

Méthodes de détection de certains agents pathogènes chez les salmonidés

D.C. Gillespie
T.P.T. Evelyn
C. Frantsi
R.M. MacKelvie
N. Neufeld



Environnement Canada
Service des pêches
et des sciences de la mer

Environment Canada
Fisheries
and Marine Service

Méthodes de détection de certains agents pathogènes chez les salmonidés

D. C. Gillespie

*Ministère de l'Environnement
Service des pêches et des sciences de la mer
Institut des eaux douces, Winnipeg (Man.)*

T. P. T. Evelyn

*Ministère de l'Environnement
Service des pêches et des sciences de la mer
Station biologique du Pacifique, Nanaimo (C.-B.)*

C. Frantsi*

*Ministère de l'Environnement
Service des pêches et des sciences de la mer
Station de pisciculture de Mataquac, Fredericton (N.-B.)*

R. M. MacKelvie

*Ministère de l'Environnement
Service des pêches et des sciences de la mer
Laboratoire d'Halifax, Halifax (N.-E.)*

N. Neufeld

*Ministère de l'Environnement
Service des pêches et des sciences de la mer
Laboratoire d'inspection, Vancouver (C.-B.)*

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT
SERVICE DES PÊCHES ET DES SCIENCES DE LA MER
OTTAWA 1974

* Adresse actuelle: Laboratoire marin Huntsman, St. Andrews (N.-B.)

Information Canada
Ottawa 1974
Catalogue N° Fs 4-31/23F

Table des matières

RÉSUMÉ iv

PRÉFACE 1

I. MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE 3

- A. Poissons d'élevage
 - 1. *Echantillonnage par lots*
 - 2. *Sélection des échantillons*
 - 3. *Nombre d'échantillons pour la recherche des virus*
 - 4. *Nombre d'échantillons pour la recherche des bactéries*
 - 5. *Nombre d'échantillons pour la recherche des myxosporidies*
 - 6. *Périodes d'échantillonnages*
- B. Poissons sauvages
 - 1. *Poissons sexuellement non développés*
 - 2. *Poissons sexuellement développés*
- C. Oeufs fécondés

II. TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS 7

- A. Poissons vivants
- B. Poissons morts
- C. Liquides de reproduction

III. TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS 8

- A. Technique d'autopsie
 - 1. *Observations générales*
 - 2. *Examen externe*
 - 3. *Technique d'autopsie pour examen interne*
 - 4. *Examen interne*
- B. Disposition des échantillons

IV. MODES DE DÉTECTION DE CERTAINES BACTÉRIES PATHOGÈNES CHEZ LES POISSONS 10

- A. Catégories de bactéries
- B. Modes de détection
- C. Matériel et méthodes
 - 1. *Milieux de culture pour isolement*
 - 2. *Milieux d'identification, réactifs, méthodes*

V. MODES DE DÉTECTION DES VIRUS, Y COMPRIS: SHV, NHI et NPI 15

- A. Catégories de virus
- B. Tissus à analyser
- C. Combinaison des tissus
- D. Préparation des inocula
- E. Cultures cellulaires
- F. Inoculation des cultures cellulaires avec les échantillons filtrés
- G. Contrôles
- H. Marche à suivre au cours de l'incubation
- I. Interprétation des résultats
- J. Essai de neutralisation sérique

VI. MÉTHODES DE RECHERCHES DE CERTAINES SPORES DE MYXOSPORIDIÉS 19

- A. Catégorie de myxosporidies
- B. *Myxosoma cerebralis*
- C. *Ceratomyxa shasta*

BIBLIOGRAPHIE 21

Résumé

GILLESPIE, D. C., T. P. T. EVELYN, C. FRANTSI, R. M. MacKELVIE ET N. NEUFELD. 1974. Méthodes de détection de certains agents pathogènes chez les salmonidés. Fish. Res. Board Can. Misc. Spec. Publ. 23: 21 p.

Le présent guide de procédés de laboratoire explique, étape par étape, la procédure intégrée de manipulation d'échantillons de poisson à analyser pour détecter les principaux virus, bactéries et myxosporidies pathogènes des salmonidés.

Sauf pour certaines situations qui impliquent l'échantillonnage légal de géniteurs sauvages, les procédés d'échantillonnage se basent sur la probabilité, à un seuil de certitude de 95%, de détecter un porteur d'agent pathogène, en supposant une certaine prédominance de porteurs dans la population. Il y a dans le guide une description détaillée de la composition des échantillons, de leur transport et de leur manipulation en laboratoire.

Les méthodes pourvoient à la mise en évidence des agents pathogènes qui sont divisés en deux groupes, suivant leur degré d'ubiquité. Des agents pathogènes du groupe le plus répandu ou «déclarable» soit: les myxobactéries, les *Aeromonas* motiles, les *Pseudomonas* et les *Vibriosis*; l'identification de l'espèce n'est pas requise pour ces organismes. Les agents pathogènes du groupe le moins ubiquitaire ou «certifiable» soit: la bactérie de la maladie du rein, la bactérie de la bouche rouge (*Enterobacteriaceae*), *Haemophilus piscium*, *Aeromonas salmonicida*, les protozoaires *M. cerebralis* et *C. shasta*, et les virus de la septicémie hémorragique, de la nécrose hématopoïétique infectieuse, de la nécrose pancréatique infectieuse. De plus, tout virus non identifié ou tout agent semblable à un virus, isolé au cours d'analyses virologiques est considéré comme un agent «certifiable», à moins qu'il ait été reconnu non pathogène pour les salmonidés.

Préface

L'avenir de l'industrie croissante de l'aquiculture au Canada, de ses pêches sportives et, jusqu'à un certain point, de ses pêches commerciales, dépend de l'existence et du développement d'opérations d'élevage de poissons sains. A leur tour, ces opérations dépendent de l'établissement d'un programme efficace de contrôle des maladies. Le Comité canadien des maladies du poisson a traité de ces besoins dans son rapport de 1972 (Office des recherches sur les pêcheries, publications diverses spéciales, n° 16), qui donne un aperçu du programme sur la santé des poissons au Canada.

Pour instaurer un programme de santé des poissons, il fallait avoir un manuel qui contienne des instructions précises sur la détection des agents pathogènes que l'on considère actuellement comme la pire menace pour les salmonidés au Canada. Ces méthodes ont été compilées pour répondre à ce besoin et pour faciliter l'identification et le développement de sources de salmonidés exempts de ces germes pathogènes.

Ces instructions sont à l'usage du personnel des laboratoires qui feront les tests et sont familiers avec les techniques bactériologiques, virologiques et parasitologiques fondamentales. Pour ceux qui désirent de plus amples renseignements, des références clés sont données.

Les méthodes compilées dans ce guide l'ont été pour leur sensibilité, leur efficacité et leur reproductibilité. Cependant, il faudra les réviser au fur et à mesure qu'il y aura progrès dans les techniques diagnostiques et qu'on identifiera de nouveaux agents pathogènes dont le contrôle s'imposera. Une telle méthode de diagnostic a déjà été développée pour deux des trois virus connus des salmonidés, mais, à cause du traitement unique des virus, la plus récente méthode n'avait pas été adoptée tant qu'elle n'a pas été éprouvée pour le troisième. Il est impérieux de faire des progrès en techniques diagnostiques dans d'autres domaines, tout particulièrement pour la bactérie qui cause la maladie du rein. Il n'est pas fait mention de la Nécrose ulcérate du derme, étant donné qu'il n'existe pas de description de l'agent étiologique de cette maladie.

Nous remercions les personnes suivantes pour leurs critiques et commentaires: D. F. Amend, R. L. Herman, L. A. McDermott, N. O. Nielsen, K. E. Wolf, T. Yamamoto, L. Margolis et G. R. Bell, ainsi que beaucoup d'autres employés d'Environnement Canada. G. Cousineau a aidé à la préparation du texte français. Le mérite d'avoir incité à préparer le présent guide et d'avoir assuré sa publication revient à M. G. I. Pritchard.

I. Méthode d'échantillonnage

A. Poisson d'élevage

1. Échantillonnage par lots

Sauf indication contraire (voir I B 1), l'échantillonnage de poissons se fait par lots. Un lot se définit: poissons du même âge qui ont toujours partagé le même approvisionnement d'eau et qui proviennent d'une population de divers reproducteurs.

2. Sélection des échantillons

La façon de déterminer le nombre exact de poissons qu'il faut prélever d'un lot donné est basée sur la recherche d'une probabilité de 95%, d'y déceler un porteur de germes pathogènes dans un lot dont on présume la prédominance de porteurs (Ossiander et Wedemeyer 1973) (Tableau 1).

L'échantillon doit être prélevé, sous la surveillance directe de l'agent certificateur, de façon telle que l'on ait l'assurance que tout agent pathogène sera détecté. Alors, lorsque l'échantillon est prélevé d'un lot gardé dans une seule unité de rétention (v.g. réservoir, canal, étang), l'échantillon sélectionné doit comporter autant de spécimens moribonds et fraîchement morts qu'il y en a de disponibles; s'il est requis d'ajouter des poissons pour compléter l'échantillon, des poissons, apparemment sains, doivent être prélevés.

TABLEAU 1. Nombre d'échantillons requis pour détecter un ou plusieurs porteurs de germes pathogènes chez des lots de population, dont on présume que le taux de porteurs est de l'ordre de 2 et 10% au minimum. Les calculs sont basés sur un taux de probabilité de 95%. (Pour les populations intermédiaires, il faut prendre le nombre d'échantillons de la ligne suivante.)

Population	Nombre de poissons à échantillonner si on présume que le taux de porteurs est:	
	2%	10%
50	46	20
100	76	23
250	110	25
500	127	26
1,000	136	27
2,500	142	27
5,000	145	27
10,000	146	27
100,000	147	27
Plus de 100,000	150	30

Si le lot de poissons ci-haut mentionné occupe plus d'une unité, le nombre total de spécimens à prélever serait le même que précédemment. Cependant, les spécimens qui doivent être retirés des unités individuelles le seront en nombre tel qu'il reflètera la proportion du lot retenu dans chacune des unités. Là encore, l'échantillon d'une unité donnée doit consister en autant de moribonds et de poissons fraîchement morts qu'il est possible. Si un nombre de poissons supplémentaires est nécessaire pour compléter l'échantillon, des poissons d'apparence saine doivent être prélevés.

Il est à remarquer que lorsqu'il faut traiter les poissons ou leurs tissus en groupes plutôt qu'individuellement comme dans le cas des analyses virologiques, on doit prendre soin de traiter séparément les poissons d'apparence saine des spécimens moribonds ou récemment morts.

3. Nombre d'échantillons pour la recherche des virus

a) La progéniture (sujets non reproducteurs): Le nombre d'échantillons à prélever est celui qui offre une probabilité de 95% de détecter un porteur dans un lot dont on présume que la prédominance des porteurs est de 2% au minimum.

b) Sujets de reproduction (poissons sexuellement développés qui servent à la reproduction): On doit viser à la même sensibilité dans la détection des porteurs, mais au cours d'échantillonnage annuel répété, cela doit être atteint en utilisant des liquides de reproduction plutôt que de tuer un grand nombre de reproducteurs de grande valeur. Il faut surtout recueillir une grande quantité de liquide ovarien. Il faut échantillonner le liquide de reproduction à un taux qui offre une probabilité de 95% de détecter un porteur dans un lot dont on présume que la prédominance des porteurs est de 2% au minimum. Parce qu'il serait risqué de prélever uniquement du liquide de reproduction pour l'analyse virologique, il faut prendre également des poissons de reproduction pour avoir des échantillons de tissus: reins, rate, pylore-caecum-pancréas. Cet échantillonnage légal de reproducteurs doit être fait annuellement au taux qui offre une probabilité de 95% de détecter un porteur dans un lot dont on assume que la prédominance des porteurs est de 10%.

4. Nombre d'échantillons pour la recherche de bactéries

a) La progéniture doit être échantillonnée, pour la bactériologie, à un taux qui offre une probabilité de 95% de chance de détecter un porteur dans un lot dont on assume que la prédominance des porteurs est de 2% au minimum. Pour fins d'études bactériologiques de routine, il faut échantillonner les seuls poissons dont la longueur (à la fourche de la queue) est de 4 cm et plus. Techniquement, il est plus difficile de faire un échantillonnage valable pour la bactériologie des poissons qui sont plus petits. Il est toutefois possible de s'en servir lorsqu'on observe des taux de mortalité ou des signes de maladies inhabituels et inexplicables.

b) Les géniteurs de reproduction doivent être échantillonnés conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage légal de cette catégorie (voir / A 3 b).

5. Nombre d'échantillons pour la recherche des myxosporidies

a) En ce qui concerne les *Myxosoma cerebralis* et les *Ceratomyxa shasta*, il faut échantillonner la progéniture à un taux qui offre une probabilité de 95%

de détecter un porteur dans un lot dont on assume que la prédominance des porteurs est de 2% au minimum.

M. cerebralis; le poisson doit avoir au moins 4 mois pour que les analyses soient significatives, étant donné que les spores sur lesquelles se base le diagnostic se développent lentement. Chez les poissons qui croissent ou qui vivent 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 de routine des poissons d'apparence saine, afin de trouver des spores, doit se faire seulement sur les poissons dont la longueur (à la fourche) est de 10 cm et plus. Avec de tels poissons, les viscères employés pour la recherche des spores ne serviront pas à d'autres analyses (ex: les virus), et le problème de manutention de plus petits poissons est ainsi évité. On peut examiner de plus petits poissons pour *C. shasta* seulement lorsque des taux de mortalité ou des signes de maladies inhabituels et inexplicables se manifestent.

b) Les géniteurs de reproduction doivent être échantillonnés conformément au taux déjà établi pour l'échantillonnage légal de géniteurs de reproduction pour les virus (Voir / A 3 b).

6. Périodes d'échantillonnages

L'échantillonnage devra se faire deux fois par année, et la période d'échantillonnage dépend des conditions locales. Parce que la détection des *M. cerebralis* et de certains virus se réalise mieux lorsque les poissons ont un certain âge, et parce qu'il faut aussi échantillonner les liquides de reproduction, on propose comme périodes d'échantillonnage, les mois de mars à mai pour le premier échantillonnage, et septembre à novembre pour le second.

Il faudra faire de l'échantillonnage supplémentaire si, entre ces deux périodes, des taux de mortalité et des signes de maladies inhabituels et inexplicables se manifestent.

B. Poissons sauvages

1. Poissons sexuellement non développés

Tous les poissons sexuellement non développés vivant en conditions naturelles doivent être échantillonnés à un taux qui donnera une probabilité de 95% de détecter un porteur, pour la prise totale, en assumant que la prédominance des porteurs est de 10% au minimum. Ce taux d'échantillonnage s'appliquera aux divers agents pathogènes (virus, bactéries, protozoaires) cités plus tôt.

2. Poissons sexuellement développés

S'il faut recueillir des reproducteurs sauvages ou leurs oeufs fécondés, il importe de prélever du liquide séminal et ovarien de tous les poissons concernés jusqu'à un maximum de 150. De plus, 10%¹ de tous ces reproducteurs utilisés ou prélevés, jusqu'à un maximum de 30, doivent faire partie de l'échantillonnage légal.

¹L'échantillonnage légal de seulement 10% de tous les reproducteurs n'est pas conforme aux taux d'échantillonnage exposés au Tableau 1; c'est dans le but de conserver des populations restreintes mais précieuses de reproducteurs qui continuent à vivre et à frayer à nouveau.

C. Oeufs fécondés

On ne peut apparemment pas se fier à l'échantillonnage pour détecter certains agents pathogènes dont les oeufs fécondés sont porteurs. La menace, que constitue de tels oeufs pour la santé du poisson, doit donc être évaluée à la lumière de l'histoire des maladies à la source des poissons.

II. Transport des échantillons

Les échantillons de poissons doivent être manipulés le plus vite possible et de manière telle que les changements dégénératifs ne rendent le diagnostic incertain ou impossible. Si les échantillons ne peuvent pas être apportés vivants au laboratoire, il faut les garder sur la glace pendant 48 heures au maximum. Il est préférable que les échantillons soient prélevés avant que tout traitement thérapeutique ait été institué. Tous les renseignements pertinents doivent accompagner les échantillons. Cela doit comporter les données relatives à l'état de santé pour l'établissement en général et pour les lots desquels les échantillons ont été prélevés.

A. Poissons vivants

On peut transporter les poissons vivants dans des sacs de plastique scellés, d'au moins 4 mil d'épaisseur, partiellement remplis d'eau et chargés d'oxygène. On peut ensuite placer ces sacs et de la glace dans des contenants isolés.

B. Poissons morts

Les échantillons récemment morts ou tués doivent être transportés individuellement (ou en groupe, si les poissons sont inférieurs à 4 cm) dans des sacs de plastique scellés, qui sont placés dans des contenants isolés, et chaque sac doit être entouré de glace.

C. Liquides de reproduction

Les échantillons de laitance et de liquide ovarien doivent être transportés sur glace dans des contenants scellés. Quant aux restrictions de regroupement, voir *VBdii* et *VC*.

III. Traitement des échantillons

A. Technique d'autopsie

1. *Observations générales*

On décrit ci-dessous la méthode idéale d'autopsie. Il faut évidemment modifier cette méthode si l'on travaille sur de très petits poissons, et la simplifier considérablement lorsqu'il y a un grand nombre d'échantillons à traiter.

La technique implique, qu'à l'exception des très petits spécimens, le même poisson servira de source de tissus pour les diverses analyses (bactériennes, virales, myxosporidiales). Par conséquent, l'analyse bactériologique doit être faite en premier.

2. *Examen externe*

Noter et enregistrer toutes les anomalies macroscopiques telles: la couleur du corps, la présence de pellicules opaques, l'exophtalmie, les écailles hérissées, les opercules érodés, les rougeurs, les ulcères, les tuméfactions, les branchies écorchées ou en massues et la pourriture des nageoires et de la queue. Chercher particulièrement les lésions au corps et aux branchies et inoculer les milieux de culture appropriés avec le matériel prélevé de ces lésions. Ensuite, préparer des frottis à partir de ces lésions et les colorer. S'il y a des indices d'une infection myxobactériale, préparer des examens à l'état frais à partir des grattages des lésions et les examiner au microscope pour rechercher les formes typiques. Examiner les branchies excisées et les grattages de la surface extérieure du corps pour y déceler des ectoparasites.

3. *Technique d'ouverture pour examen interne*

a) Techniques aseptiques: stériliser les instruments à la flamme après les avoir trempés dans de l'alcool isopropylique ou éthylique à 70%. Désinfecter la surface du poisson en essuyant avec des linges de cellulose ou de coton imbibés d'alcool à 70%. Si la surface du poisson devient un peu plus foncée, la désinfection est satisfaisante.

b) Incisions et coupures: placer le poisson sur son côté droit et enlever la nageoire pectorale gauche. Avec des ciseaux bien pointus et aiguisés, faire une incision de la paroi abdominale sur la ligne semi-ventrale, vis-à-vis le bord postérieur du bout de la nageoire enlevée. Insérer la lame arrondie d'une autre paire de ciseaux et couper en direction du dos jusqu'à ce qu'il y ait résistance, indice que l'extrémité supérieure de la cavité a été atteinte. Ensuite, en prenant soin de ne pas perforer l'intestin, couper vers la partie postérieure le long de la ligne semi-ventrale jusqu'à proximité de l'anus. Relever la partie de la paroi libérée et à l'aide d'un stylet émoussé, décoller toute adhérence entre la paroi et les viscères. Finalement, en partant près de l'anus, couper vers la partie antérieure en demi-cercle pour terminer l'excision de la paroi, qui peut alors être enlevée. Après avoir démêlé les viscères avec soin, on peut mettre à vue le rein en enlevant la membrane qui l'emprisonne dans l'abdomen.

4. *Examen interne*

Pour réduire le risque de contamination, faire immédiatement les prélèvements bactériologiques à partir du rein et de tous les tissus qui semblent macroscopiquement anormaux. Préparer et colorer des frottis de ces divers tissus. Noter l'apparence des organes quant aux caractéristiques suivantes: la couleur et la consistance, les hémorragies, les pustules, les nodules ou les excroissances, la présence ou l'absence d'aliments ou de mucus dans l'estomac et l'intestin. On peut ensuite prélever des tissus pour d'autres fins telles: des analyses virales, myxosporidiales et des préparations histologiques.

B. Disposition des échantillons

Le laboratoire d'expertise devrait manipuler et disposer des échantillons et de tout autre matériel potentiellement infectieux de manière à empêcher toute dissémination des agents pathogènes. Tout le matériel, comme les carcasses de poissons ou les tissus, les contenants du transport, l'eau, les cultures bactériennes et l'équipement contaminé, devrait par conséquent être autoclavé, incinéré ou stérilisé par tout autre moyen avant d'être jeté.

IV. Modes de détection de certaines bactéries pathogènes chez les poissons

A. Catégories de bactéries

Les micro-organismes concernés par ces modes de détection se divisent en deux catégories et sont énumérés dans l'ordre où ils apparaissent dans le texte:

1. Les bactéries pathogènes, de distribution géographique limitée, dont l'absence doit être certifiée. Elles comprennent:
 - la bactérie de la maladie du rein (KD)
Haemophilus piscium
 - la bactérie RM (de la bouche rouge) (famille des Enterobacteriaceae)
Aeromonas salmonicida
2. Les bactéries pathogènes qui peuvent être ubiquitaires et qui sont détectées de façon systématique dans les échantillons, doivent être déclarées. Elles comprennent:
 - Myxobactéries
 - Aeromonas motiles*
 - Pseudomonas* spp.
 - Vibrio* spp.

B. Modes de détection

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

1. Le tissu rénal, prélevé aseptiquement de préférence de parties qui semblent anormales, est ensemencé à raison d'une boîte de Pétri par poisson pour chacun des milieux de culture suivants:
 - milieu Muëller Hinton enrichi (EMHM)
 - gélose cytophaga (CA)
 - gélose trypticase (ou tryptique) de soya (TSA)
2. Préparer des frottis de ces tissus, les colorer au Gram et les examiner pour y déceler des bactéries. La présence de petits diplobacilles gram-positifs est une indication présomptive de la présence de la bactérie de la maladie du rein.
3. Incuber les boîtes de Pétri à 20-22 C pendant 10 jours et les examiner quotidiennement pour y déceler tout signe de multiplication.
4. Des boîtes de Pétri de EMHM, choisir les jeunes colonies représentatives de celles qui se trouvent sur ces boîtes et déterminer au microscope si les bactéries sont motiles. Inoculer les formes immotiles sur les milieux TSA et EMHM. De fines colonies de bâtonnets immotiles gram — qui se multiplient, en 2 à 3 jours, sur EMHM et non pas sur TSA, est une indication présomptive de *H. piscium*.

5. Des cultures sur milieu CA, préparer des états frais et des frottis colorés au Gram à partir des cellules issues de jeunes colonies. La présence de longs bacilles gram-négatifs, qui se meuvent par glissement ou en rampant, est une indication présomptive de myxobactéries.
6. A partir de la culture sur TSA, sélectionner de jeunes colonies représentatives. Différencier les micro-organismes d'après les caractéristiques suivantes:
 - a) Si les bactéries sont des bâtonnets gram-négatifs, motiles et oxydase-positifs, on peut supposer que l'organisme est une des espèces d'*Aeromonas* (type motile), de *Pseudomonas* ou de *Vibrio*.
 - b) Si l'organisme est oxydase-négatif, on peut présumer la présence de la bactérie RM (Enterobacteriaceae) (Ross et al. 1966).
 - c) Si l'organisme est immotile et qu'il produit un pigment brun et diffus, on peut supposer que c'est un *A. salmonicida* (Griffin et al. 1952).

A la figure 1, on donne le graphique de ces procédés; il présente des caractéristiques supplémentaires pour différencier les *Aéromonas* motiles, les espèces *Pseudomonas* et *Vibrio*.

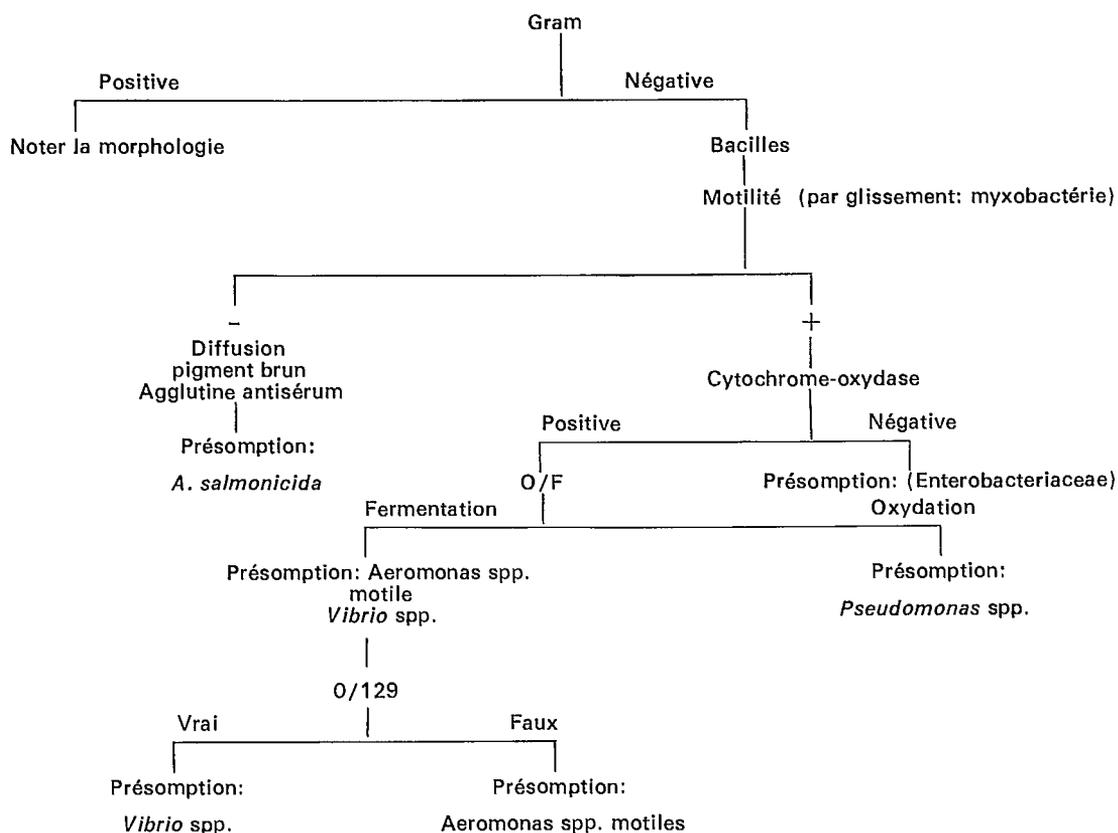


FIG. 1. Différenciation des bacilles gram-négatifs isolés de poissons sur TSA.

Pour toutes les bactéries identifiées présomptivement et certifiables, il faut faire des essais de confirmation, sauf dans le cas de la bactérie de la maladie du rein car elle se développe difficilement. Les tests énumérés au tableau 2 représentent les exigences minimales requises pour confirmer une identification. Il incombe au vérificateur de décider si des essais supplémentaires, décrits dans les ouvrages de référence, doivent être faits. En ce qui concerne les bactéries qu'il faut obligatoirement déclarer, les essais de confirmation ne sont pas nécessaires.

C. Matériel² et méthodes

1. Milieux de culture pour isolement

a) Gélose trypticase de soya (BBL) ou la gélose tryptique de soya (Difco)

b) Gélose cytophaga (Anacker et Ordal 1959)

Tryptose	0.05%	Extrait de boeuf	0.02%
Extrait de levure	0.05%	Gélose	0.9 %
Acétate de sodium	0.02%	pH 7.2 – 7.4	

c) Milieu de culture Mueller Hinton enrichi.

Le milieu de culture Mueller Hinton (Difco) est enrichi, après stérilisation et refroidissement, par l'addition d'une solution stérilisée par filtration de cocarboxylase, en vue d'obtenir une concentration finale de 2 µg de cocarboxylase par ml de culture. Une solution-mère de 1 mg/ml de cocarboxylase est stable pour approximativement 6 mois si elle est conservée à 4 C.

TABLEAU 2. Essais de confirmation et réactions typiques de trois organismes dont la présence doit être certifiée.

Essai	Réaction		
	<i>A. salmonicida</i>	<i>H. piscium</i> ^a	Bactérie RM
Multiplication à 37 C	-	-	+
Réduction du nitrate	+	-	+
Production d'indole	-	-	-
Réaction au rouge de méthyle	-	+	+
Réaction de V.P.	-	-	-
Liquéfaction de la gélatine	+	-	+
Glucose	+	+	+
Glycérol	+	-	+
Mannitol	+	-	+
Xylose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Lactose	-	-	-
Raffinose	-	-	-

^aLes milieux de cultures d'essai de *H. piscium* doivent contenir de la peptone de poisson tel qu'il est indiqué dans la publication de Snieszko et al. (1950).

²Le matériel spécifié s'est avéré satisfaisant pour les objectifs poursuivis; cependant, cela n'implique pas que d'autres produits ne peuvent être tout aussi satisfaisants.

2. Milieux d'identification, réactifs, méthodes

a) Motilité

Examiner les cultures, en phase de croissance logarithmique, à l'état frais en suspension dans le bouillon trypticase de soya. Si les résultats ne sont pas satisfaisants lorsqu'on emploie l'état frais, vérifier les résultats en inoculant en piqûre, les tubes de culture d'essai de motilité (Difco).

b) Test cytochrome-oxydase

Déposer de la culture bactérienne, en croissance sur milieu solide, sur une bande de papier imprégnée de produits chimiques appropriés. Après l'avoir bien étalée, le test est positif si en moins d'une minute, le papier devient bleu clair. Les bandes de papier imprégnées sont en vente chez Pathotec Co., General Diagnostics Division et Warner Chilcott, Norris Plains, N.J., E.-U.

c) Différenciation entre le métabolisme oxydatif et fermentaire des glucides.

Ajouter 1% de glucose au milieu de base O.F. (O.F. Basal medium) (Difco) et inoculer conformément aux instructions données dans le supplément du manuel Difco (novembre 1968), à la page 255. Superposer une couche solide composée de volumes égaux de paraffine et d'huile minérale afin de s'assurer que toute production de gaz sera décelée.

d) Test d'agglutination sur lame (Rabb et al. 1964) pour *A. salmonicida*.

Le test d'agglutination peut se faire sur une lame de microscope ou, s'il y a plusieurs tests à faire, sur une plaque de verre poli d'environ 6×2 po, divisée adéquatement au crayon gras. L'antisérum est utilisé concentré ou à faible dilution, parce que l'agglutination sur lame est pratique si les organismes agglutinent en moins d'une minute.

- (i) Déposer une goutte de solution saline à l'intérieur d'une des divisions et, à l'aide d'une anse de platine, y émulsionner une petite quantité de cellules bactériennes prélevées d'une culture sur milieu solide.
- (ii) Examiner avec une loupe $10\times$ la suspension bactérienne afin de s'assurer que les bactéries sont bien séparées et non agglutinées.
- (iii) Déposer une ansée d'antisérum près de la goutte de suspension bactérienne. Mélanger le tout en imprimant un mouvement de rotation à la plaque de verre pendant 1 à 3 minutes.
- (iv) Pour chaque suspension bactérienne étudiée, préparer un contrôle en substituant une solution saline à l'antisérum.
- (v) Si les cellules bactériennes s'agglutinent rapidement et macroscopiquement dans le mélange antisérum (et non pas dans le mélange contrôle), l'essai d'agglutination est positif.

e) Sensibilité à l'agent vibriostatique O/129

Le test se fait sur boîtes de Pétri TSA en déposant un disque O/129, sur le milieu dont la surface a été uniformément ensemencée 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 O/129, saturer des disques (6 mm) de papier-filtre Whatman pour analyses de sensibilité aux antibiotiques, d'une solution à 0.1% de l'agent O/129 dans l'acétone. Rejeter l'excédent de solution et faire sécher les disques à 37 C. On peut obtenir l'agent vibriostatique O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropylptéridine) de British Drug Houses, au Canada et de Calbiochem, aux Etats-Unis.

f) Autres tests d'identification (Bain et Shewan 1968)

Suivre les procédés standards de la Society of American Bacteriologists, dans le Manual of Microbiological Methods, 1957, (McGraw-Hill Book Co. Inc., New York, Toronto et Londres).

NOTE: tous les milieux de culture d'identification pour *H. piscium* doivent contenir de la peptone de poisson.

V. Modes de détection des virus, y compris: SHV, NHI et NPI³

A. Catégories de virus

La présence de tout agent filtrable de replication qui produit des effets cytopathologiques sur l'une ou l'autre des cultures cellulaires déterminées doit être certifiée, qu'il soit possible ou non de l'identifier avec les antisérums actuellement disponibles, que son pouvoir pathogène pour les salmonidés soit connu ou non.

B. Tissus à analyser

(a) Alevin vésiculé: analyser au complet

(b) Alevins jusqu'à 4 cm de longueur (à la fourche): enlever la tête, les muscles dorsaux de la colonne vertébrale et la queue, à partir de la partie immédiatement postérieure à l'anus. Garder les autres parties pour l'analyse.

(c) Poissons dont la longueur (à la fourche) varie entre 4 et 10 cm: enlever les viscères et les analyser. Pour ce faire, étêter le poisson, inciser la paroi abdominale jusqu'à l'anus et finalement couper et gratter pour enlever les viscères (y compris le rein).

(d) (i) Poissons dont la longueur (à la fourche) est de 10 cm et plus: analyser des mélanges de rein, rate et pylore-caecum-pancréas. Le rapport entre les volumes de ces mélanges devrait être de 3:1:1. Une partie du rein antérieur, médian et postérieur, doit être incluse dans l'échantillon.

(ii) Lorsque les poissons de cette taille sont des reproducteurs et qu'on se sert des liquides de reproduction, il faut prélever une quantité aussi grande que possible de fluide ovarien. On peut regrouper le liquide de reproduction de cinq poissons, mais il ne faut jamais mêler la laitance et la suspension ovarienne.

C. Combinaison des tissus

Lorsque la longueur (à la fourche) des poissons est d'environ 4 cm ou moins, on peut combiner les tissus de 10 poissons au maximum et les traiter comme un seul échantillon. Lorsque la longueur des poissons dépasse 4 cm, on peut combiner les tissus de cinq poissons au maximum pour former un seul échantillon.

Au cours de la préparation des échantillons combinés, il ne faut jamais regrouper les poissons d'apparence saine (ou leurs tissus) avec les moribonds ou récemment morts (ou leurs tissus).

³SHV — Septicémie Héorragie Virale; NHI — Nécrose Hématopoïétique Infectieuse; NPI — Nécrose Pancréatique Infectieuse.

D. Préparation des inocula

(a) Tissus solides: ces tissus doivent être pesés et homogénéisés dans une solution saline équilibrée (SSE), comme celles de Earle ou de Hank, dont le pH est à 7.6 – 7.8. A l'aide de l'une de ces solutions salines, diluer l'homogénat pour obtenir une concentration finale de 5 g de tissus par 100 ml de suspension de tissus. Centrifuger l'homogénat pendant 15 minutes à $1.500 \times g$ et filtrer aseptiquement le surnageant éclairci à l'aide d'une membrane filtrante de porosité $0.45 \mu\text{m}$.

Méthodes d'homogénéisation proposées

- (i) Pour les petits poissons ou les petites quantités de tissus, le Ten Broeck, ou tout autre homogénéisateur semblable, est efficace et est conçu pour permettre le refroidissement avec glace durant l'homogénéisation.
- (ii) A l'aide d'un mortier et d'un pilon préalablement refroidis, broyer les tissus avec une petite quantité de silice de 80–120 mesh, jusqu'à ce qu'il ait formation d'une pâte lisse.

(b) Echantillon liquides: au cours de la préparation d'échantillons combinés, il faut que la quantité de liquide prélevée de chaque poisson soit approximativement la même. Si, après centrifugation (voir *VD a*), l'échantillon n'est pas suffisamment clair pour être filtré, il faut le diluer 1:2 dans une solution saline équilibrée et le centrifuger de nouveau. Habituellement, il n'est pas nécessaire de diluer le liquide ovarien, contrairement à la laitance. Les échantillons de liquides doivent être alors filtrés tel qu'il a déjà été décrit.

(c) Pour l'inoculation, il faut au moins 0.8 ml de l'échantillon filtré. Pendant la préparation de l'inoculum, sa température ne doit jamais dépasser 15 C.

E. Cultures cellulaires

(a) Préparer deux tubes de chacune des deux catégories de cellules: les gonades de truite arc-en-ciel (RTG-2) et de méné à grosse tête (Fat-head minnow) (FHM), pour chaque échantillon à analyser. Employer des tubes d'analyse à capuchon vissé de 16×125 mm appropriés aux cultures de cellules.

(b) Verser dans chaque tube 1.0 ml de milieu minimum essentiel de Eagle qui comporte la solution saline de Earle et de la glutamine Earle, 10% de sérum foetal de veau, 100 unités de pénicilline par ml, $100 \mu\text{g}$ de streptomycine par ml et 25 unités de nystatine par ml (ou $0.25 \mu\text{g}$ d'amphotéricine B par ml).

(c) Incuber les cultures à 15–20 C; la température varie selon le moment où les cultures seront requises pour l'analyse virologique.

F. Inoculation des cultures cellulaires avec les échantillons filtrés

(a) Au moment de l'inoculation, les cultures cellulaires doivent être confluentes à 70–90% et elles ne doivent pas avoir plus de quatre jours.

(b) Décanter le milieu de culture et rincer délicatement les couches cellulaires une seule fois avec 2.0 ml de solution saline équilibrée de Earle ou Hank à pH 7.6–7.8.

(c) Inoculer aseptiquement 0.2 ml d'échantillon filtré sur chacune des quatre couches cellulaires préparées pour l'inoculation.

(d) Incuber l'échantillon, avec les couches cellulaires rincées, durant 30 minutes à 15 C.

(e) Retirer le liquide d'échantillon et rincer délicatement les couches cellulaires comme précédemment.

(f) Ajouter 1.0 ml de milieu frais à pH 7.6–7.8 par tube et incuber les cultures à 15 C. En aucun temps durant l'incubation, le pH ne doit être inférieur à 7.4.

G. Contrôles

Pour chaque lot de cultures cellulaires donatrices, on doit préparer en double des tubes de contrôle positif et négatif.

(a) Les contrôles négatifs doivent être constitués de couches cellulaires inoculées suivant la méthode de standard explicitée en *V E*, sauf qu'une solution saline stérile remplace l'échantillon.

(b) Les contrôles positifs diffèrent des contrôles négatifs tout simplement par la substitution d'une suspension virale standardisée à la solution saline équilibrée. La suspension doit se composer de virus NPI, souche VR 299 (ATCC) et contenir 10^2 – 10^3 de TCID₅₀ de virus.

Si des effets cytopathologiques (ECP) sont observés dans les tubes du contrôle négatif, ou ne se produisent pas dans les tubes du contrôle positif, il faut recommencer l'analyse virologique.

H. Marche à suivre au cours de l'incubation

(a) Examiner les cultures en incubation chaque jour pour voir si des ECP se produisent et pour s'assurer que le pH du milieu n'est pas inférieur à 7.4.

(b) Après 7 jours, retirer le milieu de chacun des tubes de culture et en inoculer 0.2 ml tel que décrit en *V E* dans une culture fraîche de la même lignée cellulaire. Le liquide surnageant est refiltré seulement si une contamination microbienne est manifeste ou soupçonnée ou si des ECP sont visibles. Ajouter 1.0 ml de milieu de culture frais à pH de 7.6–7.8 aux premiers tubes de culture et incuber pendant 7 autres jours.

(c) Un échantillon est considéré négatif s'il n'y a pas d'ECP dans les premiers tubes quatorze jours après l'inoculation ou dans les tubes-transferts 7 jours après l'inoculation.

I. Interprétation des résultats

Si les ECP se produisent dans une ou plusieurs cultures inoculées avec l'échantillon filtré, ou dans les tubes de transfert, il faut vérifier s'il y a un agent filtrable de

replication. Pour ce faire, filtrer le liquide de culture du tube qui comporte des ECP, diluer le filtrat avec la solution saline équilibrée à 10^{-1} et 10^{-3} et, en suivant le procédé décrit à la section *V E*, inoculer 0.2 ml de chacune des dilutions dans deux cultures fraîches de la même lignée cellulaire. Si les ECP se manifestent à nouveau, procéder à l'essai de neutralisation sérique.

J. Essai de neutralisation sérique

Une identification présomptive de l'agent responsable des ECP peut être faite en se basant sur les observations cliniques lors de l'échantillonnage et sur le type d'ECP produit. L'identification se fait par la neutralisation de l'agent avec un antisérum spécifique. Si aucune neutralisation ne se produit en se servant des antisérums préparés contre des virus connus, cela indiquera habituellement la présence d'un virus jusque-là inconnu.

Méthode

(a) Employer une dilution d'antisérum capable de neutraliser un volume égal d'une suspension qui contient au moins 10^3 TCID₅₀ par ml du virus homologue.

(b) Filtrer le liquide d'une culture qui présente des ECP au moyen d'un filtre 0.45 μ m. Diluer le filtrat à 10^{-2} et 10^{-6} avec une SSE stérile.

(c) (i) Mélanger 0.3 ml d'antisérum standardisé avec 0.3 ml de chacune des dilutions de l'échantillon.

(ii) Mélanger 0.3 ml du sérum normal avec 0.3 ml de chacune des dilutions de l'échantillon.

(iii) De la même manière, procéder à l'essai de neutralisation sérique sur les contrôles positifs en employant l'antisérum homologue et le sérum normal.

(d) Incuber les mélanges de la réaction à 15 C pendant 30 à 60 minutes et inoculer 0.2 ml de chaque mélange dans deux cultures de la lignée cellulaire dans laquelle le virus a été isolé. Utiliser la méthode d'inoculation décrite à la section *V E*.

(e) Incuber les cultures à 15 C et observer s'il y a production ou inhibition d'ECP. L'inhibition des ECP grâce à un antisérum donné (et non par un sérum normal) identifie le virus.

VI. Méthodes de recherches de certaines spores de myxosporidies

A. Catégorie de myxosporidies

Présentement, seulement deux maladies graves, attribuables aux myxosporidies, sont connues chez les salmonidés, celles causées par les *Myxosoma cerebralis* et par les *Ceratomyxa shasta*. Ces deux maladies doivent être certifiées.

B. *Myxosoma cerebralis*

1. Pour cette technique, les poissons doivent avoir au moins quatre mois. Les tissus d'un maximum de cinq poissons peuvent être regroupés.
2. Mettre les têtes de poissons dans un excédent (1 volume de tissu pour 10 volumes de fixatif) de formaline à 10% (1 volume de formaline commerciale pour 9 volumes d'eau) jusqu'à ce que le cerveau soit bien fixé (48 heures au minimum). Avec les gros poissons, les tissus peuvent ne pas être bien fixés après 48 heures; pour accélérer la fixation, la calotte crânienne située juste au-dessus des lobes optiques doit être rabattue pour permettre au fixatif d'atteindre facilement le cerveau. C'est seulement lorsque les tissus nerveux inutiles sont bien fixés que l'on peut les enlever avec soin en une seule pièce (voir à l'étape 4). De plus, parce que les spores de *M. cerebralis* sont tuées par fixation, le risque de transmettre le parasite est réduit au minimum si on emploie des tissus bien fixés.
3. A l'aide d'un scalpel, enlever avec soin la calotte crânienne afin de mettre à vue le cerveau sans l'endommager. Mettre la calotte dans un mortier.
4. Par l'ouverture du crâne, enlever et rejeter le cerveau et la moelle épinière. De cette façon, on évitera tout risque de contamination des tissus crâniens par les spores d'un parasite apparenté *Myxobolus neurobius* lequel, s'il est présent, peut être confondu avec le parasite *M. cerebralis*.
5. Mettre la calotte et les os du crâne ou le cartilage dans un mortier, ajouter suffisamment d'eau pour faciliter un broyage adéquat et broyer à fond. Le rapport tissu-eau ne doit jamais dépasser 1:5.
Pour les petits poissons dont le crâne est encore cartilagineux, il faut se servir de la calotte crânienne au complet à partir de l'orbite des yeux. On peut facilement détacher cette partie du muscle qui l'entoure. Pour les gros poissons dont la calotte crânienne est calcifiée, un scalpel est utilisé pour extirper la calotte crânienne et libérer les muscles indésirables. En ce qui concerne ces échantillons, la partie la plus importante à examiner est celle qui contient les canaux semi-circulaires.
6. Au besoin, ajouter de l'eau pour avoir un rapport tissu-eau de 1:5 et filtrer la suspension, dans un entonnoir conique, à travers six épaisseurs de coton à fromage préalablement mouillé (ou à travers un filtre de verre frité très poreux). L'entonnoir doit être mis dans un tube centrifuge conique de capacité suffisante. Il doit en résulter un filtrat constitué principalement de particules de la grosseur des cellules sanguines et plus petites. La plupart des particules de plus grande taille devraient avoir été enlevées.

7. Concentrer les particules en suspension dans le filtrat par centrifugation à 1,000 $\times g$ pendant 15 minutes. Décantier le surnageant et garder le culot de centrifugation.
8. A l'aide d'une pipette Pasteur, aspirer une petite quantité du culot, en déposer une goutte sur une lame de microscope, couvrir d'une lamelle et luter. Examiner immédiatement au moins 50 champs microscopiques bien espacés au grossissement 450 \times pour y déceler des spores.
9. Il est fort possible que des spores persistent sur l'équipement utilisé précédemment pour un test. Pour éviter ces faux résultats positifs, il est essentiel de respecter les étapes suivantes:
 - (a) Les articles peu coûteux comme lames de microscope, lamelles, pipettes Pasteur et coton à fromage, doivent être jetés.
 - (b) Il faut nettoyer à fond tout le matériel avant de le réutiliser. Si on se sert de filtres de verre fritté, il faut les nettoyer avec une solution concentrée d'acide chromique pour dissoudre les spores et redonner au filtre sa porosité.

C. *Ceratomyxa shasta*

1. Préparer des frottis du matériel retiré de la partie inférieure des intestins et, si le poisson est suffisamment gros, de la vésicule biliaire. De plus, s'il y a des lésions nodulaires dans un des tissus ou s'il y a présence de liquide d'ascite, préparer des frottis de ces tissus ou de ce liquide.
2. Colorer les frottis pendant une minute avec du bleu de méthylène, Loeffler, rincer avec de l'eau distillée et laisser sécher à l'air. Mettre une goutte d'huile d'immersion sur chaque frottis et couvrir d'une lamelle.
3. Pour chaque frottis, examiner au moins 25 champs microscopiques, au grossissement 450 \times pour y déceler la présence de spores de *C. shasta*. Les capsules et les filaments allongés polaires se colorent en bleu foncé, tandis que le sporoplasme se colore en bleu pâle. Des stages jeunes de *C. shasta* peuvent aussi être présents: en elles-mêmes, elles ne permettent pas un diagnostic spécifique de *C. shasta* et leur présence incite à poursuivre d'autres examens pour déceler des spores caractéristiques (Noble 1959).

Bibliographie

- ANACKER, R. L., and E. J. ORDAL. 1959. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. I. Serological typing. J. Bacteriol. 78: 25-32.
- BAIN, N., and J. M. SHEWAN. 1968. Identification of *Aeromonas*, *Vibrio* and related organisms, p. 79-84. In B. A. Gibbs and D. A. Shapton [ed.] Identification methods for microbiologists. Part B. Academic Press Inc., London and New York.
- BULLOCK, G. L. 1965. Simple enrichment of commercial media for growth of *Hemophilus piscium*. Prog. Fish-Cult. 27: 163-164.
- 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.
- NOBLE, E. R. 1959. On a myxosporidian (protozoan) parasite of California trout. J. Parasit. 36: 457-460.
- 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.
- RABB, L., J. W. CORNICK, and L. A. McDERMOTT. 1964. A macroscopic slide-agglutination test for the presumptive diagnosis of furunculosis in fish. Prog. Fish-Cult. 26: 118-119.
- ROSS, A. J., R. R. RUCKER, and W. H. EWING. 1966. Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Can. J. Microbiol. 12: 763-769.
- SNIESZKO, S. F., T. J. GRIFFIN, and S. B. FRIDDLE. 1950. A new bacterium (*Hemophilus piscium* n. sp.) from ulcer disease of trout. J. Bacteriol. 59: 699-710.
- TAYLOR, E. L., S. J. COLI, and D. R. JUNELL. 1973. Attempts to control whirling disease by continuous drug feeding. J. Wildl. Dis. 9: 302-305.