceler un poisson contaminé dans un lot dont on

¹ L'échantillonnage légal de seulement 10 % de tous les géniteurs ne correspond pas au taux d'échantillonnage exposé au tableau 1 : cet échantillonnage vise à conserver des populations petites mais intéressantes de géniteurs qui peuvent se reproduire à nouveau.

présume que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum doit être constitué de liquide de reproduction. Le liquide ovarien doit constituer le plus grand nombre possible des échantillons de produits reproducteurs recueillis.

4. Taille des échantillons pour le dépistage de bactéries

- a. Les poissons d'élevage doivent être échantillonnés, pour la présence d'agents pathogènes bactériens selon un taux qui offre une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans un lot en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum. Pour fins d'études bactériologiques de routine, il faut échantillonner seulement les poissons dont la longueur à la fourche est en moyenne d'au moins 4 cm. Techniquement, il est plus difficile de faire un échantillonnage bactériologique valable des poissons qui sont plus petits. Il est toutefois possible de s'en servir lorsqu'on observe des taux de mortalité ou des symptômes de maladie inhabituels et inexplicables.
- b. Les géniteurs doivent être échantillonnés pour la présence de bactéries conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage virologique létal de cette catégorie (voir VI.A.3b).

5. Taille des échantillons pour le dépistage de parasites

- a. En ce qui concerne *Myxobolus cerebralis* et *Ceratomyxa shasta*, il faut échantillonner les poissons d'élevage à un taux qui offre une probabilité de 95 % qu'un poisson contaminé sera décelé dans un lot en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum.

M. cerebralis : le poisson doit avoir au moins 120 jours pour que les analyses soient significatives, étant donné que les spores sur lesquelles se base le diagnostic se développent lentement. Chez les poissons gardés à des températures inférieures à 12 °C, la formation de spores peut prendre de 9 à 11 mois (Taylor et al. 1973).

C. shasta : une surveillance régulière des poissons d'apparence saine, afin de trouver des spores, doit se faire seulement sur les poissons qui sont âgés en moyenne d'au moins 120 jours. On doit examiner des poissons plus jeunes pour déceler *C. shasta* seulement lorsque des taux de mortalité ou des symptômes de maladies inhabituels et inexplicables se manifestent.

- b. Les géniteurs doivent être échantillonnés conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage virologique létal de cette catégorie (voir VI.A.3b).

6. Périodes d'échantillonnage et fréquence

- a. Poissons d'élevage : l'échantillonnage devra se faire au moins deux fois l'an, les périodes d'échantillonnage et la fréquence dépendant des conditions locales et de la décision de l'inspecteur sanitaire des poissons. Parce que la détection de *M. cerebralis* et de certains virus se réalise mieux lorsque les poissons ont un certain âge, on recommande que les

périodes d'échantillonnage se situent au printemps et à l'automne (de mars à mai et de septembre à novembre).

- b. Géniteurs : l'échantillonnage sera effectué une fois l'an pendant la fraie (voir VI.A.3b).

B. POISSONS SAUVAGES

1. Poissons non arrivés à maturité sexuelle

Tous les poissons sexuellement non développés capturés à l'état sauvage doivent être échantillonnés à un taux qui donnera une probabilité de 95 % de déceler un spécimen contaminé dans tous les poissons capturés en supposant que le taux de contamination est de 5 % au minimum. Ce taux d'échantillonnage s'appliquera aux divers agents pathogènes (virus, bactéries et myxosporidies) mentionnés précédemment. C'est à l'inspecteur sanitaire des poissons qu'il revient de décider quel sera le nombre de poissons sauvages à échantillonner.

2. Poissons arrivés à maturité sexuelle

S'il faut recueillir des géniteurs sauvages ou leurs oeufs fécondés, il importe de prélever du liquide séminal et ovarien de tous les poissons concernés jusqu'à un maximum de 60 poissons. Chez les espèces qui ne se reproduisent qu'une fois, des échantillons de tissus doivent être prélevés sur tous les poissons concernés (échantillonnage légal) jusqu'à un maximum de 60. Pour les espèces qui se reproduisent plusieurs fois, 10 %² de tous les géniteurs utilisés ou recueillis, jusqu'à un maximum de 30 poissons, doivent être soumis à un échantillonnage légal. Ces taux d'échantillonnage s'appliquent aux divers agents pathogènes (virus, bactéries et myxosporidies) cités plus tôt. De nouveau, c'est à l'inspecteur sanitaire des poissons que revient la décision lorsqu'il octroie un certificat pour des stocks sauvages.

C. OEUFS FÉCONDÉS ET GAMÈTES

On ne peut se fier à l'échantillonnage d'œufs fécondés ou de gamètes des poissons pour déceler les agents pathogènes mentionnés à l'annexe II. La menace que constituent de tels œufs ou gamètes pour la santé des poissons doit donc être évaluée à la lumière des antécédents des géniteurs.

D. ESPÈCES AUTRES QUE DES SALMONIDÉS

Les autres espèces n'appartenant pas à la famille des Salmonidés se trouvant dans la même installation que les espèces de Salmonidés doivent être échantillonnées par l'inspecteur sanitaire des poissons pour déceler la présence des agents pathogènes énumérés à l'annexe II ou III.

² Voir note 1.

VII. TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons de poisson doivent être manipulés rapidement de manière à ce que la dégénérescence ne rende le diagnostic incertain ou impossible. Si les échantillons ne peuvent être apportés vivants au laboratoire, il faut les garder sur la glace ou les réfrigérer pendant 48 heures au maximum.

A. POISSONS VIVANTS

Les poissons vivants devraient être transportés dans des sacs de plastique hermétiques partiellement remplis d'eau et gonflés d'oxygène. Chaque sac doit porter une étiquette indiquant le nom de l'écloserie, la date de l'inspection, le numéro d'identification du lot et le nombre de poissons. On peut ensuite laisser ces sacs avec de la glace dans des contenants isolés. Dans ces conditions, il n'est ordinairement pas nécessaire d'anesthésier les poissons.

B. POISSONS MORTS

Les poissons échantillonnés doivent être placés dans des sacs de plastique hermétiques (les poissons morts ou moribonds doivent être séparés des poissons sains) qui sont placés dans un contenant isolé, chaque sac étant entouré d'une couche de glace.

C. LIQUIDES DE REPRODUCTION

Les échantillons de liquides séminal et ovarien doivent être mis dans des éprouvettes stériles et être transportés dans un contenant isolé renfermant de la glace. Ne pas mélanger les échantillons de liquide séminal et ovarien. Quant aux restrictions de regroupement, voir X.B.4b et X.C.

VIII. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

A. TECHNIQUE D'AUTOPSIE

1. Généralités

La technique décrite ci-dessous a été mise au point dans le but de faciliter l'analyse d'un grand nombre de poissons quant à la présence des agents pathogènes déjà nommés. Sauf dans le cas de très petits spécimens, le même poisson servira de source de tissus pour les diverses analyses bactériologiques, virologiques et la recherche de myxosporidies. L'analyse bactériologique doit être effectuée en premier. Pour maximiser la sensibilité de la détection, les poissons doivent être autopsiés en deçà de 48 heures de l'échantillonnage et toutes les analyses doivent être effectuées au cours de cette période.

Examen externe et échantillonnage

Prendre note de toutes les anomalies macroscopiques telles que la décoloration du corps, la dilatation du corps, l'exophtalmie, les ulcères, les ampoules, l'inflammation, les zones hémorragiques, les branchies nécrosées ou en forme de massue, ainsi que l'érosion des opercules, des nageoires et du pédoncule caudal. Inoculer les milieux appropriés et préparer des frottis colorés avec les tissus provenant de ces lésions.

Examen interne et échantillonnage

Désinfecter la surface du poisson et, à l'aide d'instruments aseptiques, exposer le rein. Inoculer les milieux appropriés et préparer les frottis appropriés avec du tissu rénal.

Examiner les éventuelles anomalies des viscères. Inoculer les milieux appropriés et préparer des frottis avec les tissus des organes anormaux. Enlever les tissus devant servir aux analyses virologiques et à la recherche de myxosporidies.

B. DESTRUCTION DES ÉCHANTILLONS

Le laboratoire d'expertise devrait manipuler et jeter les échantillons et tout autre matériel susceptible d'être contaminés de manière à empêcher la propagation d'agents pathogènes. Tout le matériel, comme les carcasses de poisson et les tissus, les contenants servant au transport, l'eau, les cultures microbiennes et l'équipement contaminé doit être autoclavé, incinéré ou alors stérilisé avant d'être jeté.

IX. TECHNIQUES DE DÉTECTION DE CERTAINES BACTÉRIES PATHOGÈNES CHEZ LES POISSONS

A. BUT

Les micro-organismes concernés par ces techniques de détection se divisent en trois catégories :

1. Les bactéries pathogènes (énumérées à l'annexe II) dont la distribution géographique est supposée limitée et dont l'absence doit être vérifiée. Elles comprennent les agents pathogènes à certifier suivants :

Yersinia ruckeri (maladie bactérienne de la bouche rouge)
Aeromonas salmonicida (furonculose)

Il n'était ni économique ni justifiable sur le plan biologique de continuer à dépister le parasite *Ceratomyxa shasta* (un parasite qui pour le moment n'a jamais été détecté au Canada à l'est des Rocheuses) chez des poissons qui ne présentent aucun signe clinique de la maladie. En conséquence, il n'est plus nécessaire de procéder à l'examen de routine de frottis colorés de tissu intestinal sur chaque poisson prélevé pendant une inspection menée en vertu du *Règlement sur la protection de la santé des poissons*, à moins que le poisson ne présente des signes cliniques d'infection. Pour les dépistages visuels qui ne révèlent aucun signe clinique d'infection par cet organisme, un crochet doit être fait à la case « Non décelé » du Certificat de santé du poisson et non à la case « Non analysé ».

Si votre client souhaite, pour des motifs autres ou plus impératifs que la certification aux termes du RPSP, que tous les poissons prélevés dans le cadre d'une inspection menée en vertu du RPSP soient soumis à un dépistage de *C. shasta*, il est encore possible de le faire dans le cadre d'une entente entre vous-même, en tant qu'inspecteur sanitaire des poissons, et votre client. Vous pouvez choisir d'effectuer l'examen diagnostique vous-même ou de préparer les lames en vue d'un examen par d'autres spécialistes. Veuillez informer vos clients qu'ils doivent vous faire *savoir avant chaque inspection* s'ils ont ou non besoin d'un dépistage complet de *C. shasta* (c.-à-d. examen des frottis de tissu intestinal), pour leur éviter d'avoir à abattre d'autres poissons pour effectuer un dépistage à une date ultérieure.

2. Les bactéries pathogènes (énumérées à l'annexe IV) qui peuvent être ubiquistes et qui, si elles sont décelées durant une épidémie ou de façon systématique dans les poissons échantillonnés en l'absence de signes cliniques, doivent être déclarées. Elles comprennent :

Myxobactéries (p. ex. *Flexibacter columnaris*)
Renibacterium salmoninarum (maladie bactérienne du rein)*
Aeromonas spp. motile (p. ex. *Aeromonas hydrophila*)
Pseudomonas spp. (p. ex. *Pseudomonas fluorescens*)
Vibrio spp. (p. ex. *Vibrio anquillarum*)

Il n'est plus nécessaire de procéder à la préparation, à la coloration et à l'examen de frottis rénaux pour chaque poisson prélevé pendant une inspection menée en vertu du *Règlement sur la protection de la santé des poissons* pour tenter de dépister la maladie bactérienne du rein (MBR) et l'organisme qui la cause, *Renibacterium salmoninarum*, à moins que le poisson ne présente des signes cliniques de la MBR. Si des signes cliniques suspects sont présents, préparer et examiner des frottis de tissus rénaux, de boursouflures cutanées ou de lésions musculaires des poissons suspects, faire une culture de *R. salmoninarum* sur un milieu de culture sélectif pour la maladie bactérienne du rein, et prélever des échantillons de tissus en vue d'un examen histologique éventuel.

Si un client souhaite, pour des motifs autres ou plus impératifs que la certification aux termes du RPSP, que tous les poissons prélevés fassent l'objet d'un dépistage de *R. salmoninarum*, il est encore possible de le faire dans le cadre d'une entente entre vous-même, en tant qu'inspecteur sanitaire des poissons, et votre client. Vous pouvez choisir d'effectuer l'examen diagnostique vous-même ou de préparer les lames en vue d'un examen par d'autres spécialistes. Veuillez informer vos clients qu'ils doivent vous faire savoir *avant chaque inspection* s'ils ont ou non besoin d'un dépistage complet de la maladie bactérienne du rein (c.-à-d. examen des frottis rénaux), pour leur éviter d'avoir à abattre d'autres poissons pour effectuer un dépistage à une date ultérieure.

3. Les bactéries non énumérées à l'annexe II et IV, que l'inspecteur sanitaire des poissons détecte et qu'il détermine être associées à des pertes importantes ou à des symptômes de maladies (p. ex. *Edwardsiella tarda*).

B. MÉTHODES DE DÉTECTION

Les méthodes de détection qui suivent représentent les exigences minimales pour les analyses bactériologiques. Elles doivent être appliquées à tous les échantillons prélevés de lots où il y a une prédominance habituellement élevée de signes de maladies et/ou de mortalité. Quant aux échantillons qui viennent de lots d'apparence saine, ces méthodes de détection s'appliquent seulement aux poissons dont la longueur moyenne à la fourche est de 4 cm et plus (voir VI.A.4a).

1. Prélever en conditions aseptiques les tissus suivants et les ensemercer par stries sur le milieu approprié :
 - a. le tissu rénal, prélevé de préférence de parties qui semblent anormales, et les tissus de lésions externes et internes sur la gélose trypticase – soya (TSA);
 - b. le tissu de branchies ou les tissus de lésion externe sur milieu de Shieh (gélose SH) ou gélose Cytophaga (CA) seulement si la pathologie macroscopique suggère une infection myxobactérienne.
2. Préparer des frottis de tissu rénal et de tissus lésés et effectuer une coloration de Gram, puis examiner un minimum de 25 champs (grossissement de 900 à 1000X) au microscope. Avec la présence fréquente de petits diplobacilles Gram positif, à l'intérieur des cellules, on peut

supposer la présence de *R. salmoninarum* (Sanders et Fryer 1980). (L'absence de croissance sur le milieu TSA renforce la présomption.)

3. Incuber les boîtes de Pétri contenant le milieu TSA à 20 °C pendant cinq jours et les examiner quotidiennement pour y déceler tout signe de multiplication. Incuber les boîtes de milieu SH ou CA à 15 – 20 °C pendant cinq jours et les examiner chaque jour pour y déceler tout signe de multiplication.
4. Si une pathologie macroscopique suggère une infection myxobactérienne, préparer des lames humides de tissu branchial ou de tissus lésés et les examiner pour y déceler la présence de masses de bâtonnets longs et minces. Choisir des colonies jeunes et représentatives (jaunes, sèches, rhizoïdes ou jaunes, humides, qui s'étalent) provenant de boîtes de milieu SH ou CA, préparer des frottis et effectuer une coloration de Gram. La présence de bâtonnets Gram négatif longs et minces, qui glissent ou « rampent » indique vraisemblablement la présence de myxobactéries.
5. À partir des cultures sur milieu TSA, sélectionner de jeunes colonies représentatives. Différencier les micro-organismes d'après les caractéristiques suivantes :
 - a. Si les cellules sont des bâtonnets à Gram négatif, oxydase-positifs, non motiles, qui font fermenter la glucose (test O.F.) et produisent habituellement un pigment brun diffus, l'isolat est vraisemblablement *A. salmonicida* (Griffith et al. 1952). Il peut y avoir des souches achromogènes d'*A. salmonicida* (Evelyn 1971).
 - b. Si les cellules sont des bâtonnets à Gram négatif, à oxydase, indole et H₂S-négatifs, et produisent une réaction alcaline/acide (K/A) sur milieu TSI (trois sucres + fer), l'isolat est vraisemblablement *Y. ruckeri*.
 - c. Si l'isolat diffère de 5b en étant positif à l'indole et au H₂S et produit de l'acide et du gaz en milieu TSI, on peut supposer qu'il s'agit d'*E. tarda* (Amandi et al. 1982).

À la figure 1, on donne le graphique de cheminement de ces méthodes : il présente des caractéristiques supplémentaires pour différencier les aéromonades motiles, *Pseudomonas* spp. et *Vibrio* spp.

Il faut effectuer des essais de confirmation pour toutes les bactéries à certifier qui ont été identifiées par supposition. Voir IX.C.2g pour les exceptions. Les tests sérologiques et biochimiques décrits en IX.C.2. doivent être utilisés à cette fin.

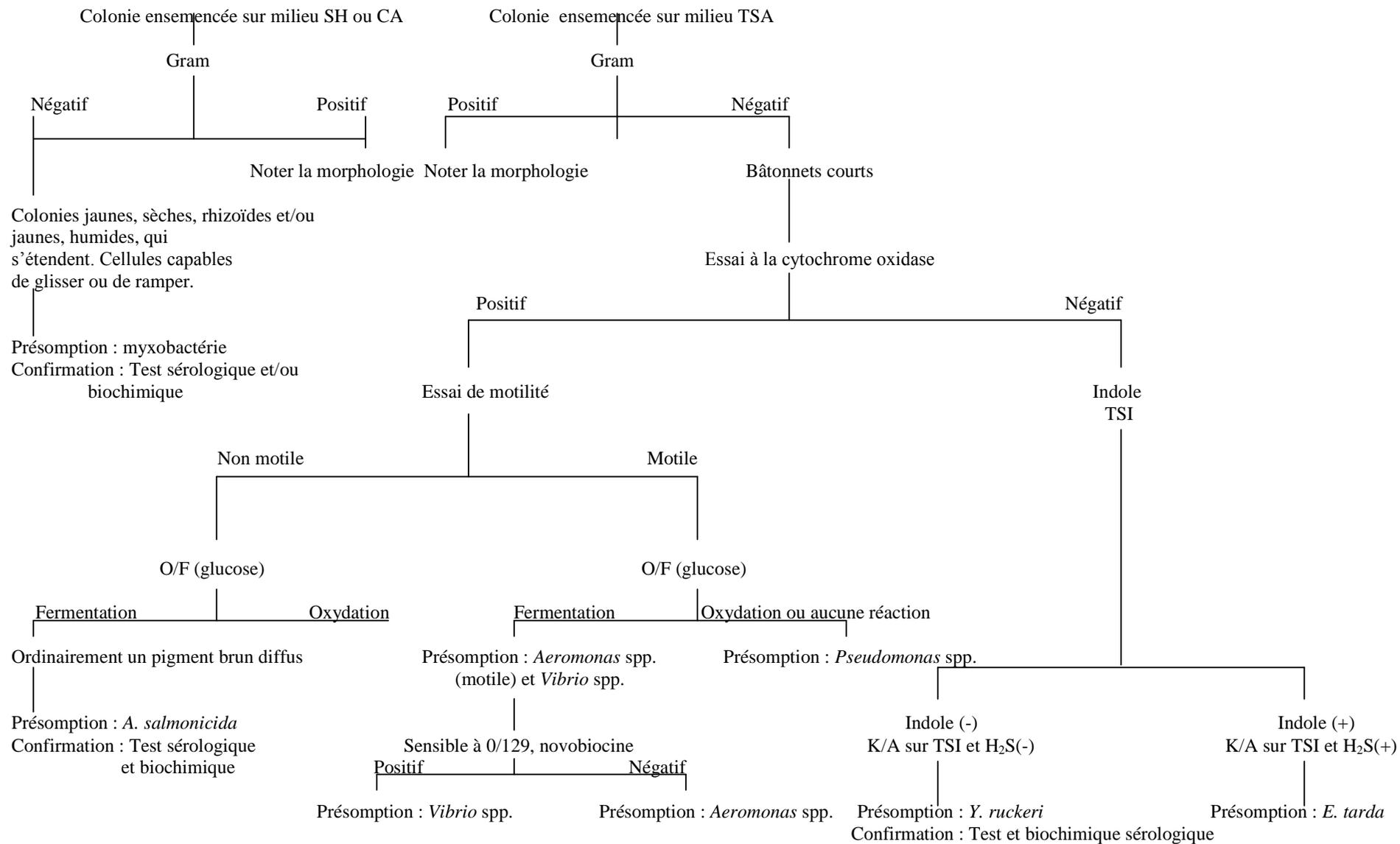


Figure 1. Différentiation des bactéries isolées à partir de poissons sur milieu TSA, SH ou CA

L'inspecteur des essais pour confirmer la présence des agents pathogènes à déclarer. Pour les identifier, on devrait établir si l'agent pathogène provoque une mortalité importante ou relève de la pathologie macroscopique.

C. MATÉRIELS³ ET MÉTHODES

1. Milieux de culture pour isolement

a. Gélose trypticase – soja (Difco)

b. Gélose SH (Shieh, 1980)

Agar	1,0 %
Peptone	0,5 %
Extrait de levure	0,05 %
Sulfate de magnésium	0,03 %
Pyruvate de sodium	0,01 %
Phosphate monobasique de potassium	0,01 %
Phosphate dibasique de potassium	0,005 %
Bicarbonate de sodium	0,005 %
Chlorure de calcium	0,001 %
Acide citrique	0,001 %
Acétate de sodium	0,001 %
Chlorure de baryum	0,001 %
Sulfate ferreux	0,0001 %
pH	7,0

REMARQUE : Il s'agit d'un milieu de Shieh modifié. La néomycine (5µg/mL) et la polymyxine B (10 unités/mL) peuvent être ajoutées à la gélose SH afin de faciliter l'isolement des myxobactéries en supprimant la croissance d'autres bactéries (Fijan 1969).

c. Gélose Cytophaga (Anacker et Ordal, 1959)

Tryptone	0,05 %	Extrait de bœuf	0,02 %
Extrait de levure	0,05 %	Gélose	0,9 %
Acétate de sodium	0,02 %	pH	7,2 - 7,4

³ Les produits spécifiés se sont avérés satisfaisants pour les objectifs poursuivis; cependant, cela ne signifie pas que d'autres produits ne peuvent être tout aussi satisfaisants.

2. Milieux d'identification, réactifs, méthodes

a. Test à la cytochrome – oxidase

Au moyen d'une anse de platine, déposer un peu de la colonie bactérienne, provenant d'une culture à croissance active, sur une bande de papier imprégnée des réactifs chimiques appropriés. Bien étaler les germes; le test est positif si en moins d'une minute, le papier devient bleu clair (MacFaddin 1980).

b. Motilité

Examiner les cultures, en phase de croissance logarithmique, à l'état frais en suspension dans le bouillon trypticase-soya. Si les résultats laissent un doute, vérifier en inoculant en piqûres des tubes contenant le milieu utilisé pour l'étude de la motilité (Difco) ou le milieu glucose – motilité par piqûre profonde (GMD) (Walters et Plumb 1978).

c. Différentiation entre le métabolisme oxydatif et fermentaire des glucides

Effectuer un test O/F (glucose) tel que décrit par MacFaddin (1980). Sinon, inoculer des tubes de culture GMD et interpréter les résultats tels que décrits par Walters et Plumb (1978).

d. Production d'indole

Effectuer le test pour déceler la présence d'indole (MacFaddin 1980).

e. Milieu TSI (trois sucres + sulfate ferreux)

L'utilisation de la gélose TSI et l'interprétation des résultats de ce milieu de culture sont décrits par MacFaddin (1980).

f. Test de confirmation de la présence de *A. salmonicida* (Rabb et al. 1964) et d'*Y. ruckeri* par agglutination sur lame

Le test d'agglutination se fait en émulsifiant une petite quantité de culture bactérienne dans une solution saline (NaCl à 0,9 %) sur une lame de verre propre. À l'aide d'une anse, on prélève de l'antisérum que l'on dépose près de la suspension bactérienne puis on réalise le mélange en penchant et en faisant osciller la lame. Préparer les témoins positifs et négatifs appropriés. Le test d'agglutination positif est caractérisé par une agglutination rapide et macroscopique des cellules bactériennes du mélange étudié et du témoin positif (mais non de celle du témoin négatif). Une agglutination du témoin négatif annule l'essai. Un grand nombre de souches d'*A. salmonicida* s'autoagglutinent. Pour empêcher cela, placer la suspension dans l'eau bouillante pendant 15 minutes avant d'effectuer le test d'agglutination sur lame.

g. Tests de confirmation de la présence de *R. salmoninarum*

Si des signes cliniques ou l'examen de frottis de tissu rénal ayant subi une coloration de Gram portent à supposer la présence de *R. salmoninarum*, garder une partie du tissu rénal suspect et effectuer l'un des tests suivants. Si ce tissu rénal n'est pas disponible, la présomption de la présence de *R. salmoninarum*, telle que décrite précédemment (IX.B.2.) constitue un diagnostic confirmé.

- i) **Épreuve d'immunodiffusion** (Chen et al. 1974) : Préparer les boîtes à immunodiffusion en versant 10 mL de milieu composé de gélose Noble (1,0 %), de NaCl (0,9 %) et de thimérosal (0,01 %) dans une boîte de Pétri de 60 mm. Percer des puits de 6 mm de diamètre, six d'entre eux étant placés en cercle autour d'un puits central, de sorte que tous les puits soient distants de 6 mm. Verser 0,1 mL d'antisérum spécifique dans le puits central, et dans les puits périphériques ajouter séparément 0,1 mL d'une forte suspension de *R. salmoninarum* (témoin positif), de solution saline (témoin négatif), et un homogénat de tissu rénal à 50 % dans de la solution saline (échantillon étudié). Disposer le tout de façon à ce que les échantillons soient adjacents aux témoins positifs. Incuber les boîtes de Pétri dans une chambre humide à 15 °C pendant 48 heures. Un test positif est caractérisé par une ligne de précipitation d'identité ou d'identité partielle entre l'échantillon et un témoin positif.

- ii) **Épreuve de dépistage par immunofluorescence directe** (Bullock et al. 1980) : Préparer un frottis de rein sur une lame de verre propre, laisser sécher à l'air et fixer pendant 5 à 8 minutes dans l'acétone à 20 °C. Ajouter sur la lame une à deux gouttes de l'antisérum spécifique de *R. salmoninarum*, à la dilution optimale recommandée contenant le contre-colorant rhodamine (Difco), dilué au 1:150 – 1:200, et laisser réagir pendant 5 à 8 minutes à 20 – 25 °C. Rincer la lame et laver pendant deux minutes dans une solution saline renfermant un tampon phosphate (pH 7,2) et faire sécher à l'air. Ajouter une goutte de liquide de montage (pH 9,0) à la surfaceensemencée, couvrir d'une lamelle et examiner un minimum de 25 champs sous l'huile à immersion en utilisant un microscope équipé d'une source de rayons ultraviolets. Un témoin positif doit être préparé et coloré de la même façon. La présence de petits diplobacilles fluorescents de taille et de forme typique constitue un test positif.

- iii) **Épreuve de dépistage par immunofluorescence indirecte** (Bullock et Stuckey 1975) : L'épreuve de dépistage par immunofluorescence indirecte peut être utilisée à la place de l'épreuve par immunodiffusion et de l'épreuve de dépistage par immunofluorescence directe pour confirmer la présence de *R. salmoninarum*. Consulter l'ouvrage de référence pour la bonne procédure.

h. Confirmation biochimique d'*A. salmonicida* et d'*Y. ruckeri*

Les tests de confirmation d'isolats d'*A. salmonicida* et d'*Y. ruckeri* identifiés par présomption sont réalisés en utilisant des milieux classiques (Difco) tels que décrits par Edwards et Ewing (1972) ou le système diagnostique miniaturisé API-20E (bioMérieux SA 69280 Marcy l'Étoile, France) et en comparant les résultats avec ceux obtenus pour des cultures connues (témoin positif) de l'agent pathogène.

- i) Ensemencer par stries la culture bactérienne sur le milieu TSA et incuber à 20 °C pendant 24 à 48 heures pour obtenir une culture pure.

- ii) Préparer et inoculer séparément la culture bactérienne suspecte et la culture connue, selon les recommandations (Difco, Analytab Products Inc.). Lorsqu'on

confirme par présomption des isolats identifiés d'*Y. ruckeri*, on recommande de prendre comme inoculum une suspension saline ayant une turbidité finale équivalente à celle d'une norme de turbidité McFarland n° 1.

iii) Incuber les milieux inoculés soumis à des tests biochimiques à 20 °C pendant 24 à 72 heures. Ajouter les réactifs nécessaires et lire les résultats du test tel que recommandé (Difco, API-20E).

iv) Comparer les résultats obtenus pour l'isolat suspect à ceux des cultures bactériennes connues. Pour l'interprétation des profils biochimiques d'*A. salmonicida*, consulter les articles de Paterson (1974) et de Paterson et al. (1980); et pour *Y. ruckeri*, consulter l'article de Stevenson et Daly (1982).

i. Sensibilité à l'agent vibriostatique 0/129 et à l'antibiotique novobiocine

Le test se fait sur boîte de Pétri TSA en déposant un disque imprégné de 0/129 et un disque de novobiocine (5 µg) (Difco) sur le milieu dont la surface a été uniformément ensemencé avec l'organisme étudié. Après incubation à 20 – 22 °C pendant 16 à 24 heures, si les organismes sont sensibles, une zone claire se forme autour du disque. Pour préparer les disques de 0/129, saturer des disques (6 mm) de papier-filtre Whatman, destinés à l'essai de sensibilité aux antibiotiques, avec une solution à 0,1 % de l'agent 0/129 dans l'acétone. Éliminer l'excédent de solution et faire sécher le disque à 37 °C. Un disque témoin imprégné seulement d'acétone doit être inclus pour empêcher une réaction inhibitrice possible due à l'acétone. On peut obtenir l'agent vibriostatique 0/129 (diamino-2, 4 diisopropyl-6, 7 pteridine) auprès d'Oxoid Inc. au Canada.

j. Test de motilité des myxobactéries sur gélose

i) Découper un bloc de gélose de 5 mm de côté sur lequel se trouve une colonie suspecte, le placer sur une lame et le recouvrir délicatement avec une lamelle.

ii) Examiner les bords de la colonie à fort grossissement et noter tout signe de motilité par glissement.

k. Tests sérologiques de confirmation

La confirmation de l'identité des bactéries par des tests sérologiques tels que les réactions d'agglutination sur lame, dans des tubes ou dans des petits puits doit être effectuée en utilisant des techniques classiques. Les sérums utilisés doivent être normalisés, préférablement absorbés et appropriés pour le but visé. Les organismes témoins positifs et négatifs doivent être inclus.

X. TECHNIQUES DE DÉTECTION DES VIRUS

A. BUT

1. La présence d'un agent filtrable, dans les échantillons de poisson, qui présente une réplication intracellulaire dans l'une ou l'autre des lignées cellulaires déterminées doit être certifiée, qu'il soit possible ou non d'identifier ce virus avec les antisérums actuellement disponibles et que son pouvoir pathogène pour les Salmonidés soit connu ou non. La méthodologie dépend de la détection d'effets cytopathologiques (CPE) dans les cultures cellulaires sensibles.
2. Toute lésion proliférative anormale (tumeurs) rencontrée doit être examinée par des méthodes histologiques, et les résultats de l'évaluation histologique signalés.

B. TISSUS À ANALYSER

1. Alevins vésiculés et alevins à vésicule absorbée : analyser au complet (lorsque présents, les sacs vitellins doivent être d'abord enlevés puis jetés).
2. Poissons dont la longueur moyenne à la fourche varie de 2 à 4 cm : enlever et jeter les têtes, mais garder les branchies; couper la queue juste avant l'anus. Hacher le reste des carcasses et analyser.
3. Poisson dont la longueur à la fourche varie entre 4 à 10 cm : enlever les branchies, puis éviscérer; analyser les viscères et les branchies combinés. Après enlèvement des branchies, l'éviscération se fait en étêtant d'abord le poisson, en incisant la paroi abdominale jusqu'à l'anus et finalement en coupant et grattant pour enlever les viscères (y compris le rein).
- 4 a) Poisson dont la longueur à la fourche est d'au moins 10 cm : analyser des mélanges de rein, rate, pancréas et caecums pyloriques ainsi que de branchies. Le rapport entre les volumes relatifs de ces tissus devrait être de 3:1:1:1. Une partie du rein antérieur, médian et postérieur doit être incluse dans l'échantillon.

b) Lorsque les poissons de cette taille sont des géniteurs et que les liquides de reproduction doivent être utilisés, une partie aussi grande que possible des échantillons de liquide de reproduction doit provenir des femelles. Pour un maximum de sensibilité, analyser individuellement les échantillons de liquides de reproduction.

C. COMBINAISON DES TISSUS

On peut combiner les tissus de cinq poissons au maximum pour former un échantillon. Mais, lors de la préparation des échantillons combinés, il ne faut jamais regrouper des poissons d'apparence saine (ou leurs tissus) avec des poissons moribonds ou morts (ou leurs tissus.)

D. PRÉPARATION DES INOCULA

Les échantillons doivent être analysés en deçà de 48 heures après le prélèvement (voir VIII.A.1). Avant et pendant l'analyse, les échantillons doivent être gardés réfrigérés ou sur de la glace, mais non congelés.

1. Tissus solides : Les tissus doivent être pesés et homogénéisés dans un volume minimal de solution saline équilibrée (SSE), comme celle de Earle ou de Hanks, dont le pH est de 7,6 à 7,8. Il existe deux méthodes :
 - a. Homogénéiser à l'aide d'un mélangeur Stomacher.
 - b. Utiliser un Ten Broeck stérile ou un homogénéisateur conçu pour permettre le refroidissement dans de la glace durant l'homogénéisation pour traiter de petits poissons ou de petites quantités de tissu. On doit faire attention pour empêcher une dissémination possible du virus dans l'air.
 - c. Utiliser un mortier et un pilon stériles préalablement refroidis pour broyer les tissus avec une petite quantité de sable stérile (silice de 80 - 120 mailles) jusqu'à obtention d'une pâte lisse. Il n'est pas nécessaire de stériliser entre chaque utilisation le matériel utilisé pour homogénéiser des échantillons regroupés si ceux-ci proviennent d'un même lot.

Après que les tissus ont été triturés, diluer chaque extrait d'échantillon pour obtenir une concentration finale de 2 % d'une suspension de tissus dans la SSE. Centrifuger les extraits pendant 15 minutes à 2500 x g à 4 °C et filtrer aseptiquement le surnageant décanté à l'aide d'une membrane filtrante à pores de 0,45 µm de diamètre. Pour éviter toute perte appréciable de virus par absorption sur le filtre, recueillir le plus grand volume possible de filtrat.

2. Échantillons liquides : effectuer une dilution 1:2 avec le milieu minimum essentiel de Eagle (MME) froid, dont le pH est à 7,2 - 7,6. Centrifuger à 2500 x g pendant 15 minutes à 4 °C puis décontaminer (voir X.D.1).

E. ANALYSE

1. Cultures cellulaires

Pour les analyses visant des virus inscrits à l'annexe II, utiliser deux des quatre lignées cellulaires continues recommandées suivantes : gonade de truite arc-en-ciel (RTG-2), embryon de saumon quinnat (CHSE-214), Epithelioma papulosum cyprinii (EPC) ou mené tête-de-boule (FHM). Les lignées cellulaires EPC ou FHM doivent être utilisées dans les régions enzootiques du virus NHI. Pour les autres agents de réplication filtrables préoccupants, susceptibles de causer des effets cytopathologiques dans les lignées cellulaires de poisson, on peut utiliser des lignées cellulaires qui sont scientifiquement acceptées et/ou prescrites dans le manuel diagnostique des maladies des animaux aquatiques de l'Office international des épizooties (OIE).

Si l'on prend l'anémie infectieuse du saumon (ISA) comme exemple d'une maladie qui jusqu'ici n'était pas facilement décelable avec les lignées cellulaires approuvées, la modification permet d'employer les cellules de rein de saumon (SHK), lignée cellulaire qui a démontré qu'elle permet de déceler le virus. Si on leur donne la possibilité d'utiliser cette lignée cellulaire et d'autres qui sont scientifiquement acceptées et/ou prescrites par l'OIE, les aquaculteurs canadiens seront en mesure d'exporter des œufs et des poissons vivants vers des pays qui exigent le dépistage des maladies de la liste de l'OIE.

La modification maintient l'exigence d'utilisation d'un minimum de deux lignées cellulaires pour toutes les analyses menées aux termes du RPSP, y compris l'emploi de cellules EPC ou FHM dans les régions enzootiques du virus NHI. En cas de nécessiter pour l'exportation des produits d'un établissement aquacole ou pour la surveillance visant à établir ou à maintenir des zones sanitaires, on peut utiliser des lignées cellulaires supplémentaires.

Deux fois l'an ou avant chaque saison d'inspection, toutes les cultures cellulaires en stock doivent être analysées et trouvées exemptes de mycoplasme. Chaque type de cellule doit également être analysé pour établir sa sensibilité aux virus enzootiques à la région (c.-à-d. état, province ou bassin versant). Les cultures cellulaires donatrices utilisées pour préparer des couches monocellulaires pour la détection des virus ne doivent pas être âgées de plus de deux semaines.

Pour de plus amples renseignements sur les cultures cellulaires et la virologie des poissons, se référer à McAllister (1979), Pilcher et Fryer (1980), Wolf et Quimby (1969) et Wolf (1970).

2. L'une ou l'autre des techniques suivantes peut être utilisée:

a. Inoculation de couches monocellulaires préformées :

- i) Préparer deux couches monocellulaires de chacune des deux lignées cellulaires pour chaque échantillon à analyser. Des boîtes de multiculture en plastique (puits de 1,5 à 2,0 cm de diamètre) peuvent être utilisées, fermées hermétiquement ou non (avec le tampon organique approprié incorporé dans le milieu).
- ii) Pour chaque puits, utiliser 1,0 mL du MME de Eagle, à pH de 7,2 à 7,6, contenant les sels de Earle, de la glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Comme antibactérien, on peut utiliser, par millilitre : 100 UI de pénicilline, 100 µg de streptomycine ou 50 µg de gentamicine. L'utilisation d'un fongistatique (p. ex. 25 UI de nystatine par mL) est également permise.
- iii) Incuber les cultures cellulaires entre 15 et 20 °C; la température est fonction du moment où les cultures seront requises pour l'analyse. Au moment de l'inoculation, les couches monocellulaires doivent être confluentes de 70 à 90 % et ne pas avoir plus de 48 heures.
- iv) Enlever le milieu de culture et laver les couches monocellulaires avec la SSE, que l'on élimine avant d'inoculer 0,1 mL de l'échantillon filtré dans chaque puits.

- v) Incuber les cultures cellulaires inoculées à 15 °C pendant 60 à 90 minutes. À toutes les 20 minutes, secouer doucement les cultures pour étendre uniformément les inocula. Ajouter 1 mL du MME de Eagle contenant 2 % de SVF à chaque couche monocellulaire. Remarque : le nouveau milieu doit être de même composition qu'en E.2.a(ii) sauf pour la quantité moins grande de SVF et le pH final doit être compris entre 7,6 et 7,8.
 - vi) Incuber les cultures à 15 °C.
- b. Utilisation simultanée des cellules et de l'échantillon :
- i) Placer dans les puits de culture tissulaire 1,0 mL de milieu (voir X.E.2a) contenant un nombre suffisant de cellules pour obtenir une couche monocellulaire continue à 70 – 90 %. Il faut faire deux cultures de deux lignées cellulaires (voir X.E.1) pour chaque échantillon.
 - ii) Ajouter immédiatement 0,1 mL d'échantillon filtré à chacune des cultures.
 - iii) Incuber les cultures à 15 °C.

3. Témoins

Pour chaque lot de cultures cellulaire utilisées pour l'analyse, préparer en double des témoins négatifs. Les contrôles négatifs doivent être constitués de cultures inoculées suivant la méthode utilisée pour les analyses, sauf qu'il faut utiliser une solution saline équilibrée stérile à la place de l'échantillon.

4. Marche à suivre au cours de l'incubation

- a. Examiner les cultures peu de temps après l'inoculation et après 24 heures. Par après, examiner les cultures au moins à tous les jours pour vérifier l'apparition d'effets cytopathologiques (ECP).
- b. Un échantillon est considéré comme négatif si aucun ECP n'est apparu dans les cultures pendant les 14 à 21 jours qui suivent l'inoculation.
- c. Si des ECP apparaissent dans une ou plusieurs des cultures inoculées avec les échantillons, on doit vérifier si un agent de réplication filtrable est présent. Filtrer (filtre à pores de 0,45 µm de diamètre) le liquide de culture provenant des puits présentant des ECP, diluer le filtrat jusqu'à 10^{-1} et 10^{-3} avec de la solution saline équilibrée et inoculer 0,1 mL de chacune des dilutions dans des nouvelles cultures, faites en double, de la même lignée cellulaire. Si des ECP sont encore observés, effectuer l'épreuve de séroneutralisation.

F. ÉPREUVE DE SÉRONEUTRALISATION

La présence présumée de l'agent responsable des ECP peut être établie d'après les observations cliniques lors de l'échantillonnage et le type d'ECP produit. L'identification se fait par neutralisation de l'agent avec un antisérum spécifique. L'absence de neutralisation avec des antisérums de virus connus indiquera habituellement la présence d'un virus jusque-là inconnu ou d'un sérotype atypique d'un virus connu de Salmonidés.

Méthode

- a. Employer un antisérum dilué pouvant neutraliser un volume égal d'une suspension qui contient de 10^2 à 10^3 de $DICT_{50}$ par mL du virus homologue.
- b. Filtrer le liquide d'une culture qui présente des ECP au moyen d'une membrane filtrante à pores de $0,45 \mu\text{m}$ de diamètre. Diluer le filtrat à 10^{-2} et 10^{-6} avec de la SSE stérile.
- c.
 - i) Mélanger 0,3 mL de l'antisérum dilué avec 0,3 mL de chacune des dilutions de l'échantillon.
 - ii) Mélanger 0,3 mL de sérum normal avec 0,3 mL de chacune des dilutions de l'échantillon.
 - iii) De la même manière, procéder à l'épreuve de séroneutralisation sur des témoins positifs en employant l'antisérum homologue et le sérum normal.
- d. Incuber les mélanges de la réaction à 15°C pendant 30 – 60 minutes puis inoculer 0,2 mL de chaque mélange dans deux cultures de la lignée cellulaire dans laquelle le virus a été isolé.
- e. Incuber les cultures à 15°C et observer s'il y a production ou inhibition d'ECP. L'inhibition des ECP par un antisérum donné (et non par un sérum normal) identifie le virus.

G. AUTRES MÉTHODES DE CONFIRMATION

La méthode approuvée pour déceler des virus est basée sur l'isolement suivi de l'identification sérologique. Les méthodes permettant de confirmer l'identification des isolats de cultures cellulaires ne se limitent pas à l'épreuve de séroneutralisation suggérée (X.F). D'autres épreuves immunosérologiques valables peuvent être utilisées, y compris la microscopie aux anticorps fluorescents, les épreuves à l'immunopéroxydase, les dosages immunoenzymatiques, le microtitrage et la microneutralisation, les épreuves de neutralisation sur plaque, les tests de fixation du complément et l'immunoélectromicroscopie.

XI. TECHNIQUES DE DÉTECTION DE CERTAINS PARASITES

A. BUT

L'absence de deux agents pathogènes myxosporidiens doit être établie. Ces agents sont *Myxobolus cerebralis* et *Ceratomyxa shasta*. Tout autre parasite que l'inspecteur sanitaire des poissons considère comme important doit être signalé.

B. TECHNIQUES POUR DÉCELER *MYXOBOLUS CEREBRALIS*

1. Les poissons doivent avoir au moins 120 jours et être, de préférence, frais. On peut utiliser des spécimens congelés, mais non ceux conservés dans le formol. Toute la verrerie et l'équipement utilisés dans le traitement des échantillons doivent être nettoyés avec soin pour éviter la propagation de spores.
2. Décapiter le poisson et enlever la chair de la tête après l'avoir fait chauffer dans l'eau à 45 – 50 °C jusqu'à coagulation du cerveau. Enlever le cerveau (et toute moelle épinière attachée) sans l'abîmer et le jeter. On évite ainsi que le tissu crânien ne soit contaminé par des spores de *Myxobolus neurobius*, autre parasite apparenté qui pourrait être confondu avec *M. cerebralis*.
3. On peut maintenant utiliser l'une ou l'autre des techniques suivantes :
 - a. Méthode de la digestion⁴
 - i) Rassembler environ 100 g du tissu crânien obtenu et broyer finement. La petite taille des premiers fragments facilitera une digestion complète et rapide.
 - ii) Placer dans un bûcher et ajouter 25 mL de solution de pepsine fraîchement préparée (1,0 g de pepsine dissoute dans 10 mL de HCl à 0,5 %) pour chaque gramme de tissu macéré.
 - iii) Bien mélanger, laisser reposer pendant deux minutes et examiner au microscope à contraste de phase un échantillon provenant de la surface du surnageant à un grossissement de 400 - 450X pour établir s'il contient des spores typiques.
 - iv) Si aucune spore n'est décelée, incuber le mélange à 35 – 40 °C pendant une heure à une heure et demi en le soumettant à une légère agitation. Une suspension trouble, grisâtre, exempte de grosses particules, devrait être obtenue à la fin de la période de digestion.

⁴ La méthode indiquée ci-dessus est une variante de la méthode de digestion par la pepsine-trypsine de Markiw et Wolf (1974a et 1974b).

- v) Placer 50 mL de la suspension dans des tubes à centrifuger coniques munis d'un bouchon fileté d'une capacité de 50 mL. Centrifuger à 1200 x g pendant 15 minutes à la température ambiante. Jeter le surnageant et remettre le culot en suspension dans 1,0 mL d'eau distillée. Le contenu de cinq tubes au maximum peut être combiné dans un échantillon. Examiner au microscope pour rechercher les spores comme précédemment.
 - vi) Si aucune spore n'est décelée, compléter le volume de chaque échantillon jusqu'à environ 6 mL avec de l'eau distillée. Étaler le contenu de chaque tube sur 3 mL d'une solution aqueuse de glucose à 55 % mise dans un tube à centrifuger conique de 12 mL. Centrifuger à 1200 x g pendant 30 minutes à la température ambiante.
 - vii) Prélever un peu du culot à l'aide d'une pipette Pasteur et examiner au microscope au moins 25 champs par échantillon tel que mentionné dans XI.B.3a(iii). L'observation de spores à n'importe quelle étape de la méthode constitue un résultat positif.
- b. Méthode de la centrifugeuse à plancton (O'Grodnick 1975 et Prasher et al. 1971)
- i) Rassembler 100 g du tissu crânien obtenu et broyer dans un mélangeur pendant 5 minutes avec de l'eau distillée. On peut utiliser jusqu'à 200 mL d'eau par 100 g de tissu crânien.
 - ii) Retirer le tissu broyé du mélangeur et filtrer à vide à l'aide d'un fin treillis métallique (0,5 à 1,0 mm). Si le filtre s'obstrue, rincer-le avec de l'eau distillée pour le nettoyer, tout en laissant l'eau de rinçage se mélanger au filtrat. Ce procédé permet d'éliminer les gros morceaux, tels que les grosses arêtes.
 - iii) Mettre le filtrat dans une ampoule à décantation placée de façon que le produit de la décantation tombe dans une centrifugeuse à plancton. Actionner la centrifugeuse à grande vitesse tout en y laissant lentement couler le filtrat.
 - iv) Centrifuger jusqu'à ce que toute l'eau ait été éliminée. Gratter le résidu qui s'est déposé sur les parois de la centrifugeuse, et le placer dans une petite bouteille. Y ajouter cinq volumes d'eau distillée. Ne diluer pas au-delà d'un total de 30 mL. Fermer et agiter la bouteille jusqu'à obtention d'une suspension uniforme.
 - v) Mettre une goutte de la suspension sur une lame ou un hémocytomètre si une quantification est nécessaire.
 - vi) Examiner au microscope à contraste de phase au moins 25 champs de la lame à un grossissement de 450X afin d'établir si des spores de *M. cerebralis* sont présents.
4. L'identification corroborée de spores de *M. cerebralis* doit reposer sur les caractères morphologiques donnés par Lom et Hoffman (1971).

C. TECHNIQUE POUR DÉCELER *CERATOMYXA SHASTA*

1. Les poissons doivent avoir au moins 120 jours; on peut utiliser des spécimens frais (de préférence) ou congelés.
2. Pour détecter les spores de *C. shasta*, il est préférable d'utiliser des tissus d'intestin et de vésicule biliaire. Le liquide péritonéal peut également contenir des spores. Des lames microscopiques de tissu, de liquide et de substance purulente peuvent être préparées et examinées au besoin selon l'une des deux méthodes suivantes :
 - a. **Préparations humides** : Faire des préparations humides en mélangeant doucement une quantité suffisante de tissu dans une ou deux gouttes de solution saline (NaCl à 0,9 %) sur une lame de microscope ordinaire pour obtenir une suspension raisonnablement diluée, couvrir d'une lamelle et examiner à un grossissement de 400 à 450X au microscope à contraste de phase.
 - b. **Frottis séchés** : Faire un frottis du tissu à examiner sur une lame de microscope ordinaire, laisser sécher à l'air, colorer pendant 30 à 60 secondes avec du colorant Loeffler au bleu de méthylène (dissoudre 0,3 g de chlorure de bleu de méthylène dans 30 mL d'éthanol à 95 % et ajouter 100 mL de KOH aqueux à 0,1 %), rincer à l'eau et laisser sécher à l'air. Ajouter une goutte d'huile à immersion ou d'eau à chaque frottis, recouvrir d'une lamelle et examiner à un grossissement de 400 à 450X. Les capsules et les filaments allongés polaires se colorent en bleu foncé tandis que le sporoplasme se colore en bleu pâle.
3. Pour les poissons dont la longueur à la fourche est inférieure à 7,5 cm, le tissu à examiner peut être prélevé des intestins. De plus, s'il y a des lésions nodulaires dans un des tissus ou s'il y a présence de liquide ascitique, faire des frottis ou des préparations humides de ce tissu ou de ce liquide.
4. Pour les poissons dont la longueur à la fourche est supérieure à 7,5 cm, ouvrir la cavité abdominale et prélever du tissu en grattant doucement la paroi interne de l'intestin grêle ou de la vésicule biliaire. Si l'on observe des lésions nodulaires sur un tissu ou à l'intérieur, en particulier sur les caecums pyloriques, ou si on trouve toute accumulation anormale de liquide, on doit les examiner pour établir si des spores de *C. shasta* sont présents.
5. Pour chaque frottis ou chaque préparation humide, il faut examiner au moins 25 champs microscopiques.
6. L'identification des spores de *C. shasta* doit reposer sur les caractères diagnostiques donnés par Johnson et al. (1979). On peut trouver des stades de *C. shasta* précédant la formation des spores en l'absence de ces derniers; ces stades ne permettent pas de diagnostiquer la présence de cet organisme et leur présence indique qu'il faut prélever d'autres échantillons et faire d'autres examens pour détecter des spores caractéristiques (Noble 1950; Yamamoto et Sanders 1979).

Pour un complément d'information sur l'identification des agents pathogènes des poissons, se référer à McDaniel (1979).

XII. TECHNIQUES DE DÉSINFECTION DES OEUFS

Ce n'est qu'après le gonflement d'eau qui suit la fécondation ou au tout début de la formation de l'embryon que les œufs de Salmonidés sont les plus efficacement désinfectés en surface. On trouvera ci-après la méthode proposée pour désinfecter les oeufs en surface, qui fait appel à des iodophores. Les iodophores servant à la désinfection sont habituellement composés de providone ou sont des complexes polyalcooliques d'iode dans lesquels l'iode solubilisé confère son activité germicide à large spectre mais n'est pas aussi corrosif ou irritant que sous sa forme élémentaire. Un certain nombre de désinfectants⁵ de ce type sont disponibles dans le commerce en Amérique du Nord, entre autres : Ovadine[®], Bridine[®], Betadine[®], Actomar K30[®], Wescodyne[®] et Argentyne[®]. La plupart contiennent une concentration d'iode actif de 1 – 2 %.

A. PRÉPARATION DU DÉSINFECTANT

1. Diluer le désinfectant à base d'iode pour obtenir une solution contenant 100 parties par million (ppm) d'iode actif. Le désinfectant doit être dilué dans de l'eau à faible teneur en matières organiques pour minimiser la perte d'iode libre. Utiliser un bac en plastique, en verre, en acier inoxydable ou en fibre de verre pour préparer et garder la solution.
2. Vérifier le pH du désinfectant dilué et, si nécessaire, ajuster à 6,5 - 7,5 en ajoutant du bicarbonate de sodium aqueux à 8 % (bicarbonate de soude).

B. TECHNIQUE DE DÉSINFECTION

1. Utiliser une solution fraîche de désinfectant dilué.
2. Pour éviter un choc thermique, amener la solution de désinfectant à la même température que la température ultérieure d'incubation des œufs.
3. Dans le cas d'œufs récemment fécondés, les laisser se gonfler d'eau une heure avant de les désinfecter.
4. Plonger dans le désinfectant les oeufs récemment gonflés dans l'eau ou les oeufs embryonnés pendant 10 minutes.
5. Traiter environ 2 000 oeufs par litre de désinfectant avant de le jeter.
6. Rincer les œufs à fond dans de l'eau non contaminée après les avoir désinfectés.
7. Éviter tout contact avec l'appareillage, l'eau ou le personnel pour empêcher la contamination des œufs désinfectés.

Des iodophores dilués peuvent également être utilisés pour désinfecter les surfaces de travail, les ustensiles, les filets et les autres appareils utilisés au cours du prélèvement des œufs, mais il faut les rincer à fond dans une eau propre, non contaminée après la désinfection.

⁵ Les produits mentionnés se sont révélés satisfaisants pour les objectifs poursuivis; cependant cela ne signifie pas que d'autres produits ne peuvent être tout aussi satisfaisants.

BIBLIOGRAPHIE

- Amandi, A., S.F. Hiu, J.S. Ronovec and J.L. Fryer. 1982. Isolation and characteristics of *Edwardsiella tarda* from fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Appl. Envir. Microbiol.* 43:1380-1384.
- Anacker, R.L. and J. Ordal. 1959. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. 1. Seriological typing. *J. Bacteriol.* 78:25-32.
- Bullock, G.L., B.R. Griffin and H.M. Stuckey. 1980. Detection of *Corynebacterium salmoninus* by direct fluorescent antibody test. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37:719-721.
- Bullock, G.L. and H.M. Stuckey. 1975. Fluorescent antibody identification and detection of the *Corynebacterium* causing kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Board Can.* 32:2224-2227.
- Chen, P.K., G.L. Bullock, H.M. Stuckey and A.C. Bullock. 1974. Serological diagnosis of corynebacterial kidney disease of salmonids. *J. Fish. Res. Board Can.* 31:1939-1940.
- Edwards, P.R., and W.H. Ewing. 1972. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, MN. 362 p.
- Evelyn, T.P.T. 1971. An aberrant strain of the bacterial fish pathogen *Aeromonas salmonicida* isolated from a marine host, the sablefish (*Anoplopoma fimbria*) and from two species of cultured Pacific salmon. *J. Fish. Res. Board Can.* 28:1629-1634.
- Fijan, N.N. 1969. Antibiotic additives for the isolation of *Chondrococcus columnaris* from fish. *Appl. Micro.* 17:333-334.
- Griffin, P.J., S.F. Snieszko and S.B. Friddle. 1952. A more comprehensive description of *Bacterium salmonicida*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 82:129-138.
- Johnson, K.A., J.E. Sanders and J.L. Fryer. 1979. *Ceratomyxa shasta* in salmonids. U.S. Fish and Wild. Serv., Fish Dis. Leaflet No. 58, Washington, DC. 11 p.
- Lom, J. and G.L. Hoffman. 1971. Morphology of the spores of *Myxobolus cerebralis* and *M. cartilaginis* (Hoffman, Putz, and Dunbar 1965). *J. Parasitol.* 57(6):1302-1308.
- MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 527.p.
- Markiw, M.E. and K. Wolf. 1974a. *Myxosoma cerebralis*: Isolation and concentration from fish skeletal elements – sequential enzymatic digestions and purification by differential centrifugation. *J. Fish. Res. Board Can.* 31:15-20.
- Markiw, M.E. and K. Wolf. 1974b. *Myxosoma cerebralis*: Comparative sensitivity of spore detection methods. *J. Fish. Res. Board Can.* 31:1597-1600.
- McAllister, P.E. 1979. Fish viruses and viral infections. *In Comprehensive Virology*, Vol. 14, Fraenkel-Conrat, H. and R.R. Wagner [eds], Plenum Press, New York and London. p 401-470.
- McDaniel, D. 1979. Fish Health Bluebook: procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish. Health Sec., Am. Fish. Soc., Bethesda, MD. 118 p.
- Noble, E.R. 1950. On a myxosporidian (protozoan) parasite of California trout. *J. Parasitol.* 36:457-460.
- O'Grodnick, J. J. 1975. Whirling disease *Myxosoma cerebralis*: Spore concentration using the continuous plankton centrifuge. *J. Wild. Dis.* 11:54-57.
- Ossiander, F.J. and G. Wedemeyer. 1973. Computer program for sample sizes required to determine disease incidence in fish populations. *Fish. Res. Board Can.* 30: 1383-1384.
- Paterson, W.D. 1974. Biochemical and serological differentiation of several pigment producing aeromonads. *J. Fish. Res. Board Can.* 31:1259-1261.

- Paterson, W.D., D. Douey and D. Desautels. 1980. Isolation and identification of an atypical *Aeromonas salmonicida* strain causing epizootic losses among Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in a Nova Scotian hatchery. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37:2236-2241.
- Pilcher, K.S. and J.L. Fryer. 1980. The viral diseases of fish: A review through 1978. Part 1: Diseases of proven viral etiology. *CRC Critical Reviews in Microb.* 7(4):287-363.
- Prasher, J.B., W.M. Tidd and R.A. Tubb. 1971. Techniques for extracting and quantitatively studying the spore stage of the protozoan parasite *Myxosoma cerebralis*. *Prog. Fish-Cult.* 33:193-196.
- Rabb, L., J.W. Cornick and L.A. McDermott. 1964. A microscopic slide agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish. *Prog. Fish-Cult.* 26 :118-119.
- Sanders, J.E. and J.L. Fryer. 1980. *Renibacterium salmoninarum* gen. nov., sp. nov., the causative agent of bacterial kidney disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30(2):496-502.
- Shieh, H.S. 1980. Studies on the nutrition of a fish pathogen, *Flexibacter columnaris*. *Microbios Letters* 13:129-133.
- Stevenson, R.M.W. and J.G. Daly. 1982. Biochemical and serological characteristics of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:870-876.
- Taylor, E.L., S.J. Coli and D.R. Junell. 1973. Attempts to control whirling disease by continuous drug feeding. *J. Wild. Dis.* 9: 320-325.
- Wolf, K. 1970. Guidelines for virological examination of fishes. *In* A symposium on diseases of fish and shellfish. *Am. Fish. Soc., Spec. Publ. No. 5*, Washington, DC. p327-340.
- Wolf, K., and M.C. Quimby. 1969. Fish cell and tissue culture. *In* *Fish Physiology*. Hoar, W. S. and D.J. Randall [eds]. Academic Press, New York, NY. 3 :253-305.
- Yamamoto, T. and J.E. Sanders. 1979. Light and electron microscopic observations of sporogenesis in the nyxosporidium, *Ceratomyxa shasta* (Noble 1950). *J. Fish Dis.* 2:411-428.

ANNEXE 1

REGISTRE NATIONAL DE LA SANTE DES ANIMAUX AQUATIQUES

Le Registre national de la santé des animaux aquatiques est une banque de données servant à recueillir et à distribuer l'information concernant les maladies des poissons au Canada. Les inspecteurs sanitaires du poisson devraient soumettre régulièrement au responsable du Registre les rapports de laboratoire sur l'état pathologique des poissons établis à partir de tous les examens faits au Canada pour déceler les maladies, non seulement les analyses faites aux fins de délivrance de certificats, mais également les examens faits dans le cadre de programmes d'échantillonnage périodiques réguliers.

Le responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques se charge :

1. de maintenir une étroite surveillance de la répartition géographique et de la fréquence des maladies du poisson au Canada et d'identifier les urgences en cette matière;
2. d'agir à titre de coordonnateur dans les cas d'urgences nationales touchant à la santé des poissons;
3. de fournir des rapports, des analyses et des évaluations périodiques sur l'état pathologique des poissons au Canada;
4. de fournir les antécédents sanitaires des sources de poissons vivants et d'œufs;
5. de maintenir et de fournir des listes des établissements canadiens et étrangers autorisés à faire l'élevage du poisson;
6. de maintenir et de fournir des listes des inspecteurs sanitaires des poissons et des agents locaux de protection de la santé du poisson autorisés par le ministre;
7. de maintenir et de fournir des listes des représentants officiels autorisés par le gouvernement canadien à délivrer des certificats dans les pays étrangers qui exportent du poisson et des œufs au Canada.

L'adresse du Registre national est la suivante :

Registre national de la santé des animaux aquatiques
Ministère des Pêches et des Océans
Ottawa (Ontario) Canada
K1A 0E6
Tél : 613-990-7033
Télec. : 613-993-7665
Courriel : nfrd@dfo-mpo.gc.ca

ANNEXE 2

ADMINISTRATION RÉGIONALE

Le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* est administré et mis en application par divers organismes provinciaux et régionaux. Dans certaines régions, les organismes provinciaux sont concernés, alors que dans d'autres, ce sont des organismes fédéraux. Leurs adresses et numéros de téléphone sont les suivants :

Administration des pêches provinciales

Alberta	Alberta Fish and Wildlife 6909 – 116 th Street Edmonton AB T6H 4P2	780-427-8288
Colombie-Britannique	BC Ministry of Water, Land and Air Protection PO Box 9363, Stn PROV GOVT Victoria BC V8W 9M2	250-387-9500
	BC Ministry of Agriculture, Food and Fisheries Access Centre, 2500 Cliffe Ave Courtenay BC V9N 5M6	250-897-7500
Manitoba	Manitoba Dept of Natural Resources Box 48 Saulteaux Crescent Winnipeg MN R3J 3W3	204-945-7789
Ontario	Ontario Ministry of Natural Resources Fish and Wildlife Branch 300 Water Street Peterborough ON K9J 8M5	705-755-1928
Québec	Direction du développement de la faune Société de la faune et des parcs du Québec Édifce Marie-Guyart, 11 ^e étage, boîte 92 675, boul. René-Levesque Est Québec (Québec) G1R 5V7	418-521-3875 poste 4496
Saskatchewan	Saskatchewan Environment 3211 Albert Street Regina SK S4X 5W6	306-787-2467

BUREAUX RÉGIONAUX DE L'ADMINISTRATION FÉDÉRALE DES PÊCHES

Ontario, Manitoba, Saskatchewan Alberta, Nunavut	Pêches et Océans Canada Institut des eaux douces 501, University Avenue Winnipeg MN R3T 2N6	204-983-5125
Terre-Neuve-et-Labrador	Pêches et Océans Canada Bureau régional de Terre-Neuve Direction de la recherche sur les pêches C.P. 5667 St. John's NL A1C 5X1	709-772-2891
Territoires du Nord-Ouest	Pêches et Océans Canada 42043 MacKenzie Hwy Hay River NWT X0E 0R9	867-874-5575
Nouveau-Brunswick, Nouvelle-Écosse et Île-du-Prince-Édouard	Pêches et Océans Canada Bureau régional du Golfe C.P. 5030 Moncton, NB E1C 9B6	506-851-6081
Yukon et régions maritimes de la Colombie-Britannique	Pêches et Océans Canada Station biologique du Pacifique 3190 Hammond Bay Road Nanaimo BC V9T 6N7	604-756-7069

ANNEXE 3

TITRES ET QUALITÉS DES INSPECTEURS SANITAIRES DES POISSONS

Les conséquences de l'introduction d'une maladie infectieuse des poissons sont très importantes, aussi l'inspecteur sanitaire des poissons doit-il bien connaître le domaine de la santé des poissons ainsi que les méthodes de diagnostic. Les critères suivants représentent les exigences minimales nécessaires pour être accepté par le gouvernement canadien comme inspecteur sanitaire des poissons.

A. ÉTUDES ET EXPÉRIENCE

1. Baccalauréat, ou l'équivalent, dans tout domaine des pêches ou des sciences biologiques et deux années d'expérience en ichtyopathologie, comprenant une expérience des techniques bactériologiques, virologiques et parasitologiques.
2. Maîtrise ou doctorat en médecine vétérinaire, ou l'équivalent, et une bonne formation en bactériologie, virologie et parasitologie ainsi qu'un an d'expérience en ichtyopathologie.

B. LABORATOIRE

Le futur inspecteur doit disposer d'un laboratoire approprié pour l'évaluation microbiologique et parasitologique des échantillons.

C. FORMALITÉS À REMPLIR

Pour que la demande d'autorisation comme inspecteur sanitaire des poissons soit étudiée, un candidat doit soumettre au Registre national de la santé des animaux aquatiques, son curriculum vitae, trois spécimens de sa signature ainsi qu'une description des installations et de l'équipement de laboratoire disponibles, et compléter un questionnaire sur le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* et le présent Guide de procédures.

ANNEXE 4

CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON

Le certificat de santé du poisson a été révisé. Veuillez noter les modifications suivantes :

- 1) Le certificat doit porter un numéro, ce qui permettra d'identifier le certificat le plus récent. De plus, les pays qui importent des poissons du Canada sont nombreux à exiger un numéro de certificat.
- 2) Le nouveau formulaire fait une distinction entre les installations agréées pour les œufs seulement et celles qui peuvent fournir des œufs et des poissons. Ce changement prend acte du fait que les exigences de dépistage varient selon le type d'installation.
- 3) Il n'est plus requis de signaler les autres agents pathogènes. Si un agent pathogène préoccupant est décelé au cours des inspections menées aux termes du Règlement selon les méthodes décrites dans le Guide de procédures et ses modifications (comme celle portant sur les lignées cellulaires supplémentaires), il doit être signalé dans le formulaire de Rapport de laboratoire et être inscrit dans la section « Notes » du Certificat sanitaire du poisson.
- 4) Les dates des quatre inspections les plus récentes, par ordre chronologique descendant, doivent être signalées, en commençant par l'inspection que vise le certificat.
- 5) Pour faciliter la photocopie, la taille du formulaire est maintenant de 8,5 x 11.



CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON
Oeufs Seulement Oeufs et Poissons

Nom de l'installation/la source : _____
Adresse : _____
N° de téléphone : _____ N° de télécopieur : _____ Courriel : _____

Je, _____, inspecteur sanitaire des poissons accrédité en vertu du *Règlement sur la protection de la santé des poissons*, C.R.C., ch.812, déclare que la source nommée ci-dessous a été inspectée selon les méthodes approuvées par le ministre de Pêches et Océans Canada et que l'état pathologique qui suit a été déterminé, tel qu'il est prescrit dans ledit Règlement.

<u>Agent pathogène</u>	<u>Décelé</u>	<u>Non décelé</u>	<u>Non analysé</u>
Virus de la septicémie hémorragique virale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Virus de la nécrose pancréatique infectieuse	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Autre agent de répliation filtrable	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Yersinia ruckeri</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Myxobolus cerebralis</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<i>Ceratomyxa shasta</i>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Notes : _____

Dates des quatre dernières inspections : (utilisez la notation J/M/A)

Date de délivrance Signature et adresse postale de l'inspecteur N° de téléphone/ N° de télécopieur

Le présent certificat expire le jour où l'état pathologique change ou le _____, (J/M/A) selon la première des deux éventualités.

DÉCLARATION D'EXPORTATION

Je, _____, propriétaire directeur de l'installation susmentionnée dont la dernière inspection remonte au _____ (J/M/A) déclare que, à ma connaissance, aucun agent pathogène énuméré à l'annexe II du *Règlement sur la protection de la santé des poissons* (RPSP), qui modifierait l'état pathologique décrit ci-dessus, n'a été décelé dans cette installation depuis la dernière inspection, conformément aux procédures exposées dans le *Guide de procédures* du RPSP, qu'aucun poisson ou ouf de poisson provenant d'une source qui modifierait cet état pathologique n'a été introduit dans cette installation, que l'envoi décrit ci-dessous proviendra uniquement de l'installation en question et que les oeufs expédiés subiront une désinfection en surface avant de quitter la source.

Je, _____, expéditeur d'oeufs obtenus de géniteurs sauvages, déclare que les oeufs subiront une désinfection en surface et qu'ils proviendront uniquement de la source inspectée.

L'envoi se compose de :

_____ kg Vivants Oeufs Espèce : _____
_____ Nombre Morts Poissons Espèce : _____

Date Signature et adresse du propriétaire, du directeur ou de l'expéditeur N° de téléphone

RENSEIGNEMENTS SUR L'IMPORTATION

Ville et pays d'origine _____ Transporteur _____
N° de connaissance _____ Date _____
Port d'entrée prévu au Canada (ville et province) : _____ Date _____

Date (J/M/A) Signature et adresse de l'importateur N° de téléphone



ANNEXE 5

RAPPORT DE LABORATOIRE SUR L'ÉTAT PATHOLOGIQUE DES POISSONS

Le formulaire de rapport a été entièrement révisé. Nous y joignons, pour vous éclairer, un exemple de formulaire rempli. Le nouveau rapport permet de rendre compte de façon détaillée des méthodes de diagnostic et des résultats. Les renseignements supplémentaires qui y sont consignés peuvent être utiles aux agents locaux de protection de la santé du poisson pour évaluer les demandes de licences d'importation. Le rapport donne une liste de tests, mais il ne faut pas oublier que c'est le Guide de procédures (et ses modifications) qui constitue la norme sur laquelle se fondent les licences d'importation au Canada. La nouvelle version du rapport pourra servir à des fins de certification sanitaire des poissons autres que celles du RPSP – par exemple pour répondre à des exigences commerciales basées sur le Code sanitaire de l'OIE.

NOTES

ABRÉVIATIONS DES NOMS DES ESPÈCES

OC	Omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)
OA	Ombre arctique (<i>Thymallus arcticus</i>)
SA	Saumon atlantique (<i>Salmo salar</i>)
OF	Omble de fontaine (<i>Salvelinus fontinalis</i>)
TB	Truite brune (<i>Salmo trutta</i>)
SK	Saumon kéta (<i>Oncorhynchus keta</i>)
SC	Saumon coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)
SQ	Saumon quinnat (chinook) (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)
TF	Truite fardée (<i>Oncorhynchus clarki</i>)
DV	Dolly Varden (<i>Salvelinus malma</i>)
STH	Saumon ou truite hybride (préciser le croisement)
K	Kokani (<i>Oncorhynchus nerka</i>)
TOU	Touladi (<i>Salvelinus namaycush</i>)
AS	Autre salmonidé (Inconnu, <i>Plecoglossus</i> , <i>Hucho</i> , <i>Brachymystax</i> , etc. – préciser : _____)
SRS	Saumon rose (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)
TAC	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
SRG	Saumon rouge (<i>Oncorhynchus nerka</i>)
SAC	Saumon arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
CO	Corégonidé (<i>Coregonus</i> , <i>Prosopium</i> , etc.) préciser le genre et l'espèce : _____)
*/T	abréviation de l'espèce/transgénique

On calcule l'âge à partir de l'éclosion. Pour les lots de poissons de moins d'un an, on indique l'âge en chiffres arabes suivis de « mois »; pour les poissons de plus d'un an, on indique l'âge en chiffres arabes suivis de « an » ou « ans ».

Les constatations sont rapportées en colonnes de haut en bas pour chaque lot, comme suit : case 1 - nombre de poissons examinés; case 2 - méthodes employées; case 3 – résultats (négatifs ou prévalence de l'infection plus test de confirmation).

ABRÉVIATIONS DES NOMS DES AGENTS PATHOGÈNES

VNPI	Virus de la nécrose pancréatique infectieuse
VNHI	Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse
VSHV	Virus de la septicémie hémorragique virale
VHSM	Virus de l'herpès-virose du saumon <i>masou</i>
ISAV	Virus de l'anémie infectieuse du saumon

As	<i>Aeromonas salmonicida</i>	
Yr	<i>Yersinia ruckeri</i>	C = mortalités
Rs	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	
Mc	<i>Myxobolus cerebralis</i>	
Cs	<i>Ceratomyxa shasta</i>	

Prévalence de l'infection

p = porteurs
i = infection clinique
e = épizootie

MÉTHODES DIAGNOSTIQUES

VIRUS - méthodes codées comme suit :
Première lettre = méthode d'échantillonnage

A = homogénats d'alevins entiers
B = homogénats de l'ensemble des viscères
C = rein/rate
D = liquides reproducteurs
E = rein/rate/caecums pyloriques/lamelles branchiales
F = rein/rate/encéphale
G = autres

Chiffres = lignées cellulaires continues utilisées

1 = RTG-2 (gonade de truite arc-en-ciel)
2 = CHSE-214 (embryon de saumon quinnat)
3 = FHM (mené tête-de-boule)
4 = EPC (Epithelioma papillosum cyprinii)
5 = BF2 (nageoire de crapet arlequin)
6 = SHK-1 (rein de saumon)
7 = autres lignées cellulaires

Dernière lettre = regroupement des échantillons

A = poissons pris individuellement
B = groupes de cinq poissons
C = autre : _____

BACTÉRIES – méthodes codées comme suit :

Lettre = état de santé des poissons échantillonnés
A = vivants, pris au hasard

B = moribonds

?

C = morts

Chiffre = tissu échantillonné

1 = rein
2 = lésion
3 = branchie
4 = autre: _____

Dernière lettre = technique employée pour:

Isolement primaire

A = milieu de culture standard TSA
B = milieu de gélose Cytophaga
C = milieu de Shieh
D = autre: _____

Diagnostic de présomption
E = inspection visuelle seulement (Rs)
F = coloration de Gram, frottis de rein (Rs)
G = épreuve biochimique/physique standard
H = autre: _____

PROTOZOAIRES - méthodes codées comme suit:

A = digestion
B = centrifugeuse à plancton
C = examen de frottis coloré
D = inspection visuelle seulement (Cs)

TESTS DE CONFIRMATION POUR LES VIRUS, LES BACTÉRIES ET LES PARASITES

H = séroneutralisation
I = immunofluorescence
J = agglutination (lame, tube, Microwell)
K = ELISA
L = profil biochimique
M = PCR
N = autre: _____

