

Règlement sur la protection de la santé des poissons

# GUIDE DE PROCÉDURES

Ottawa 1984 (révisé en 2011)



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 2011)  
Réimprimé en 1989  
Réimprimé en 1986  
N ° de cat. Fs 41-31/31-1984  
ISBN 0-662-53060-8  
MPO/4281

On devra référer comme suit à cette publication :

Pêches et Océans Canada. 1984 (révisé en 2011). Règlement sur la protection de la santé des poissons :guide de procédures. Serv. pêches mar. Publ. div. spéc. (édition révisée) : iv + 58 p.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Résumé</b> .....	iv
I. Introduction.....	1
II. Règlement sur la protection de la santé des poissons .....	3
<b>Guide de procédures</b>	
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.....	17
VI. Règles d'échantillonnage.....	18
VII. Transport des échantillons .....	23
VIII. Traitement des échantillons .....	24
IX Techniques de détection de certaines bactéries pathogènes chez les poissons.....	25
X Techniques de détection des virus .....	33
XI Techniques de détection de certains parasites .....	38
XII Techniques de désinfection des œufs.....	42
<b>Bibliographie</b> .....	44
<b>Annexe 1</b> Registre national de la santé des animaux aquatiques .....	46
<b>Annexe 2</b> Administrations régionales .....	47
<b>Annexe 3</b> Titres et qualités des inspecteurs sanitaires des poissons .....	49
<b>Annexe 4</b> Certificat de santé du poisson .....	50
<b>Annexe 5</b> Rapport de laboratoire sur l'état pathologique des poissons.....	52
<b>Annexe 6</b> Exemples de tailles d'échantillons par lots. ....	55

## 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*. Le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* a été modifié afin de refléter la modification des pouvoirs en matière de circulation internationale de poissons, y compris de salmonidés. Les pouvoirs en matière de circulation internationale de poissons, y compris de salmonidés, relèveront de l'Agence canadienne d'inspection des aliments à compter de décembre 2011. Pour de plus amples renseignements sur les exigences de l'Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA) concernant l'importation, veuillez vous reporter au site Web de l'ACIA.

Ce guide 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 myxosporidien.

Aucun transport de poisson 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 *Règlement sur la protection de la santé des poissons*, 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 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, la nécrose pancréatique infectieuse et l'anémie infectieuse du saumon; 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 de l'étranger et entre les provinces des espèces d'élevage risque de favoriser 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 d'atténuer l'important obstacle qu'elle constitue pour la mise en valeur de ces types de pêches. Ce guide de procédures 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 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 les 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* est reproduit 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 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 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 dans 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. Il convient de noter que dans le cas du transport d'œufs, seul un dépistage viral est requis et que les agents pathogènes bactériens et parasites mentionnés à l'Annexe II ne sont pas visés. Lorsque des œufs ou poissons sont transférés d'une source dont le certificat de santé du poisson fait état d'un ou plusieurs des agents pathogènes visés, le certificat de santé du poisson de l'installation réceptrice sera modifié en fonction de celui de l'installation source (si des œufs désinfectés sont transférés, seul l'élément concernant les virus figurant à l'annexe II sera modifié pour l'installation réceptrice). Si une installation introduit des poissons ou des œufs de poissons venant d'une source qui ne détient pas de certificat de santé du poisson valide, elle 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 l'installation 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 conformément aux dispositions de la partie B - EXIGENCES RELATIVES À L'OBTENTION D'UN CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON. Les procédures données dans le présent 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 visé à l'Annexe II, le propriétaire ou l'exploitant d'une installation doit mettre en œuvre un programme d'éradication de l'agent pathogène, et l'installation doit

faire l'objet de quatre inspections satisfaisantes (où l'agent pathogène n'est 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.

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@dfo-mpo.gc.ca](mailto:nrfd@dfo-mpo.gc.ca)).

## II. RÈGLEMENT SUR LA PROTECTION DE LA SANTÉ DES POISSONS

*L'inclusion dans le présent Guide de procédures 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)

«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);

«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 pisciculture, 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 pisciculture; (wild fish).

### **Interdiction**

3. (1) Sous réserve du paragraphe (2), il est interdit de transporter du poisson d'élevage ou sauvage d'une province à l'autre sans un permis de transport interprovincial.  
(2) Le paragraphe (1) ne s'applique pas au poisson d'élevage éviscéré.

### **Permis**

4. Sous réserve de l'article 5, un agent local de protection de la santé du poisson d'une province peut délivrer un permis de transport interprovincial à quiconque en fait la demande, l'autorisant ainsi à transporter du poisson d'élevage ou sauvage dans cette province.
5. Un permis de transport interprovincial n'est délivré 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 et aucun agent pathogène visés aux annexes II à IV n'ont été dépistés;

- (b) l'agent local de protection de la santé du poisson d'une province est convaincu qu'aucune maladie et aucun agent pathogène indiqués sur le certificat ne nuiront à la conservation et à la protection du poisson dans cette province.

### **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 spp.</i>
Saumon du Danube et taïmen	<i>Hucho spp.</i>
Saumon de l'Atlantique	<i>Salmo spp.</i>
Truite	<i>Salmo spp.</i>
Omble	<i>Salvelinus spp.</i>
Ombre	<i>Thymallus spp.</i>
Lenok	<i>Brachymystax spp.</i>
Inconnu	<i>Stenodus spp.</i>
Ménomini	<i>Coregonus spp.</i>
Ménomini	<i>Prosopium spp.</i>
Ayu	<i>Plecoglossus spp.</i>

### **ANNEXE II**

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

1. Tout agent de réplication 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 (VNHI)
  - c. Nécrose pancréatique infectieuse (NPI)
2. Tournis (*Myxobolus cerebralis*)
3. Cératomyxose (*Ceratomyxa shasta*)
4. Furonculose (*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 (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. Maladie bactérienne du rein (*Renibacterium salmoninarum*)
3. Septicémie à aéromonades motiles (*Aeromonas sp. motile*)
4. Septicémie à pseudomonades (*Pseudomonas spp.*)
5. Vibriose (*Vibrio spp.*)

# GUIDE DE PROCÉDURES

## III. LIGNES DIRECTRICES POUR LES PRODUCTEURS

Le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* (RPSP) s'applique à toutes les installations d'où proviennent des poissons d'élevage vivants et morts, des œufs 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 transférés d'une province ou d'un territoire à un autre. Les « installations » comprennent tous les endroits servant à la propagation ou à la stabulation d'œufs et/ou de poissons. Les personnes qui désirent transférer des poissons entre des provinces ou des territoires canadiens 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*.

Un permis de transport interprovincial est obligatoire pour tous les envois de poissons ou d'œufs désignés ci-dessus, à l'exception d'envois entre les provinces de poissons d'élevage morts au Canada. Ces permis de transport interprovinciaux ne peuvent être accordés qu'aux producteurs qui peuvent fournir la preuve que les conditions sanitaires de leur installation ont été certifiées (voir la partie B ci-dessous - EXIGENCES RELATIVES À L'OBTENTION D'UN CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON) après inspection de leurs stocks de poisson par un inspecteur sanitaire des poissons autorisé. On peut obtenir la liste des inspecteurs sanitaires des poissons autorisés à délivrer des certificats auprès du ministère des Pêches et des Océans, Registre national de la santé des animaux aquatiques, Ottawa.

Tout producteur qui désire obtenir un certificat pour son installation de production doit, aux fins de l'inspection, fournir le poisson à ses frais. 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 les périodes 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 œufs avant tout envoi est fortement recommandée, 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.). Dans ces cas particuliers, une mention doit être portée sur le certificat de santé du poisson.

Dans certains cas, les laboratoires chargés d'établir les diagnostics sur l'état pathologique du poisson seront situés 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. CIRCULATION DES ŒUFS ET DES POISSONS**

Avant tout envoi, il est nécessaire d'obtenir un permis de transport interprovincial délivré par l'agent local de protection de la santé du poisson de la province/du territoire à laquelle/auquel l'envoi est destiné. Un permis de transport interprovincial doit accompagner tout envoi d'œufs ou de poissons. L'annexe II donne la liste des bureaux où l'on peut joindre les agents locaux de protection de la santé du poisson.

Pour obtenir un permis de transport interprovincial, les producteurs doivent présenter un exemplaire du certificat de santé du poisson (annexe 4) dont la partie DÉCLARATION DE L'INSTALLATION D'ORIGINE a été remplie et signée par le propriétaire ou le directeur de l'installation d'origine. La partie RENSEIGNEMENTS SUR L'INSTALLATION DESTINATAIRE doit aussi être remplie et comporter la signature et l'adresse du destinataire.

Le permis de transport interprovincial autorise le 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 nul le permis de transport interprovincial.

### **Circulation 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. Les agents viraux recherchés comprennent entre autres :

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

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

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 de transport 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'un permis de transport interprovincial délivré par l'agent local de protection de la santé du poisson de la province de destination.

Les installations sources des œufs désinfectés n'ont à fournir des renseignements sur les tests de dépistage des virus que lorsqu'elles demandent un permis de transport interprovincial. Cependant, lorsque seulement les renseignements sur les tests de dépistage des virus sont fournis, les œufs doivent être désinfectés à la source et à nouveau dans l'installation réceptrice. Si les informations sur toutes les maladies et tous les agents pathogènes visés à l'annexe II du RPSP sont fournies (y compris sur les bactéries et les parasites) et si la source est indiquée comme exempte de ces maladies, il n'est pas nécessaire de procéder à la désinfection des œufs.

## **Circulation 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 ou du territoire destinataire. Les agents viraux recherchés comprennent entre autres :

- Virus de la septicémie hémorragique virale (VSHV)
- Virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (VNHI)
- 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 un permis de transport interprovincial si le transport de ces poissons ne risque pas de donner lieu à l'introduction d'un agent viral, 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 ou le territoire destinataire.

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 ces agents pathogènes, même si ces derniers ont été décelés dans d'autres parties de la province. L'agent peut donc refuser des demandes de transport de poissons d'élevage vivants entre une source dans laquelle les tests ont démontré la présence d'un agent pathogène donné, et 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 mentionné 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'un permis de transport interprovincial délivré par l'agent local de protection de la santé du poisson de la province de destination.

## **Réception d'un envoi provenant de l'étranger**

Les installations certifiées en vertu du RPSP et souhaitant importer des poissons ou des œufs de poissons de l'étranger doivent se conformer aux exigences en matière d'importation définies par l'Agence canadienne d'inspection des aliments. Les installations qui veulent conserver leur certificat de santé du poisson en vertu du RPSP doivent également faire la preuve que chaque envoi est conforme à toutes les exigences supplémentaires relatives aux maladies énumérées dans le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* qui ne figurent pas dans le permis d'importation délivrée par l'ACIA. L'installation importatrice doit fournir à l'inspecteur sanitaire des poissons, pour chaque envoi, les résultats des tests sanitaires effectués sur les poissons, concernant les maladies non régies par l'ACIA mais visées au RPSP. Tout défaut de fourniture des résultats des tests sanitaires effectués sur les poissons pour les maladies non couvertes par le permis d'importation délivrée par l'ACIA, au niveau fixé dans le présent guide, entraînera l'annulation du certificat de santé du poisson par l'inspecteur sanitaire des poissons.

Il incombe également à l'installation importatrice de vérifier que toutes les autres conditions et réglementations régionales ou provinciales ont été respectées.

### **Poissons d'élevage morts, non éviscérés**

La source des poissons d'élevage morts et 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 RPSP, ce qui comprend :

- 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 un permis de transport interprovincial si le transport de ces poissons d'élevage morts et non éviscérés ne risque pas de donner lieu à l'introduction d'un agent viral, 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 destinataire.

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 ces 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 de transport de poissons d'élevage morts et non éviscérés entre une source dans laquelle les tests ont démontré la présence d'un agent pathogène donné, et une zone désignée comme exempte de ce pathogène.

### **ÉCHANTILLONNAGE D'UNE INSTALLATION EN VUE DE SA CERTIFICATION**

Les présentes lignes directrices visent à optimiser la détection des poissons contaminés par des pathogènes nouveaux et signalés dans une installation. Les meilleures pratiques en matière d'échantillonnage dépendent de plusieurs facteurs : le type d'installation (ouverte, à circulation directe, fermée, alimentée par un puits, à recirculation de l'eau), les maladies recherchées et la disponibilité de données sur ces maladies.

### **LIGNES DIRECTRICES GÉNÉRALES**

Pour pouvoir être transportés d'une province à une autre, les poissons, les œufs de poissons ou le sperme de poisson doivent provenir d'une installation certifiée en vertu du RPSP. Les exigences relatives à l'obtention et au maintien des certificats RPSP sont décrites ci-après. Si le type de l'installation n'est pas couvert par les critères énoncés à la partie B - EXIGENCES RELATIVES À L'OBTENTION D'UN CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON, quatre inspections satisfaisantes consécutives doivent être effectuées sur une période d'au moins 18 mois. Il est recommandé, mais pas obligatoire, d'effectuer deux inspections par année civile. Dans des conditions normales, les quatre inspections doivent être effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours. Il convient de noter que dans le cas du transport d'œufs, seul un dépistage viral est requis et que les agents pathogènes bactériens et parasites mentionnés à l'Annexe II ne sont pas visés. De plus, à l'exception des régions où la présence du parasite *Ceratomyxa shasta* est connue, le dépistage de routine de *Ceratomyxa shasta* (examen de frottis colorés de tissu intestinal) n'est pas nécessaire et les tests ne sont requis que sur les poissons montrant des signes cliniques d'infection.

Il faut obtenir des données de base pour tous les lots échantillonnés, notamment les données sur l'utilisation de vaccins et d'agents chimiothérapeutiques (nom, dosage, durée du traitement) et sur les lots échantillonnés (espèce, nombre de poissons sur place, âge, origine, documents sur la source, y compris un exemplaire du certificat de santé du poisson valide et du permis de transport interprovincial le cas échéant).

L'inspecteur sanitaire des poissons est libre de fixer les périodes et la fréquence de l'échantillonnage, ainsi que de choisir les poissons, ce qui lui laisse toute latitude pour détecter tout agent pathogène signalé. Il doit avoir accès aux registres des introductions, des pertes, de la fréquence des maladies et des traitements relatifs aux lots échantillonnés.

Pour constituer un échantillon provenant de plusieurs cages/bassins/bâtiments/sites répondant à la définition d'un lot aux fins de la certification en vertu du RPSP, il faut choisir en priorité, dans la mesure du possible : les poissons moribonds, ceux qui nagent en surface ou qui viennent respirer, les poissons infectés d'ectoparasites, ceux qui présentent des lésions importantes / de l'exophtalmie / une érosion des nageoires / etc., les poissons aux prises d'eau, en aval de la cage/du bassin/du site et au centre de la cage/du bassin/du site.

Les échantillons de poisson doivent être manipulés rapidement de manière à minimiser la dégénérescence. Les échantillons doivent être conservés au froid, mais pas congelés, et parvenir au laboratoire de manière à ce que les tests commencent dans les 72 heures suivant le prélèvement. 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.

Les échantillons de poisson doivent être transportés dans des sacs en plastique résistants et hermétiques (il faut séparer les poissons morts ou moribonds des poissons sains) placés dans un conteneur isolé en métal ou en plastique, chaque sac étant entouré d'une couche de glace ou d'un contenant réfrigérant (en particulier pour les transports aériens). En cas de prélèvement de liquides de reproduction, il faut en prélever autant que possible sur des femelles. Les échantillons de fluides mâles (liquide séminal) et femelles (liquide ovarien) doivent être transportés dans des contenants isolés hermétiques placés sur de la glace. Ne pas mélanger les échantillons de liquide séminal et ovarien.

Il faut adopter des procédures afin de garantir que les échantillons sont conservés séparément, de prévenir toute contamination croisée ou altération et d'éliminer les erreurs d'attribution des résultats des tests aux échantillons.

Il est recommandé de prendre les précautions suivantes pour assurer la continuité de la preuve :

- Étiqueter les échantillons immédiatement après leur prélèvement.
- Coder les étiquettes afin de garder un suivi de la date et de l'heure du prélèvement, du nom de l'installation, de l'espèce, de la taille ou du stade de vie, du type de l'installation ou de son numéro d'identification, du nom de l'agent qui a effectué le prélèvement et du numéro de l'échantillon.
- Conserver les dossiers remplis et indiquant la date et l'heure du prélèvement, le nom de l'installation, l'espèce, la taille ou le stade de vie, le type de l'installation ou son numéro d'identification, le nom de l'agent qui a effectué le prélèvement et le numéro de l'échantillon. Il est également possible d'utiliser le Formulaire de soumission d'échantillon en tant que continuité de la preuve. Le producteur et l'inspecteur de la santé du poisson (ou son représentant) doivent tous les deux signer les documents ou le Formulaire de soumission d'échantillon pour témoigner du prélèvement de l'échantillon.
- Conserver les échantillons dans des contenants hermétiques entre le moment de leur prélèvement et celui de leur arrivée au laboratoire.
- Transférer les échantillons et leur dossier ensemble lorsque les échantillons sont transmis d'une personne à une autre. Les deux personnes doivent signer les documents au moment d'un tel transfert.

Une personne autorisée du laboratoire récepteur doit signer les documents à l'arrivée des échantillons au laboratoire.

- Dans la mesure du possible, une personne autorisée de l'installation expéditrice doit signer le paquet envoyé de manière à ce que toute altération du paquet soit évidente pour le destinataire. À cette fin, il est possible d'appliquer un ruban adhésif transparent par-dessus la signature.
- Les codes des étiquettes utilisés dans le laboratoire devraient correspondre à ceux utilisés sur les échantillons prélevés sur place.
- Si les échantillons proviennent de plus d'une installation, ils doivent être conservés séparément en tout temps pendant leur transport et leur traitement au laboratoire. S'il n'est pas possible de respecter cette condition, l'échantillonnage d'une seule installation est autorisé.

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

### **Installations aquacoles au Canada**

#### **i) Installations terrestres utilisant de l'eau souterraine ou des réserves d'eau exempte de toute espèce de poisson**

- Une installation existante, pour laquelle l'état sanitaire des poissons n'est pas connu, doit faire l'objet de quatre inspections, conformément aux dispositions énoncées dans les lignes directrices générales, avant de recevoir un certificat de santé du poisson.
- Une nouvelle installation débutant ses opérations à l'aide de géniteurs provenant d'une ou plusieurs sources disposant d'un certificat de santé du poisson valide peut obtenir son certificat après une seule inspection satisfaisante. 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 d'une inspection annuelle satisfaisante pour assurer le maintien de son statut. Cependant, si l'installation s'est procurée des poissons auprès d'une source qui ne détient pas de certificat, elle devra faire l'objet de quatre inspections satisfaisantes consécutives, conformément aux lignes directrices générales, pour récupérer son certificat.

#### **ii) Installations terrestres utilisant de l'eau de surface**

- Une installation doit faire l'objet de quatre inspections satisfaisantes consécutives, conformément aux lignes directrices générales, pour obtenir un certificat de santé du poisson.
- Comme il n'est pas possible de maintenir avec certitude l'état sanitaire des installations utilisant de l'eau de surface non traitée entre les inspections, ces installations continueront de faire l'objet de deux inspections annuelles, effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours, pour conserver leur statut certifié.

#### **iii) Installations d'élevage en cage**

- Une installation doit faire l'objet de quatre inspections consécutives satisfaisantes, conformément aux lignes directrices générales, pour obtenir un certificat de santé du poisson.
- Comme il n'est pas possible de maintenir avec certitude l'état sanitaire des installations d'élevage en cage entre les inspections, ces installations continueront de faire l'objet de deux inspections annuelles,

effectuées à des intervalles d'au moins 90 jours et d'au plus 270 jours, pour conserver leur statut certifié.

#### **iv) Œufs de poissons sauvages**

- Un stock de géniteurs sauvages doit avoir fait l'objet de deux inspections annuelles consécutives 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 d'un certificat de santé du poisson**

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 visé à l'Annexe II, doit mettre en place un programme d'éradication de cet 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. Ces tests doivent être effectués 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 un permis de transport interprovincial 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 responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques. L'appel doit être présenté sous la forme d'une lettre au sous-ministre adjoint (SMA), secteur des sciences des écosystèmes et des océans, ministère des Pêches et des Océans, et être adressé à l'attention du responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques. La demande de révision doit être reçue 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 permis de transport interprovincial.

La demande de révision doit être accompagnée d'une copie de la demande initiale de permis de transport interprovincial et d'une copie des raisons données pour refuser le permis, 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 le permis de transport interprovincial 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 une copie de la demande de révision au directeur général régional du MPO intéressé et, si nécessaire, aux organismes provinciaux compétents, en leur demandant de transmettre par écrit leurs commentaires au comité de révision. Ces commentaires écrits doivent expliquer les raisons d'appuyer ou de rejeter l'appel et se fonder sur des données scientifiques. Ils doivent inclure également des références scientifiques revues par des pairs. Les commentaires doivent être envoyés au responsable du Registre national dans les 20 jours ouvrables suivant la réception de la demande de révision.

Le comité de révision est créé dans les 15 jours ouvrables suivant la réception de la demande de révision. Il est formé du responsable du Registre national et de trois personnes choisies par ce dernier. 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. Le comité de révision rédige un rapport, renfermant ses recommandations, qu'il communique au SMA. Le SMA rend une décision finale sur la délivrance d'un permis de transport interprovincial. 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 50 jours ouvrables suivant la création du comité. Quand des circonstances exceptionnelles le justifient, le comité peut solliciter du responsable du Registre national 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.

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 20 jours ouvrables, 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.

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 sur le rapport du comité de révision.

Le SMA rend une décision finale sur la délivrance d'un permis de transport interprovincial et communique, par écrit, cette décision et les raisons qui l'ont motivée dans les 30 jours ouvrables 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. 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, en jours ouvrables, pour les appels concernant une licence d'importation**

Mesure	Durée prévisible après l'envoi du refus de la licence
L'ALPSP envoie une lettre au demandeur l'avisant que sa demande d'importation d'œufs ou de poissons est rejetée.	Jour 0
Le demandeur envoie sa demande de révision au Registre national. Le responsable du Registre national transmet la demande de révision au DGR et aux organismes provinciaux si nécessaire.	Jour 30
Le Registre national crée le comité de révision.	Jour 45
Le directeur général régional du MPO et les organismes provinciaux compétents transmettent leurs commentaires au Registre national.	Jour 50
Le comité de révision communique au responsable du Registre national son rapport et ses recommandations au SMA. Le responsable du Registre national communique le rapport au demandeur.	Jour 95
Le demandeur présente au Registre national ses commentaires sur le rapport et les recommandations du comité de révision.	Jour 115
Le SMA présente par écrit au demandeur sa décision sur la demande de révision.	Jour 140

#### 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 au Canada permettant d'établir un diagnostic selon les méthodes mentionnées dans le présent guide et avoir reçu l'autorisation du gouvernement du Canada (annexe 3). Les personnes 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 leurs compétences en laboratoire. Elles devront aussi répondre à un questionnaire de connaissances sur le *Règlement sur la santé des poissons* et le Manuel de procédures; les réponses seront revues par le responsable du Registre national. Les candidats seront informés de la suite donnée à leur demande. L'autorisation d'agir à titre d'inspecteur sanitaire des poissons sera réévaluée par le Registre national de la santé des animaux aquatiques 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 telle 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 détient des intérêts financiers dans l'installation qu'il doit inspecter et où l'installation qu'il doit inspecter lui appartient ou lui a été confiée en gestion, ou appartient à un membre de sa famille ou a été confiée en gestion à un membre de sa famille. Un inspecteur sanitaire ne doit pas demander ou accepter de transferts d'avantages économiques, autres que le paiement des services rendus, qui compromettraient 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 ignorant délibérément les exigences en matière d'inspection ou des résultats d'inspection, il sera suspendu ou rayé de la liste des inspecteurs autorisés. Les mesures seront déterminées par le responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques, Pêches et Océans Canada, Ontario K1A 0E6.

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. Il doit 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), distribué de la façon suivante : un exemplaire au propriétaire ou au responsable; un exemplaire du certificat doit accompagner chaque demande de permis de transport interprovincial; un exemplaire au responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques; un exemplaire à l'inspecteur sanitaire des poissons.

L'inspecteur sanitaire des poissons doit examiner les licences d'importation délivrées par l'ACIA pour les importations de l'étranger. Il doit s'assurer que le dépistage des maladies non visées par le certificat de l'ACIA est effectué conformément à la norme décrite dans le présent guide. Dans le cas contraire, il doit modifier le statut du certificat de santé des poissons en conséquence et en informer le responsable du Registre national.

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.

Si les renseignements indiquant un changement du statut de l'installation ont été obtenus avant l'inspection prévue suivante, le certificat en vigueur doit être modifié de manière à refléter ce nouveau statut. Un certificat de santé du poisson modifié afin de refléter le changement du statut sanitaire a la même période de validité que le certificat initial.

De plus, les inspecteurs sanitaires des poissons doivent remplir en trois exemplaires un rapport de laboratoire sur l'état pathologique des poissons (annexe 5), en envoyer une copie au Registre national de la santé des

animaux aquatiques et au propriétaire ou au responsable de l'installation, laquelle sert de preuve d'inspection, et en garder une copie pour leur dossier.

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 : envoyer au producteur et au responsable du Registre national de la santé des animaux aquatiques une lettre indiquant les raisons de la révocation du certificat et les étapes nécessaires pour qu'un certificat soit de nouveau délivré.

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

Les agents locaux de protection de la santé du poisson (ALPSP), qui se trouvent dans chaque région du Canada, veillent à la mise en application du Règlement dans leur province ou leur territoire. 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 permis de transport interprovincial aux personnes qui en font la demande afin d'autoriser le passage d'envois acceptables de poissons vivants ou d'œufs transportés entre les provinces/territoires du Canada. Chaque envoi doit être accompagné d'un permis. Le présent guide ne prévoit pas l'utilisation d'un permis de transport interprovincial normalisé étant donné que les provinces ou les régions ont élaboré leurs propres permis en vue de répondre à leurs besoins particuliers.

Les agents pathogènes à déclarer mentionnés à l'annexe IV ne sont pas énumérés aux annexes II et III, mais sont considérés comme importants par 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 la circulation de ces agents pathogènes à déclarer ou d'autres organismes contaminant les poissons dans une région donnée.

Communiquer avec les agents locaux de protection de la santé du poisson, qui se trouvent dans les bureaux indiqués à l'annexe 2 ou avec le Registre national de la santé des animaux aquatiques pour obtenir des renseignements à jour sur une province, un territoire ou une région en particulier.

## VI. RÈGLES D'ÉCHANTILLONNAGE

### A. POISSON D'ÉLEVAGE

#### Échantillonnage par lot

Sauf indication contraire, l'échantillonnage des poissons se fait par lot. *Aux termes du RPSP, un lot de production se définit comme « des poissons de la même espèce se trouvant dans le même établissement aquacole, provenant de la même population de géniteurs et qui partagent la même source d'eau dans l'installation d'origine ou réceptrice ».* La même définition s'applique aux lots de stocks 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 les poissons en lots ou d'effectuer un échantillonnage à la grandeur de l'installation (selon les procédures décrites ci-après). L'échantillonnage par lot part du principe que tous les lots présentent la même probabilité d'infection (c'est-à-dire que l'on suppose que la probabilité d'infection par les pathogènes visés est la même pour chaque lot). Il faut donc échantillonner chaque lot.

#### Sélection des échantillons

##### *i) Poissons d'élevage*

Les poissons d'élevage comprennent tous les poissons sexuellement immatures élevés dans une installation. Un échantillon aléatoire de poissons prélevé dans une unité donnera un certain taux de probabilité d'obtenir au moins un spécimen infecté si la prévalence apparente (décelable) de l'infection dans la population atteint (ou dépasse) un niveau donné. Des tableaux des tailles d'échantillons nécessaires dans des populations de tailles différentes et de prévalences minimales supposées différentes de l'infection ont été publiés (Ossiander et Wedemeyer, 1973; Simon et Schill, 1984). Cependant, ces tableaux partent de l'hypothèse que les tests diagnostiques effectués pour déceler la maladie ont une sensibilité (proportion de poissons infectés présentant un résultat positif au test) et une spécificité diagnostique (proportion de poissons non infectés présentant un résultat négatif au test) parfaites (100 %). Les tailles d'échantillon indiquées dans le Tableau 2 intègrent l'erreur de diagnostic en utilisant la prévalence apparente (par opposition à la prévalence minimale supposée de l'infection décelable) pour détecter un ou plusieurs poissons infectés (ou malades) dans pratiquement toute inspection. Différents paramètres sont pris en compte afin qu'il soit facile de faire varier la taille de la population (N), la prévalence apparente (AP) (estimée en tant que mesure de la prévalence réelle et de la précision diagnostique présentée dans le Tableau 2) et la probabilité (CL) en fonction de chaque application. Par exemple, un échantillonnage visant à déceler des pathogènes très rares ou pour lesquels les méthodes de diagnostic disponibles ne sont pas assez sensibles, nécessiterait sans doute des paramètres plus restrictifs qu'un échantillonnage visant à déceler des pathogènes plus courants ou pour lesquels on dispose de méthodes de diagnostic sensibles.

Il est recommandé d'utiliser une probabilité minimale de 95 % et une prévalence apparente de 5 % au plus ( $n=58^1$  pour une taille de la population  $>40\ 000$ ) pour établir la taille de l'échantillon (n) par lot requise pour déceler au moins un poisson présentant un résultat positif au test. Il est possible d'utiliser des paramètres moins restrictifs si cette décision est appuyée par des données scientifiques pertinentes, une surveillance

---

<sup>1</sup> peut être arrondi à 60 comme dans le Code de l'OIE et la plupart des manuels de référence sur l'échantillonnage dans un souci de commodité et d'uniformité internationale. Donc toujours arrondi à 60 dans l'ensemble des présentes lignes directrices.

sanitaire des poissons ou les données de la certification (concernant la précision du système de test diagnostic utilisé et de l'estimation de la prévalence réelle, respectivement). Cette indication doit figurer sur le rapport du laboratoire et être jointe au certificat de santé du poisson. Lorsque l'échantillon est prélevé dans 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 de disponibles.

Tableau 2 : Taille de l'échantillon (n) requise pour déceler un ou plusieurs spécimens infectés dans des populations (lots) dont on présume que le taux minimum d'infection décelable est de 5 et 10 %. Les calculs sont basés sur une probabilité de 95 %. Pour les tailles de population (N) intermédiaires, utiliser la taille d'échantillon indiquée sur la ligne suivante (Ossiander et Wemeyer 1973).

Nombre de poissons à échantillonner pour une prévalence supposée de 5 ou 10 % de l'infection décelable.		
Taille de la population N=	Prévalence supposée de 5 % n=	Prévalence supposée de 10 % n=
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

## ii) Géniteurs

Géniteurs (poissons arrivés à maturité sexuelle qui servent à la reproduction) : il faut viser la même sensibilité pour la détection des individus infectés. 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 %<sup>2</sup> 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 infecté dans un lot dont on 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.

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, notamment 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.

<sup>2</sup> L'échantillonnage légal de seulement 10 % de tous les géniteurs ne correspond pas aux taux d'échantillonnage exposés dans le Tableau 1 : cet échantillonnage vise à conserver des populations petites mais intéressantes de géniteurs qui peuvent se reproduire à nouveau.

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. Il faut notamment recueillir et conserver d'autres tissus afin de faire confirmer les résultats par culture cellulaire et biologie moléculaire dans des laboratoires de référence.

Lorsqu'il faut traiter des échantillons de poissons ou de leurs tissus en groupes plutôt qu'individuellement comme dans le cas des analyses virologiques, il faut prendre soin de traiter séparément les poissons d'apparence saine des spécimens moribonds ou récemment morts. Veuillez vous reporter à l'annexe 1 pour obtenir des exemples de tailles d'échantillon pour différents scénarios.

L'échantillonnage par installation vise à donner la flexibilité nécessaire pour l'échantillonnage des exploitations piscicoles lorsque cette méthode s'est avérée justifiée. Il peut se substituer à l'échantillonnage par lot lorsque les deux conditions suivantes sont remplies :

1. On dispose d'un grand nombre de petits lots de poissons intéressants ou une installation dispose d'un grand nombre de lots de poissons;
2. Le certificat de santé du poisson en vigueur détenu par l'installation indique que cette dernière est exempte d'agents visés à l'annexe II.

Lorsqu'un inspecteur sanitaire des poissons détermine qu'une exploitation piscicole doit être échantillonnée selon la méthode d'échantillonnage par installation, il doit demander l'autorisation de le faire en suivant un processus anticipé coordonné par le Registre national. Cette indication doit figurer sur le rapport du laboratoire et être jointe au certificat de santé du poisson. Voir les exemples de méthodes d'échantillonnage par installation donnés à l'annexe 6.

### **Taille des échantillons pour le dépistage de virus**

- a. Poissons d'élevage (non reproducteurs) : le nombre d'échantillons à prélever est celui qui offre une probabilité de 95 % de détecter un spécimen infecté dans un lot, en supposant que le taux d'infection détectable est de 5 % au minimum.
- b. Géniteurs (poissons arrivés à maturité sexuelle qui servent à la reproduction) : il faut viser la même sensibilité pour la détection des individus infectés. 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 % 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 détecter un poisson infecté dans un lot dont on présume que le taux d'infection détectable 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.

L'échantillonnage légal de seulement 10 % de tous les géniteurs ne correspond pas aux taux d'échantillonnage exposés dans le Tableau 2 : cet échantillonnage vise à conserver des populations petites mais intéressantes de géniteurs qui peuvent se reproduire à nouveau.

### 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 infecté dans un lot en supposant que le taux d'infection décelable est de 5 % au minimum. Pour les 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.
- b. Les géniteurs doivent être échantillonnés pour la présence de bactéries conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage virologique légal de cette catégorie (voir VI.A.iib).

### 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 % de déceler un poisson infecté 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 lorsqu'on observe des taux de mortalité ou des symptômes de maladies inhabituels et inexplicables.

- b. Les géniteurs doivent être échantillonnés conformément à la taille déjà établie pour l'échantillonnage virologique légal de cette catégorie (voir VI.A.iib).

### Périodes et fréquence d'échantillonnage

- a. Poissons d'élevage : L'échantillonnage doit se faire conformément à la partie B - EXIGENCES RELATIVES À L'OBTENTION D'UN CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON, les périodes et la fréquence de l'échantillonnage dépendant des conditions locales et étant déterminées par l'inspecteur sanitaire des poissons. La détection de *M. cerebralis* et de certains virus étant plus facile lorsque les poissons ont un certain âge, les périodes d'échantillonnage recommandées 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.iib).

## **B. POISSONS SAUVAGES**

### **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 infecté dans tous les poissons capturés en supposant que le taux d'infection est de 5 % au minimum. Ces taux d'échantillonnage s'appliquent aux divers agents pathogènes (virus, bactéries et myxosporidies) cités plus tôt. C'est à l'inspecteur sanitaire des poissons qu'il revient de décider quel sera le nombre de poissons sauvages à échantillonner.

### **Poissons arrivés à maturité sexuelle**

S'il faut recueillir des géniteurs sauvages ou leurs œufs fécondés, il importe de prélever du liquide séminal et ovarien sur 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 poissons. Pour les espèces qui se reproduisent plusieurs fois, 10 % de tous les géniteurs utilisés 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. ŒUFS 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 LES SALMONIDÉS**

L'inspecteur sanitaire des poissons doit échantillonner les autres espèces n'appartenant pas à la famille des Salmonidés et se trouvant dans la même installation que les espèces de Salmonidés pour déceler la présence des agents pathogènes énumérés aux annexes II ou III.

## **VII. TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS**

Les échantillons de poissons 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 doivent être transportés dans des sacs en 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 mis dans des sacs en plastique hermétiques (séparer les poissons morts ou moribonds 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 transportés dans un contenant isolé sur de la glace. Ne pas mélanger les échantillons de liquide séminal et ovarien. Pour les restrictions de regroupement, voir X.B.4b et X.C.

## VIII. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

### A. TECHNIQUE D'AUTOPSIE

#### Généralités

La technique décrite ci-dessous a été mise au point dans le but de faciliter l'analyse d'un grand nombre de poissons en vue de déceler la présence des agents pathogènes indiqués. Sauf dans le cas de très petits spécimens, le même poisson servira de source de tissus pour les diverses analyses bactériologiques ou 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 de l'érosion des opercules, des nageoires et du pédoncule caudal. Inoculer les milieux appropriés et préparer des frottis colorés (si nécessaire) avec les tissus provenant de ces lésions. Il est aussi possible de prélever des tissus des zones présentant des lésions en vue de futurs tests histologiques.

#### 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 (si nécessaire) avec les tissus des organes anormaux. Il est aussi possible de prélever des tissus des zones présentant des lésions en vue de futurs tests histologiques. Enlever les tissus devant servir aux analyses virologiques et à la recherche de myxosporidies.

### B. DESTRUCTION DES ÉCHANTILLONS

Le laboratoire d'expertise doit manipuler et jeter les échantillons et tous les autres matériels susceptibles d'être infectés 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 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)

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 anguillarum*)

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), 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 l'inspecteur sanitaire des poissons et le client. L'inspecteur sanitaire des poissons peut choisir d'effectuer l'examen diagnostique lui-même ou de préparer les lames pour les faire examiner par d'autres spécialistes. Il faut informer les clients qu'ils doivent préciser *avant chaque inspection* s'ils ont ou non besoin d'un dépistage complet de la maladie bactérienne du rein (c.-à-d. d'un 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 aux annexes 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 dans des lots où il y a une prévalence inhabituellement élevée de signes de maladies et/ou de mortalité. Pour les 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).

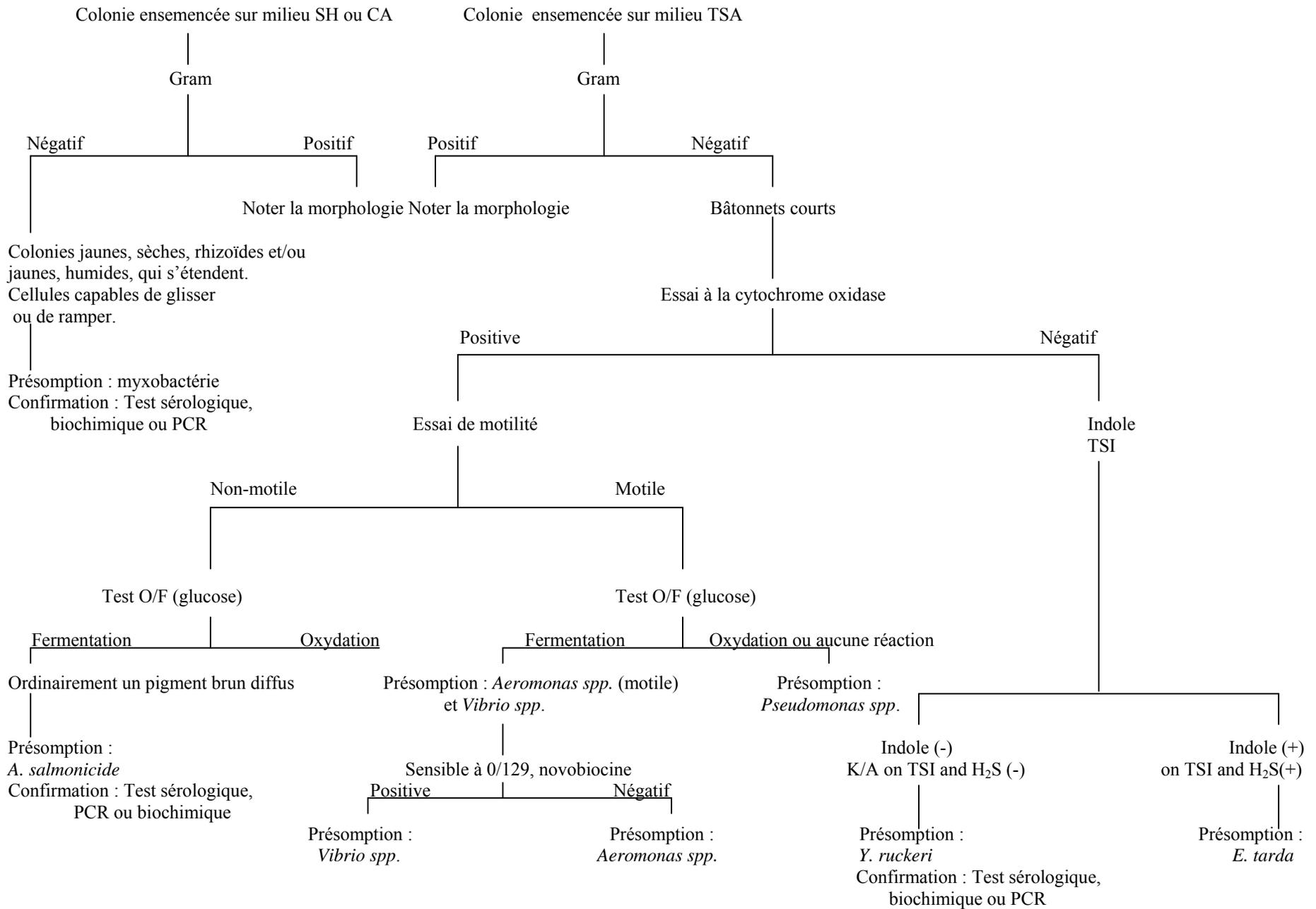
1. Prélever en conditions aseptiques les tissus suivants et les ensemercer par stries sur le milieu approprié :
  - a. tissu rénal, prélevé de préférence sur des parties qui semblent anormales, et tissus de lésions externes et internes : sur la gélose trypticase – soya (TSA);
  - b. tissu de branchies ou 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. La présence fréquente de petits diplobacilles Gram positif à l'intérieur des cellules fait 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 H<sup>2</sup>S-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 H<sup>2</sup>S 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).

La figure suivante représente le graphique de cheminement de ces méthodes : elle 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 présomption. Voir IX.C.2g pour les exceptions. Les tests sérologiques ou biochimiques ou moléculaires doivent servir d'essais de confirmation; les tests sérologiques et biochimiques à utiliser sont décrits dans la partie IXC 2.

Pour les agents à déclarer, c'est l'inspecteur sanitaire des poissons qui décide des essais de confirmation à effectuer. L'identification doit se baser sur l'association ou non de l'agent pathogène à des pertes importantes ou à une pathologie macroscopique.



**Différenciation des bactéries isolées à partir de poissons sur milieu TSA, SH ou CA**

## C. MATÉRIELS<sup>3</sup> et MÉTHODES

### 1. Milieux de culture pour isolement

a. Gélose trypticase – soja (Difco)

b. Gélose SH (Shieh, 1980)

Gélose	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. On peut ajouter de la néomycine (5µg/ml) et de la polymyxine B (10 unités/ml) 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

### 2. Milieux d'identification, réactifs, méthodes

a. **Test à la cytochrome – oxydase :** 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 le papier devient bleu clair en moins d'une minute. (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 ne sont pas probants, 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).

<sup>3</sup> 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.

- c. **Différenciation 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 décrites par MacFaddin (1980).
- f. **Test de confirmation de la présence d'*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, prélever de l'antisérum et le déposer près de la suspension bactérienne puis réaliser le mélange en penchant la lame et en la faisant osciller. Préparer les témoins positifs et négatifs appropriés. Un 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 celles du témoin négatif). Une agglutination du témoin négatif annule l'essai. Un grand nombre de souches d'*A. salmonicida* s'autoagglutinent. Pour empêcher cette autoagglutination, 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 de confirmation 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 (facultatif), 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 typiques constitue un test positif.
- h. **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.
- i. **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 incubé 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, API-20E). Lorsqu'on confirme par présomption des isolats identifiés d'*Y. ruckeri*, il est recommandé 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); pour *Y. ruckeri*, consulter l'article de Stevenson et Daly (1982).
- j. **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 (5µg) (Difco) sur un milieu dont la surface a été uniformémentensemencée 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. On peut obtenir l'agent vibriostatique 0/129 (diamino-2, 4 diisopropyl-6, 7 pteridine) auprès d'Oxoid Inc. au Canada. Inclure un disque

témoin imprégné seulement d'acétone pour empêcher une réaction inhibitrice possible due à l'acétone.

k. **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.

l. **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 selon des techniques classiques. Utiliser des sérums normalisés, préférablement absorbés et appropriés pour le but visé. Inclure les organismes témoins positifs et négatifs.

m. **Tests moléculaires de confirmation :** La confirmation de l'identité des bactéries par des tests moléculaires tels que les PCR doit être effectuée selon des techniques classiques. Inclure les organismes témoins positifs et négatifs.

La méthode approuvée pour déceler des virus est basée sur l'isolement suivi d'une identification biochimique ou sérologique ou d'une détection moléculaire.

## **X. TECHNIQUES DE DÉTECTION DES VIRUS**

### **A. PORTÉE**

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 ou des techniques moléculaires, 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. Examiner toute lésion proliférative anormale (tumeur) rencontrée selon des méthodes histologiques et signaler les résultats de l'évaluation histologique.

### **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 et 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).
  - 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 qu'il faut utiliser des liquides de reproduction, prélever autant d'échantillons de liquide de reproduction que possible sur 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) et des poissons moribonds ou morts (ou leurs tissus.) Dans la mesure du possible, combiner des poissons de la même catégorie de taille.

## D. PRÉPARATION DES INOCULA

Les échantillons doivent être analysés en deçà de 72 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 : Peser et homogénéiser les tissus dans un volume minimal de solution saline équilibrée (SSE), comme une SSE de Earle ou de Hanks, dont le pH est de 7,6 à 7,8. Il existe trois 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. Faire attention et 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 le matériel utilisé entre chaque utilisation pour homogénéiser des échantillons regroupés si ceux-ci proviennent du 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

### 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 visés, susceptibles de causer des effets cytopathologiques dans les lignées cellulaires de poisson, on peut utiliser des lignées cellulaires qui sont scientifiquement acceptées ou prescrites dans le manuel diagnostique des maladies des animaux aquatiques de l'Office international des épizooties (OIE). Il est possible d'utiliser d'autres lignées cellulaires si nécessaire.

Deux fois l'an ou avant chaque saison d'inspection, toutes les cultures cellulaires en stock doivent être analysées et trouvées exemptes de mycoplasme. Il faut également analyser chaque type de cellule pour établir sa sensibilité aux virus enzootiques dans 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 reporter au manuel diagnostique des maladies des animaux aquatiques de l'OIE.

**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 un pH de 7,6 à 7,8, contenant des 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 et stérilisé dans chaque puits.
  - v) Incuber les cultures cellulaires inoculées à 15 ° C pendant 60 à 90 minutes. 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.

**Témoins**

Pour chaque lot de cultures cellulaire donatrices, préparer en double des témoins négatifs. Les témoins 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. Des témoins positifs peuvent être utilisés s'ils sont disponibles.

### **Marche à suivre au cours de l'incubation**

- a. Examiner les cultures peu de temps après l'inoculation et après 24 heures. Par la suite, examiner les cultures au moins chaque jour 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, vérifier si un agent de répllication 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 de nouvelles cultures, préparées en double, de la même lignée cellulaire. Si des ECP sont encore observés, effectuer l'épreuve de séroneutralisation ou un test moléculaire. Si l'inspecteur sanitaire des poissons a des raisons de soupçonner la présence d'un virus précis, il peut demander un test moléculaire de la culture cellulaire initiale. Il faut cependant être prudent et n'effectuer cette procédure que si le test moléculaire a été validé et est suffisamment sensible pour déceler le virus visé dans une culture cellulaire initiale. Il convient de noter que le test moléculaire ne remplace pas une sous-culture. Si le test moléculaire de la culture initiale donne un résultat négatif mais que la sous-culture est positive, il faut effectuer une séroneutralisation ou un test moléculaire de la sous-culture.

## **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 ou selon l'une des autres méthodes de confirmation approuvées décrites dans la partie G, ou encore par détection par biologie moléculaire. 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 contenant 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 µm de diamètre. Diluer le filtrat à  $10^{-2}$  et  $10^{-6}$  avec de la SSE stérile.
- c. (1) Mélanger 0,3 ml de l'antisérum avec 0,3 ml de chacune des dilutions de l'échantillon.  
(2) Mélanger 0,3 ml de sérum normal avec 0,3 ml de chacune des dilutions de l'échantillon.  
(3) 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. DÉTECTION MOLÉCULAIRE - PCR**

Il est possible d'identifier un agent viral à l'aide d'une méthode de détection moléculaire avec réaction en chaîne polymérase (PCR). Les techniques moléculaires doivent avoir été validées ou suivre les procédures décrites pour différents virus dans le manuel diagnostique des maladies des animaux aquatiques de l'OIE. Après la PCR, un séquençage de l'ADN peut aussi permettre de déterminer la souche dans le cas de virus connus. Il peut également servir à déterminer la taxonomie de nouveaux types de virus.

## **H. AUTRES MÉTHODES DE CONFIRMATION**

La méthode approuvée pour déceler des virus est basée sur l'isolement suivi d'une identification sérologique ou d'une détection moléculaire. 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, comme 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. PORTÉE

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.

Il n'est ni rentable, ni justifiable biologiquement de continuer à rechercher des preuves de la présence de *Ceratomyxa shasta* dans les poissons qui n'affichent aucun signe clinique de maladie (jusqu'à présent, ce parasite n'a jamais été décelé au Canada à l'est des Rocheuses). Il n'est pas 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 *C. shasta*, cocher la case « Non décelé » sur le Certificat de santé du poisson. Ne pas cocher la case « Non analysé » en cas de dépistage visuel.

Si un client demande un dépistage de *C. shasta* pour des motifs autres ou plus impératifs que la certification aux termes du RPSP, il est encore possible de le faire dans le cadre d'une entente entre l'inspecteur sanitaire des poissons et le client. L'inspecteur sanitaire des poissons peut choisir d'effectuer l'examen diagnostique lui-même ou de préparer les lames pour les faire examiner par d'autres spécialistes. Il faut informer les clients qu'ils doivent préciser *avant chaque inspection* s'ils ont ou non besoin d'un dépistage complet de *C. shasta* (c.-à-d. d'un examen des frottis intestinaux), pour leur éviter d'avoir à abattre d'autres poissons pour effectuer un dépistage à une date ultérieure.

### 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. Nettoyer avec soin toute la verrerie et l'équipement utilisés durant le traitement des échantillons pour éviter la propagation de spores.
2. Décapiter le poisson et enlever la chair de la tête après l'avoir fait chauffer dans de l'eau à 45 – 50 ° C jusqu'à coagulation du cerveau. Enlever le cerveau (et toute la 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 digestion<sup>4</sup>
    - i) Rassembler environ 100 g du tissu crânien obtenu et broyer finement. La petite taille des fragments facilitera une digestion complète et rapide.

---

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

- ii) Placer dans un bêcher et ajouter 25 ml de solution de pepsine fraîchement préparée (1,0 g de pepsine dissoute dans 100 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 demie 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.
- 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, le rincer 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 pas diluer plus 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 présentes.
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 déceler 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 sur les intestins. De plus, s'il y a des lésions nodulaires dans un des tissus ou 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. En cas de lésions nodulaires sur un tissu ou à l'intérieur, en particulier sur les caecums pyloriques, ou en présence d'une accumulation anormale de liquide, les examiner pour établir la présence de spores de *C. shasta*.
5. Pour chaque frottis ou préparation humide, il faut examiner au moins 25 champs microscopiques pour établir la présence de spores de *C. shasta*.

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 dernières; 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 déceler des spores caractéristiques (Noble, 1950; Yamamoto et Sanders, 1979).

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

## **XII. TECHNIQUES DE DÉSINFECTION DES ŒUFS**

La transmission d'agents pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites) peut s'opérer à l'occasion du transfert d'œufs de poissons infectés, par la présence d'agents pathogènes sur la surface de l'œuf ou dans l'eau contenant les œufs. La désinfection des œufs réalisée en appliquant un produit chimique dans l'eau permettra de réduire la charge en agents pathogènes à la surface de l'œuf et dans l'eau. En général, la désinfection chimique des œufs n'affectera pas les agents pathogènes présents dans les tissus des œufs. La désinfection des œufs n'est efficace que lorsque la désinfection chimique est combinée à un programme de biosécurité complet incluant d'une part, l'utilisation d'une source d'eau propre pour rincer et conserver les œufs et l'utilisation d'équipement propre et désinfecté, de l'autre la constitution et le maintien d'un stock de géniteurs sains.

Il existe plusieurs procédés et techniques pour se procurer de l'eau propre pratiquement exempte de pathogènes; leur description n'entre pas dans le cadre du présent document.

La technique de désinfection des œufs présentée ici vise à réduire le risque de transfert des pathogènes présents à la surface des œufs ou dans l'eau qui les contient; d'autres programmes de biosécurité relevant du RPSP ou des installations contribuent à limiter le risque que des pathogènes ne s'établissent à l'intérieur (et à l'extérieur) des œufs.

Ce n'est qu'après le gonflement d'eau qui suit la fécondation ou au tout début de la formation de l'embryon que l'on procède à la désinfection en surface des œufs de Salmonidés. On trouvera ci-après la méthode proposée pour désinfecter les œufs en surface, qui fait appel à des iodophores. Les iodophores sont parmi les désinfectants les plus efficaces des œufs; ils tuent efficacement les pathogènes tout en minimisant la toxicité pour les œufs et le personnel manipulant l'équipement. 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 désinfectants de ce type sont disponibles dans le commerce en Amérique du Nord, mais seuls Ovadine®, et Parasite-S sont enregistrés pour la désinfection des œufs de poisson au Canada. Ces produits possèdent une identification numérique de la drogue (DIN) indiquant le statut de leur enregistrement. Les instructions décrivant le mode d'emploi correct figurent sur les étiquettes des produits. Certains composés d'iodophores (autre l'Ovadine®) possèdent une DIN, mais la désinfection des œufs ou des œufs de poissons ne figure pas dans les utilisations indiquées sur leurs étiquettes (Wescodyne® par exemple). D'autres composés utilisés pour la désinfection chimique des œufs peuvent avoir la même efficacité que l'Ovadine®, mais nécessitent une ordonnance vétérinaire.

Voici un résumé d'une partie des instructions figurant sur l'étiquette de l'Ovadine®, ainsi que d'autres renseignements :

### **A. PRÉPARATION DU DÉSINFECTANT**

1. Veuillez lire les instructions complètes figurant sur l'étiquette de l'Ovadine®, y compris le mode d'emploi, les avertissements et les mises en garde.

2. Diluer la solution d'Ovadine® (10 % de povidone-iodé ou 1 % d'iode mobilisable) de manière à obtenir une solution contenant 100 parties par million (ppm) d'iode mobilisable. À cette fin, mélanger 10 ml d'Ovadine® par litre d'eau propre. 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.

3. Vérifier le pH du désinfectant dilué et, si nécessaire, l'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 les œufs récemment gonflés dans l'eau ou les œufs embryonnés dans le désinfectant pendant 10 minutes.

5. Traiter environ 2 000 œufs 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 afin d'éviter toute contamination des œufs ou toute exposition accidentelle du personnel aux iodophores.

## BIBLIOGRAPHIE

- Amandi, A., S.F. Hiu, J.S. Rohovec and J.L. Fryer. 1982. Isolation and characterization 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*. I. *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, 3<sup>rd</sup> 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 *Myxosoma 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, 2<sup>nd</sup> 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.
- McDaniel, D. 1979. Fish Health Bluebook: procedures for the detection and identification of certain fish pathogens. Fish. Health. 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.
- OIE Aquatic Animal Health Standards Commission. 2011. OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.
- Ossiander, F.J. and G. Wedemeyer. 1973. Computer program for sample sizes required to determine disease incidence in fish populations. *J. 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.
- 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.
- Simon R.C and B. S. Schill 1984. Table of sample size requirements for detection of fish infected by pathogens: three confidence levels for different prevalence and various populations sizes. *J. FishDis.* 7 (6 ): 515-520.
- 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.
- Yamamoto, T. and J.E. Sanders. 1979. Light and electron microscopic observations of sporogenesis in the myxosporidium, *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 diffuser l'information concernant les maladies des poissons décrites dans le *Règlement sur la protection de la santé des poissons* au Canada. Les inspecteurs sanitaires du poisson doivent 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'échantillonnages périodiques réguliers.

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

1. diriger, en liaison avec l'ACIA, les opérations dans les cas d'urgences nationales touchant à la santé des poissons;
2. fournir les antécédents sanitaires des sources de poissons vivants et d'œufs;
3. maintenir et fournir les listes des établissements canadiens autorisés à faire l'élevage du poisson en vertu du RPSP;
4. maintenir et fournir les listes des inspecteurs sanitaires des poissons et des agents locaux de protection de la santé du poisson autorisés par le ministre.

L'adresse du Registre national est la suivante :

Registre national de la santé des animaux aquatiques

Pêches et Océans Canada

Ottawa (Ontario) Canada

K1A 0E6

Tél. : 613-949-7522 Téléc. : 613-993-7665 Courriel : [nrfd@dfo-mpo.gc.ca](mailto:nrfd@dfo-mpo.gc.ca)

## ANNEXE 2

### ADMINISTRATIONS RÉGIONALES

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, ce sont les organismes provinciaux qui 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 Fisheries Management Branch Sustainable Resource Development 6909 – 116 <sup>th</sup> Street Edmonton AB T6H 4P2	Tél. : 780-427-8288
MANITOBA	Gestion des ressources hydriques Manitoba Case postale 20 200 Sauleaux Crescent Winnipeg MN R3J 3W3	Tél. : 204-945-7789
ONTARIO	Ministère des Richesses naturelles (Ontario) Direction de la pêche et de la faune 300, rue Water Peterborough ON K9J 8M5	Tél. : 705-755-1928
QUÉBEC	Direction du développement de la faune Société de la faune et des parcs du Québec Édifice Marie-Guyart, 11 <sup>e</sup> étage, boîte 92 675, boul. René-Levesque Est Québec (Québec) G1R 5V7	Tél. : 418-521-3875 poste 4496
SASKATCHEWAN	Saskatchewan Ministry of Environment Fish and Wildlife Branch 3211 Albert Street, 2 <sup>nd</sup> Floor Regina SK S4X 5W6	Tél. : 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 (Manitoba) R3T 2N6	Tél. : 204-983-0607
TERRE-NEUVE	Pêches et Océans Canada Bureau régional de Terre-Neuve C.P. 5667 St. John's (Terre-Neuve) A1C 5X1	Tél. : 709-772-2891
TERRITOIRES DU NORD- OUEST	Pêches et Océans Canada 42043 MacKenzie Hwy Hay River NWT X0E 0R9	Tél. : 867-874-5575
NOUVEAU-BRUNSWICK NOUVELLE-ÉCOSSE ÎLE-DU-PRINCE-ÉDOUARD	Pêches et Océans Canada Région du Golfe C.P. 5030 Moncton, NB E1C 9B6	Tél. : 506-851-3107
YUKON ET RÉGIONS MARITIMES DE LA COLOMBIE-BRITANNIQUE	Pêches et Océans Canada Station biologique du Pacifique 3190 Hammond Bay Road Nanaimo BC V9T 6N7	Tél. : 250-756-7072

## **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 sa demande d'autorisation comme inspecteur sanitaire des poissons soit étudiée, un candidat doit soumettre au responsable du 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 répondre à un questionnaire de connaissances.

## **ANNEXE 4**

### **CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON**

Le certificat de santé du poisson a été révisé.



Fisheries  
and Oceans

Pêches  
et Océans

N°  
\_\_\_\_\_

## CERTIFICAT DE SANTÉ DU POISSON

Œufs seulement  Œufs 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"/>
Autres agents pathogènes (préciser si possible) _____			

Remarques :

**Dates des quatre dernières inspections : (utiliser le format JJ/MM/AAAA)**

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Date de délivrance :      Signature de l'inspecteur sanitaire des poissons      Affiliation 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 \_\_\_\_\_ (JJ/MM/AAAA) selon la première des deux éventualités.

## DÉCLARATION DE L'INSTALLATION SOURCE

Je, \_\_\_\_\_,  propriétaire  directeur de l'installation susmentionnée dont la dernière inspection remonte au \_\_\_\_\_ (JJ/MM/AAAA) 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 œuf 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 œufs expédiés subiront une désinfection en surface avant de quitter la source.

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

**Le présent envoi se compose de :**

\_\_\_\_\_ kg       Vivants       Œufs      Espèce : \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Nombre       Morts       Poissons      Espèce : \_\_\_\_\_

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

## RENSEIGNEMENTS SUR L'INSTALLATION DESTINATAIRE

Ville et province d'origine \_\_\_\_\_ Transporteur \_\_\_\_\_  
 Mode de transport (aérien/terrestre/maritime) \_\_\_\_\_ Site récepteur \_\_\_\_\_  
 Point d'arrivée prévu dans la province (ville et province) \_\_\_\_\_ Dates d'envoi \_\_\_\_\_ (JJ/MM/AAAA)

Signature et adresse du destinataire \_\_\_\_\_ Date (JJ/MM/AAAA) \_\_\_\_\_ N° de téléphone/N° de télécopieur \_\_\_\_\_



### ANNEXE 5

## **RAPPORT DE LABORATOIRE SUR L'ÉTAT PATHOLOGIQUE DES POISSONS**

Le formulaire de rapport a été 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 permis de transport interprovincial. 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 permis de transport interprovincial 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	Ombre chevalier ( <i>Salvelinus alpinus</i> )
OA	Ombre arctique ( <i>Thymallus arcticus</i> )
SA	Saumon atlantique ( <i>Salmo salar</i> )
OF	Ombre 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, indiquer l'âge en chiffres arabes suivis de « mois »; pour les poissons de plus d'un an, indiquer 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 utilisé).

### 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 masou

VAIS	Virus de l'anémie infectieuse du saumon
AARF	Autre agent de répliation filtrable
As	<i>Aeromonas salmonicida</i> Yr <i>Yersinia ruckeri</i>
Rs	<i>Renibacterium salmoninarum</i>
Mc	<i>Myxobolus cerebralis</i>
Cs	<i>Ceratomyxa shasta</i>

### A. 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 (*Ephelioma 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)

### B. 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 : \_\_\_\_\_

## Annexe 6

### Scénario 1

**Échantillonnage d'intensité égale.** Pour un lot donné, on ne recommande l'échantillonnage d'intensité égale que dans les cas où l'on suppose que toutes les unités du lot présentent la même probabilité d'être infectées. Si l'on ne dispose pas de cette information, pour avoir la plus grande probabilité de détecter les poissons contaminés dans l'installation, il faut partir de l'hypothèse que tous les groupes ont la même probabilité d'être infectés. Dans ce cas, la meilleure méthode d'échantillonnage consiste à échantillonner chaque groupe/unité avec la même intensité (c'est-à-dire de prendre des échantillons de la même taille).

Pour chaque lot prélevé dans deux unités ou plus, il faut sélectionner des nombres sensiblement égaux de poissons dans chaque unité.

Par exemple, si une installation est composée des unités de maintiens suivants :

N ° d'ident. du lot	Espèce	Nbre de poissons	catégorie d'âge
1	Saumon coho	250	géniteurs (espèces qui ne se reproduit qu'une fois)
1	Saumon coho	35 000	17 mois
1	Saumon coho	40 000	3 mois
1	Saumon coho	47000	7 mois

Pour une probabilité de 95 % et une prévalence apparente d'environ 5 % (et une population > 40 000 individus), il faut échantillonner 60 poissons pour chaque lot de production et de géniteurs. Pour le lot 1, il faut donc échantillonner 52 géniteurs coho (prélever des échantillons de tissus sur tous les poissons). Pour le lot 2, il faut échantillonner 60 saumons coho : vingt (20) âgés de 17 mois, 20 âgés de 3 mois et 20 âgés de 7 mois. *Pour les installations détenant plus d'une espèce, il faut répéter le même processus pour chaque espèce.*

### Scénario 2

**Échantillonnage en fonction de l'âge.** On suppose, d'après les données disponibles, qu'une catégorie d'âge donnée (lorsqu'un lot porte sur plus d'une unité et que les unités sont représentatives des catégories d'âge) présente une plus grande probabilité d'infection par le ou les agents pathogènes visés (par exemple, pour les virus, les géniteurs et les alevins sont les individus qui risquent le plus d'être contaminés par le virus en question. Pour d'autres pathogènes comme *Myxobolus cerebralis*, ce sont les poissons qui ont atteint la moitié de leur vie qui seront probablement les plus utiles.) Il faut échantillonner ces unités en fonction de leur probabilité d'infection.

Par exemple, si une installation est composée des unités de maintiens suivants :

N ° d'ident. du lot	Espèce	Nbre de poissons	catégorie d'âge
1	Truite arc-en-ciel	280	géniteurs (espèce qui se reproduit plusieurs fois)
2	Truite arc-en-ciel	35 000	10 mois
2	Truite arc-en-ciel	40 000	3 mois
2	Truite arc-en-ciel	47 000	17 mois

Pour une probabilité de 95 % et une prévalence apparente d'environ 5 % (et une population > 40 000 individus), il faut échantillonner 60 poissons pour chaque lot de production, en supposant que pour les pathogènes visés, les données scientifiques montrent que les poissons d'élevage plus jeunes présentent un risque plus élevé d'infection (toutes les autres sources de risque étant considérées comme égales). Pour le lot 1, il faut échantillonner 28 géniteurs (10 % de la population, 30 au maximum) plus 27 échantillons de liquides de reproduction (pour équilibrer les échantillons, il faut en prélever 55 au total compte tenu de la taille du lot, comprise entre 250 et 500 poissons, conformément au Tableau 2). Pour le lot 2, il faut prélever 60 poissons âgés de 3 mois, 0 âgés de 17 mois et de 10 mois (l'échantillonnage des poissons d'élevage doit viser de préférence les individus de moins de 9 mois). *Pour les installations détenant plus d'une espèce, il faut répéter le même processus pour chaque espèce.*

### Scénario 3

**Échantillonnage proportionnel à la taille du groupe.** On suppose, à partir des données disponibles, que plus le groupe est grand, plus grande est la probabilité d'infection par la ou les maladies visées (les poissons sont échantillonnés comme dans le scénario 2, mais la stratification est faite en fonction de la taille du groupe et non de la catégorie d'âge).

Par exemple, si une installation est composée des unités de maintiens suivants :

N ° d'ident. du lot	Espèce	Nbre de poissons	catégorie d'âge
1	Saumon atlantique	280	géniteurs (espèces qui ne se reproduit qu'une fois)
2	Saumon atlantique	25 000	10 mois
2	Saumon atlantique	60 000	3 mois
2	Saumon atlantique	135 000	17 mois

Pour une probabilité de 95 % et une prévalence apparente d'environ 5 % (et une population > 40 000 individus), il faut échantillonner 60 poissons pour chaque lot de production. On suppose que pour les pathogènes visés, les données scientifiques montrent que les poissons d'élevage plus jeunes présentent un risque plus élevé d'infection (toutes les autres sources de risque étant considérées comme égales). Pour le lot 1, il faut échantillonner 28 géniteurs (10 % de la population, 30 au maximum) plus 27 échantillons de liquides de reproduction (pour équilibrer les échantillons, il faut en prélever 55 au total compte tenu de la taille du lot, comprise entre 250 et 500 poissons, conformément au Tableau 2). Pour le lot 2, il faut prélever 60 poissons âgés de 17 mois et 0 âgés de 3 et de 10 mois. *Pour les installations détenant plus d'une espèce, il faut répéter le même processus pour chaque espèce.*

### ÉCHANTILLONNAGE PAR INSTALLATION

Dans le système d'échantillonnage proposé, on prélève une taille d'échantillon de "n" poissons lors de chaque inspection de l'installation (à noter qu'il n'est pas nécessaire de prélever en même temps tous les poissons requis pour obtenir la taille d'échantillon recommandée). Sauf indication contraire tirée des données disponibles, pour avoir la plus grande probabilité de déceler les poissons contaminés dans l'installation, il faut partir de l'hypothèse que tous les groupes présentent la même probabilité d'être infectés. Dans ce cas, la meilleure méthode d'échantillonnage consiste à pratiquer un échantillonnage d'intensité égale pour chaque groupe (c'est-à-dire prélever des échantillons de taille égale; en d'autres termes, seule la première des exigences énoncées précédemment est respectée).

Ce système d'échantillonnage vise à déceler au moins un poisson contaminé par le pathogène concerné, en supposant une prévalence apparente de l'infection plus prudente de 2 % (pour tenir compte des erreurs de diagnostic) et une probabilité de 95 % (voir les tailles d'échantillons indiquées au Tableau 2). Selon des données purement statistiques, la nouvelle unité visée (écloserie plutôt que lot) permet de partir d'hypothèses plus prudentes (même probabilité et niveau inférieur de prévalence décelable), sans faire augmenter le nombre de poissons à échantillonner.

L'échantillon doit être composé de géniteurs et de poissons d'élevage (ces derniers étant, de préférence, âgés de moins de 9 mois). Le ratio entre poissons d'élevage et géniteurs n'est pas nécessairement fixe, mais doit se situer entre 50:50 et 70:30.

Le nombre total de géniteurs à échantillonner doit être réparti de manière égale (sauf si les données de détection sur les pathogènes visés montrent qu'il faut faire autrement) entre toutes les espèces présentes dans l'installation. Il faut aussi répartir de manière égale le nombre des poissons d'élevage entre toutes les espèces présentes dans l'installation. Si un lot est prélevé dans deux unités ou plus, il faut sélectionner des nombres sensiblement égaux de poissons dans chaque unité (ici encore, sauf si les données de détection sur les pathogènes visés montrent qu'il faut faire autrement).

Par exemple, si une installation est composée des unités de maintiens suivants :

N ° d'ident. du lot	Espèce	Nbre de poissons	catégorie d'âge
1	Saumon atlantique	250	géniteurs (espèce qui se reproduit plus d'une fois)
2	Ombre de fontaine	130	géniteurs (espèce qui se reproduit plus d'une fois)
3	Ombre de fontaine	35 000	4 mois
4	Touladi	40 000	18 mois
4	Touladi	20 000	2 mois

Pour une probabilité de 95 % et une prévalence apparente d'environ 2 % (et une population > 40 000 individus), il faut échantillonner 150 poissons (voir le Tableau 2). Si l'on applique le ratio de 70 % de poissons d'élevage et 30 % de géniteurs, il faut donc prélever un échantillon composé de 38 géniteurs (10 % du nombre total de géniteurs), 7 liquides de reproduction (pour équilibrer les échantillons, il faut prélever 45 échantillons de géniteurs, soit 30 % de 150 poissons) et 105 poissons d'élevage. Sur les 45 géniteurs, 23 poissons doivent provenir du lot 1, 13 poissons et 9 liquides de reproduction (pour un total de 22) du lot 2. Sur les 105 poissons d'élevage, 53 viennent du lot 3 et 52 du lot 54 (26 poissons de chacune des espèces présentes dans chacune des unités, respectivement).

Par ailleurs, si l'inspection d'une installation ne porte que sur les virus (uniquement pour les analyses des œufs), avec le même ratio (70 % poissons d'élevage: 30 % géniteurs), l'échantillon de géniteurs est le même que précédemment, mais celui des 105 poissons d'élevage peut être constitué de 52 individus provenant du lot 3 (la stratification étant déterminée par l'inspecteur sanitaire des poissons) et de 53 poissons provenant de l'unité de 2 mois du lot 4 (0 poisson de 18 mois).

**Il est recommandé d'utiliser une probabilité de 95 % et une prévalence apparente de 2 % (pour les populations importantes) pour déterminer la taille d'échantillon nécessaire pour déceler au moins un poisson montrant un résultat positif.**