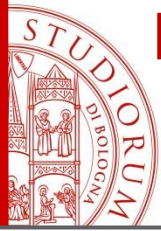


# **Sanità in trotticoltura**

## **Malattie ad eziologia virale**



**Main viral diseases in Italian trout farms**

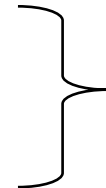


# Principali malattie virali e batteriche delle trote allevate in Italia

## ***Main infectious diseases in Italian trout farms***

### **Malattie virali – Viral diseases**

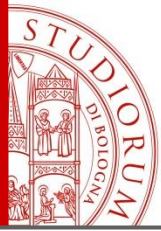
- ✓ Setticemia Emorragica Virale (SEV)  
**Viral Hemorrhagic Septicaemia (VHS)**
- ✓ Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)  
**Infective Hematopoietic Necrosis (IHN)**
- ✓ Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI)  
**Infective Pancreatic Necrosis (IPN)**



Malattie notificabili in base alla  
Direttiva 2006/88 + OIE  
OIE and 2006/88 notifiable diseases  
Rhadbovirosi dei Salmonidi

### **Malattie batteriche – Bacterial diseases**

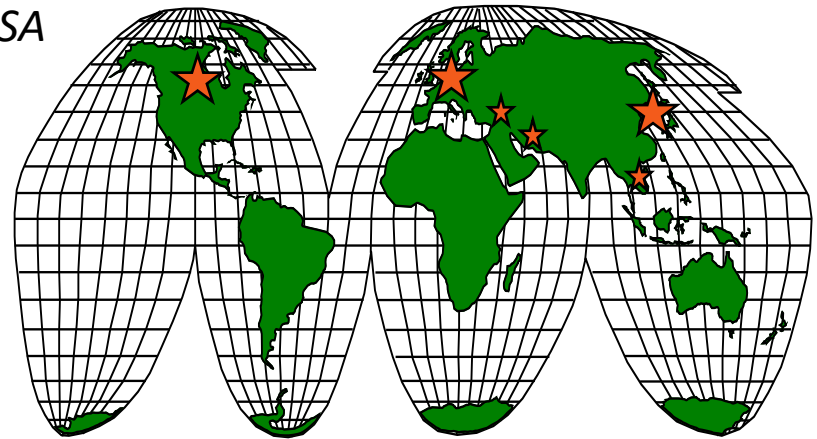
- ✓ Bocca Rossa o Yersiniosi – *Red Mouth Disease or Yersiniosis*
- ✓ Flavobatteriosi (viscerale e superficiale) – *Visceral and cutaneous Flavobacteriosis*
- ✓ Foruncolosi - *Forunculosis*
- ✓ Lattococcosi - *Lactococcosis*
- ✓ Nefrite batterica o Renibatteriosi – *Bacterial Kidney Disease*



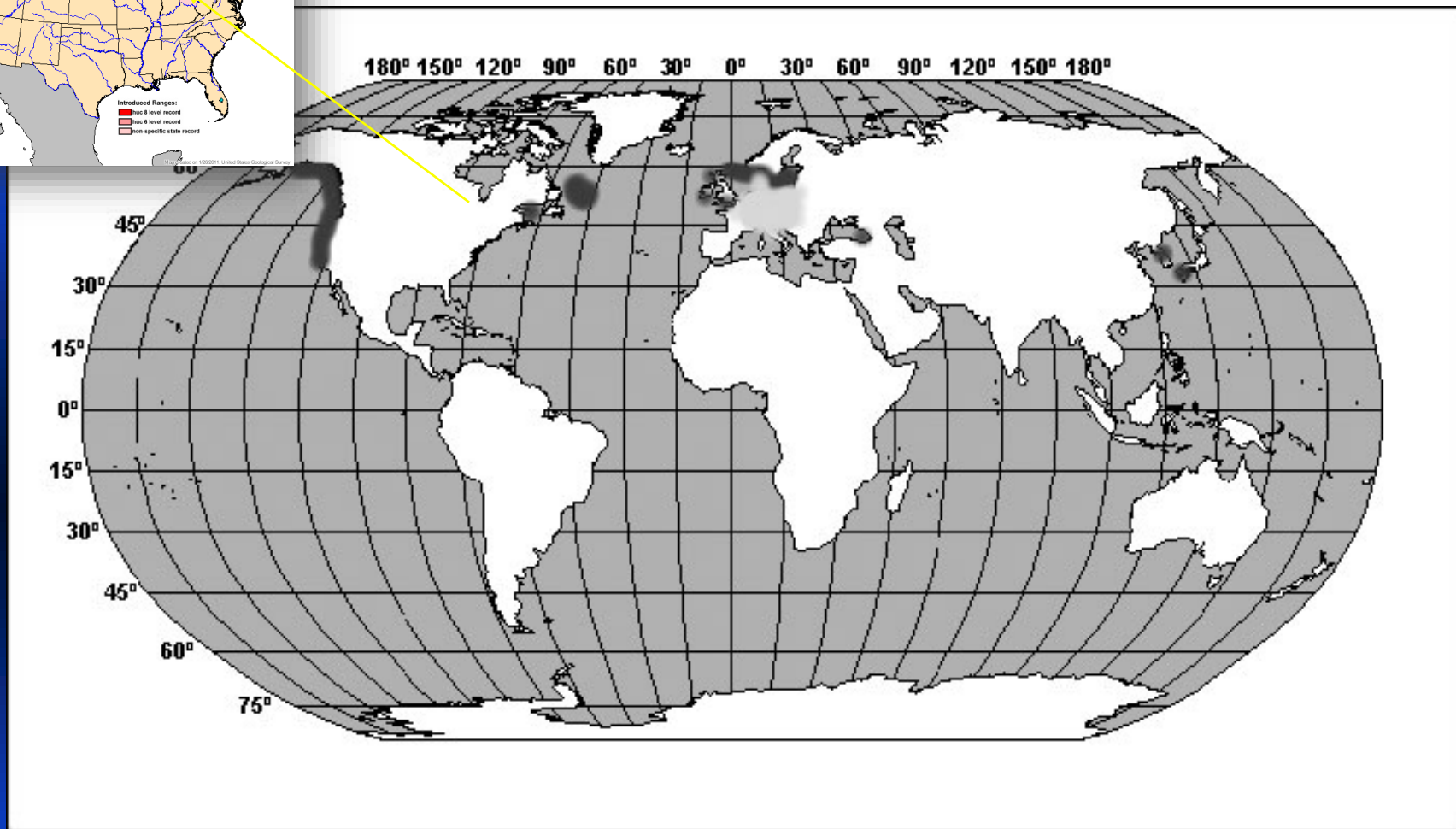
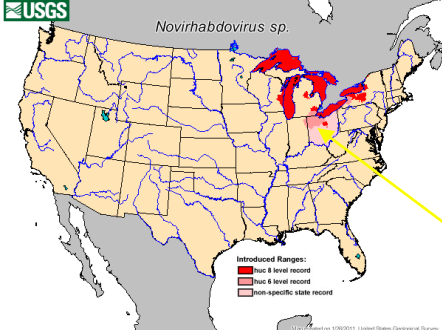
# Setticemia Emorragica Virale (SEV) o Viral Haemorrhagic Septicemia (VHS)

Grave malattia virale sistemica delle trote d'allevamento descritta in Europa a partire dal 1938  
*Severe systemic viral disease of farmed trout known in Europe since 1938*

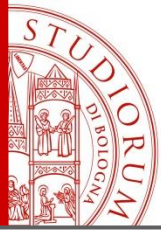
- ✓ Solo nel 1963 ne fu confermata l'eziologia virale (virus di Egtved dal nome del paese danese dove era situato l'allevamento in cui si effettuò il primo isolamento)
- ✓ *Viral etiology confirmed since 1963*
- ✓ Dalla fine degli anni '70 i primi isolamenti da pesci marini selvatici in nord Europa
- ✓ *Since '70 isolated from marine fish in Northern Europe*
- ✓ Fino al 1988 mai isolato al di fuori del territorio Europeo, poi a partire da questa data venne trovato in salmoni selvatici in USA
- ✓ *Up to 1988 never isolated out of Europe then in USA*
- ✓ Dal 1999 in Giappone e dal 2000 in Corea + Turchia e Iran
- ✓ Negli ultimi 20 anni il virus è stato isolato anche da diverse specie ittiche marine allevate
- ✓ Dal 2003 gravi epidemie in popolazioni selvatiche dei Grandi Laghi in America settentrionale



# GLOBAL DISTRIBUTION OF VHSV



La distribuzione globale di VHSV. Le aree scure sono quelle dove VHSV è stato isolato da specie ittiche marine o anadrome, le aree chiare quelle dove gli isolati "classici" patogeni per la trota iridea sono diffusi (Skall et al., 2005). Nel riquadro in alto in rosso le aree dei Grandi Laghi recentemente coinvolte da episodi epidemici in popolazioni selvatiche.



Specie ittiche da cui VHSV è stato isolato o che hanno dimostrato di essere suscettibili a VHSV con infezione sperimentale (Skall et al., 2005)

## *Freshwater fish species susceptibility*

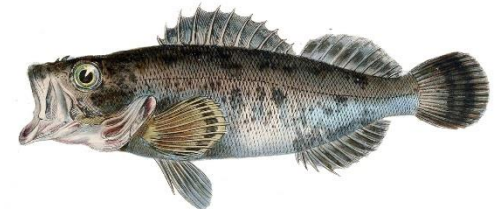
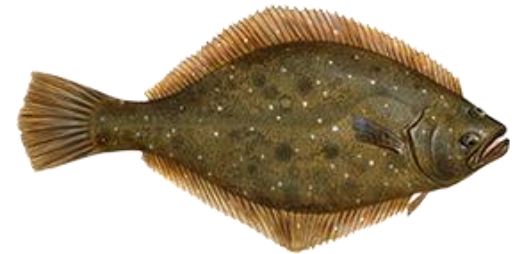
- Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) 1962 Jensen (1963)
- Brown trout, *Salmo trutta* L. 1969 de Kinkelin & le Berre (1977); Jørgensen (1980); Bovo, Zanin & Giorgetti (1982)
- Pike, *Esox lucius* L. 1978 Meier & Jørgensen (1979)
- Grayling, *Thymallus thymallus* (L.) 1979 Wizigmann, Baath & Hoffmann (1980)
- Whitefish, *Coregonus* sp. 1984 Ahne & Thomsen (1985); Meier et al. (1986)
- European eel, *Anguilla anguilla* (L.) 1987 Castric et al. (1992)
- Largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacepéde) 1998 de Kinkelin, Daniel, Hattenberger-Baudouy & Benmansour (1999)

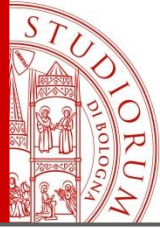


# **Specie marine allevate suscettibili a VHSV**

## *Marine fish species susceptibility*

- Turbot, *Psetta maxima* (L.) 1991 Schlotfeldt et al. (1991)
- Atlantic salmon, *Salmo salar* L. 1986,1995 Jimenez de la Fuente et al. (1988); Traxler et al. (1995)
- Japanese halibut, *Paralycthis olivaceus* Isshiki et al. (2001); Kim et al. (2003)
- Rockfish, *Sebastes inermis* Cuvier Isshiki et al. (2003)





# Specie ittiche suscettibili sperimentalmente

## *Fish species susceptible by experimental infection*

---

- Brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) Rasmussen (1965)
- Golden trout, *Oncorhynchus aguabonita* (Jordan) Ahne, Negele & Ollenschlager (1976)
- Rainbow trout x coho salmon Ord, Le Berre & de Kinkelin (1976)
- European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) Castric & de Kinkelin (1984)
- Lake trout, *Salvelinus namaycush* (Walbaum) Dorson, Chevassus & Torhy (1991)
- Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.) Snow et al. (1999a); Bowden (2003)
- Black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii* (Bleeker) Isshiki et al. (2003)
- Red spotted grouper, *Epinephelus akaara* (Temminck & Schlegel) Isshiki et al. (2003)
- Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegelii* Hilgendorf Isshiki et al. (2003)
- Red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) Ito et al. (2004)
- Japanese amberjack (Yellowtail), *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel Ito et al. (2004)

+ oltre 40 specie marine selvatiche (in diverse aree dell'emisfero settentrionale) e 25 specie dulciacquicole selvatiche (USA)

+ *more than 60 wild fish species*

# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

Possono manifestarsi infezioni acute, sub-acute/croniche e nervose (che possono manifestarsi contemporaneamente in allevamento in soggetti diversi)

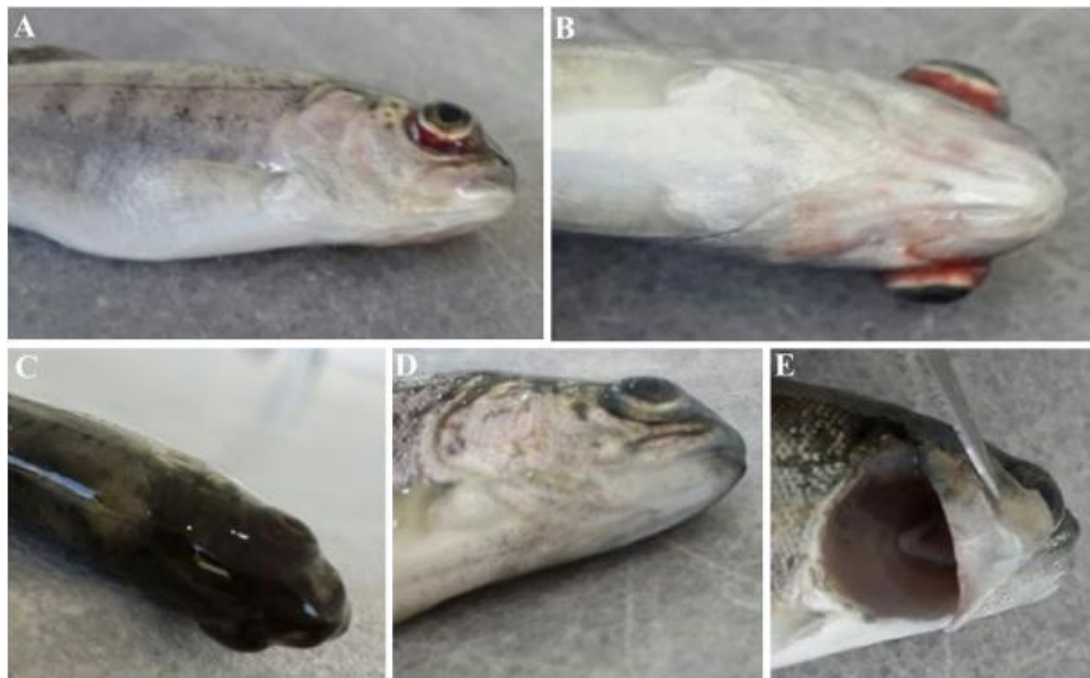
*Course of the disease could be acute, sub-acute/chronic and/or nervous or a mix of them in a farm*

**Segni esterni** – *External signs*

**Forma acuta** – *Acute form*

Letargia, melanosi, esoftalmo, emorragie ed anemia branchiali ed endoculari/perioculari

*Lethargy, melanosis, exophthalmia, gill hemorrhages and anemia, endocular/periocular hemorrhages*



Acta Tropica Volume 156, April 2016, Pages 30-36



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

Forma sub-acute/cronica - *Sub-acute-chronic course*

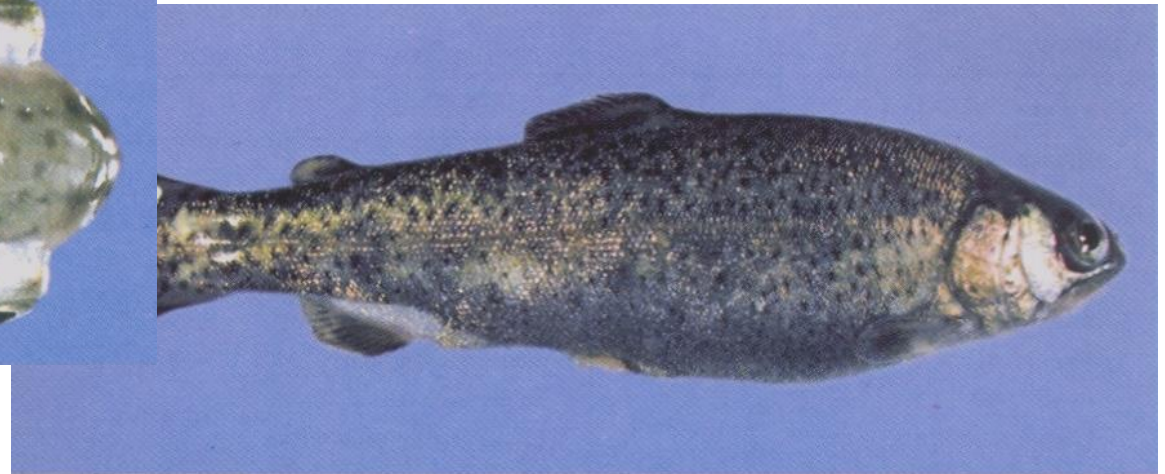
Segni esterni poco apprezzabili, melanosi e esoftalmo.

*External signs less evident, melanosis*

Forma nervosa – *Nervous symptoms*

Alterazioni del nuoto: nuoto a spirale e flashing.

*Abnormal swimming behavior, flashing*



- **Segni interni**

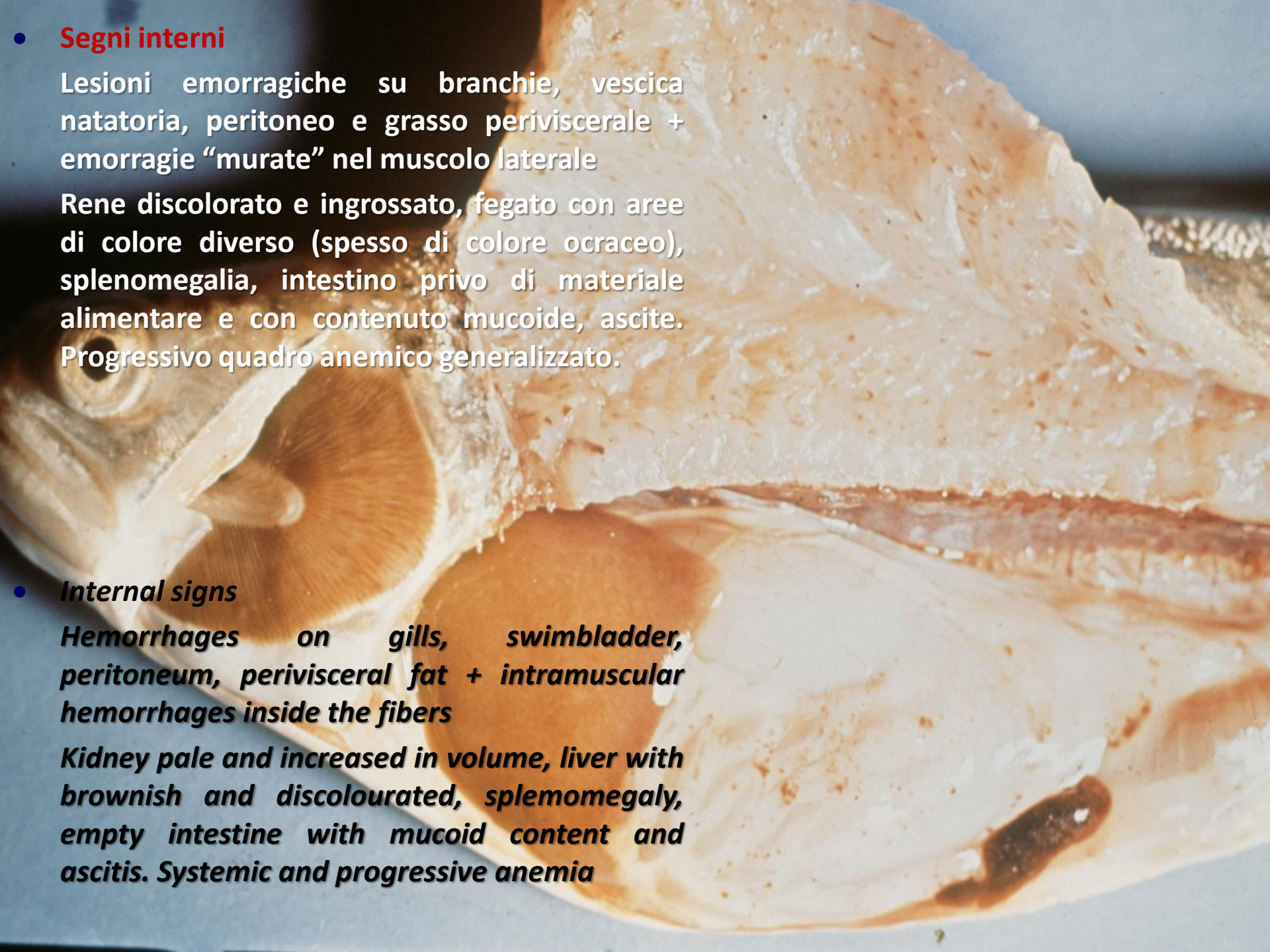
Lesioni emorragiche su branchie, vescica natatoria, peritoneo e grasso periviscerale + emorragie “murate” nel muscolo laterale

Rene discolorato e ingrossato, fegato con aree di colore diverso (spesso di colore ocraceo), splenomegalia, intestino privo di materiale alimentare e con contenuto mucoide, ascite. Progressivo quadro anemico generalizzato.

- ***Internal signs***

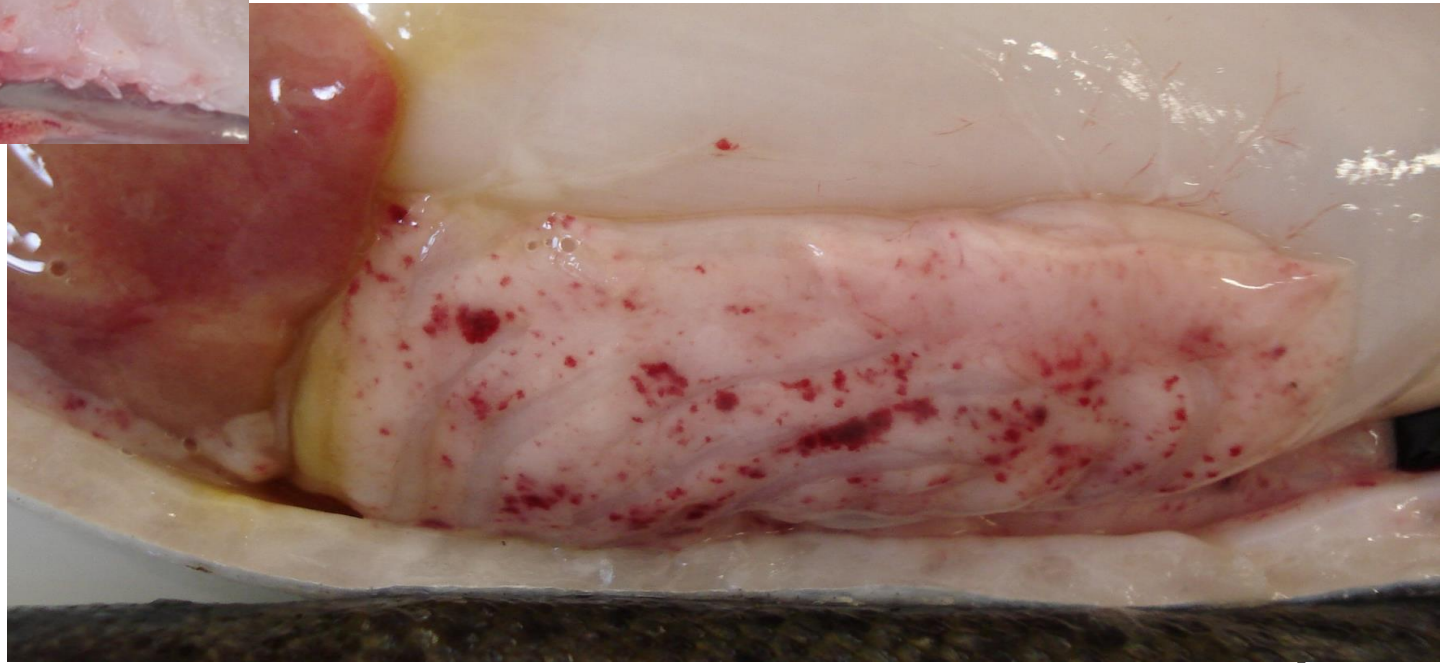
***Hemorrhages on gills, swimbladder, peritoneum, perivisceral fat + intramuscular hemorrhages inside the fibers***

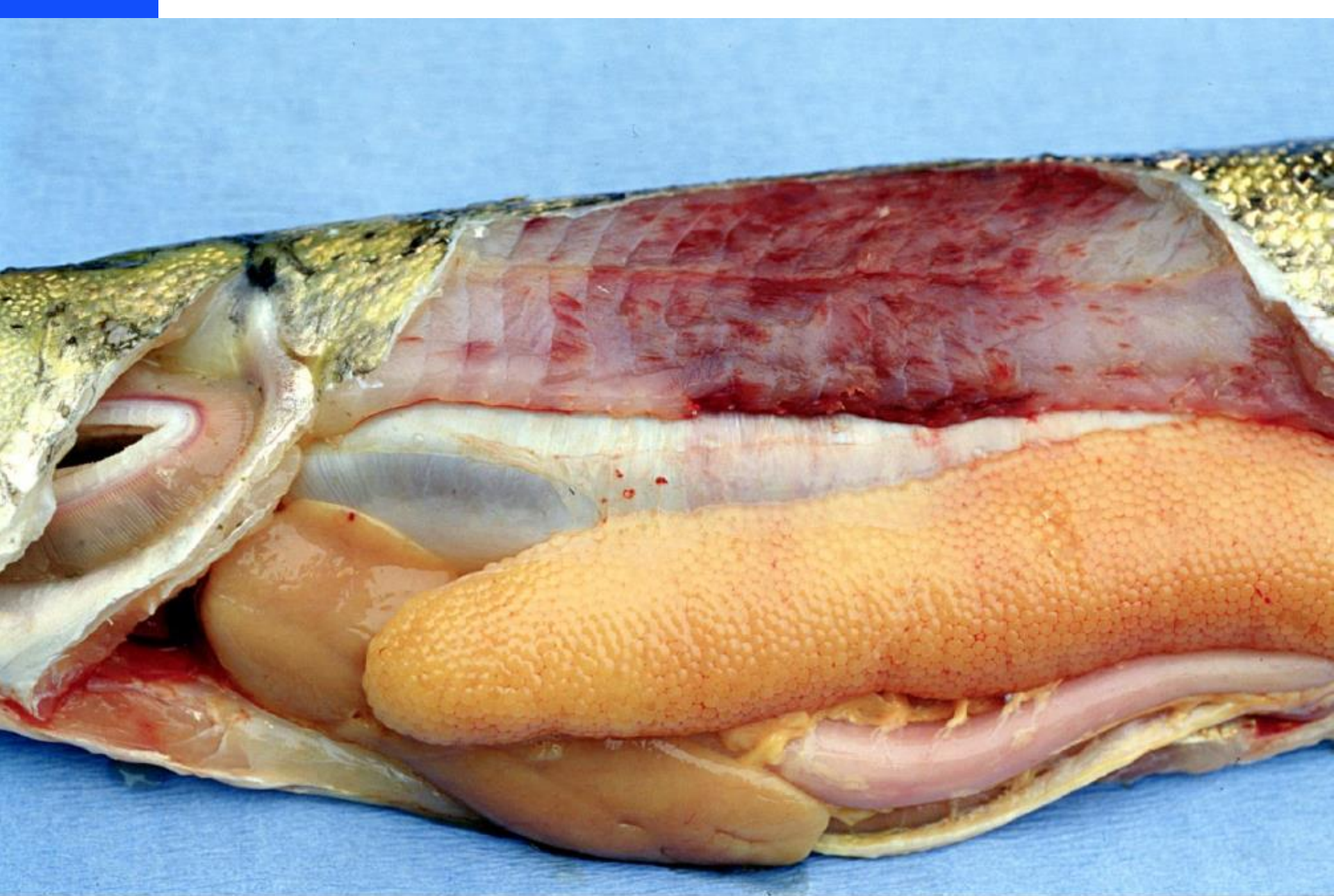
***Kidney pale and increased in volume, liver with brownish and discoloured, splenomegaly, empty intestine with mucoid content and ascitis. Systemic and progressive anemia***



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

Setticemia Emorragica Virale (SEV)





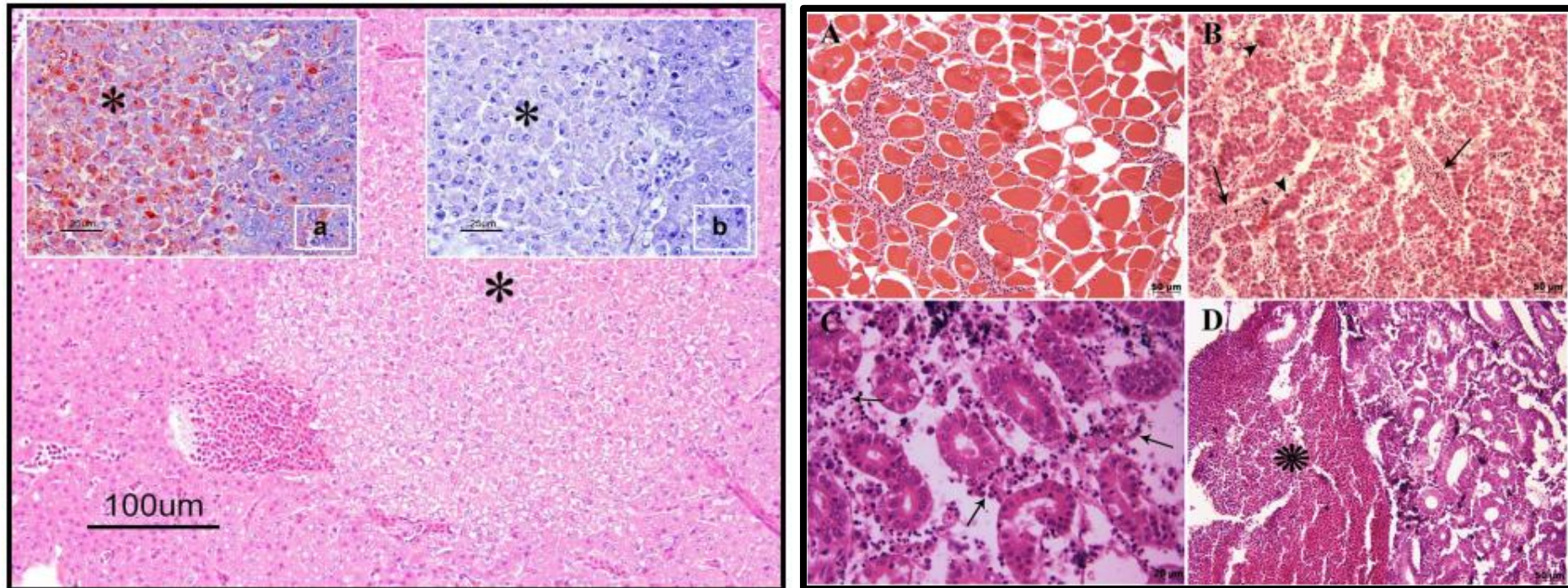
Setticemia Emorragica Virale in luccio (foto Dr. Prearo)

# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

- Lesioni microscopiche – *Microscopical lesions*

Necrosi ed emorragie soprattutto a livello di rene, milza, fegato e muscolo (molto simili a quelle osservabili in corso di Necrosi Ematopoietica Infettiva)

*Very similar aspect to IHN with necrosis and hemorrhages in kidney, spleen and muscle*



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

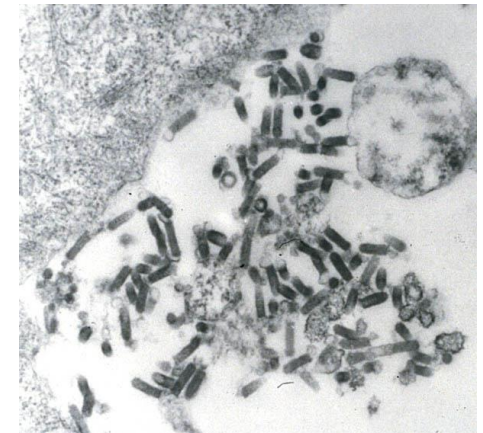
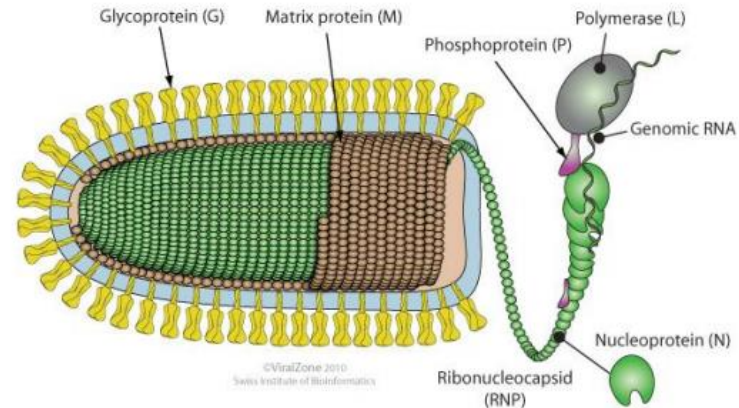
## Caratteristiche del virus Viral features

### Rna virus

#### Morfologia del virione

Tipico Rhabdoviridae con forma "a proiettile"

Dimensioni: 170-180 x 60-70 nm



### Tassonomia - Taxonomy

- Famiglia *Rhabdoviridae*
- Genere *Novirhabdovirus*
- Specie *Viral hemorrhagic septicemia virus* (VHSV) (Egtved virus)

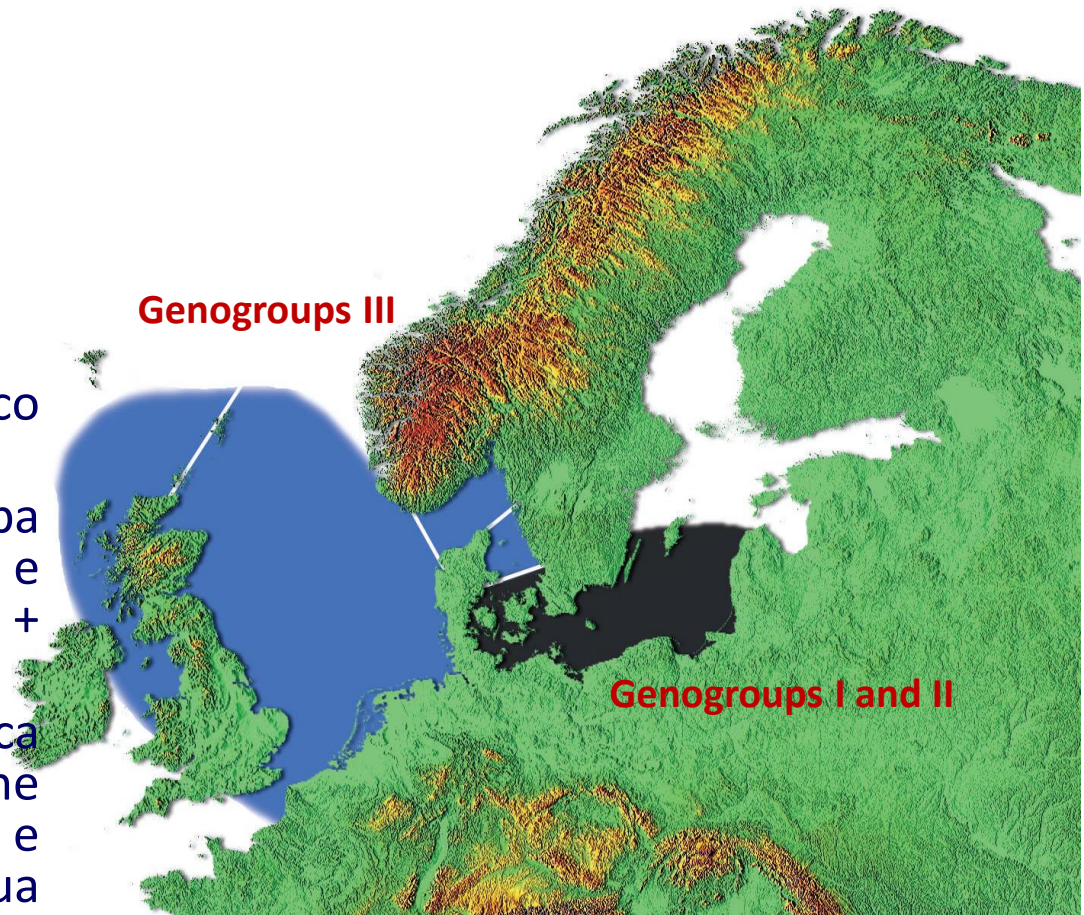
# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

3 Sierotipi -3 serotypes

4 genotypes

4 Genotipi distinti:

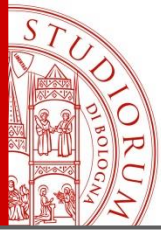
- Genotipo I – **Europa**
- (A- trota e B- pesci marini)
- Genotipo II – Mar Baltico (pesci marini)
- Genotipo III – Europa settentrionale (North Sea) e Atlantico orientale (rombi + marini + anguilla)
- Genotipo IV – a) America settentrionale aree pacifiche + Giappone (pesci marini e salmone) e Corea b) acqua dolce, Grandi Laghi





**Probabile origine dei ceppi europei di acqua dolce dal Mar Baltico**





# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

## Epidemiologia - Epidemiology

SEV di notevole impatto soprattutto nell'allevamento della trota iridea + rombo + pesci marini selvatici

*Major impact for rainbow trout, turbot and wild marine fish*

I pesci più giovani sono più suscettibili (spt. <3-5 g anche con 100% mortalità), ma si hanno sintomi, lesioni e mortalità sebbene inferiore anche nei soggetti sub-adulti ed adulti

*Younger fish more susceptible (<3-5 g up to 100% mortality)*

Il virus è presente nelle popolazioni di pesci marini (origine dell'infezione per la trota iridea?)

La temperatura dell'acqua influenza la progressione clinica (range ottimale per lo sviluppo della malattia **4-14°C**, in genere **8-12°C**) – a 1-5°C decorso lungo con mortalità giornaliera bassa ma elevata mortalità cumulativa – a 15-18°C decorso breve con mortalità acuta ma bassa mortalità cumulativa La mortalità ha inizio 5-7 giorni post-esposizione (incubazione 1-6 settimane)

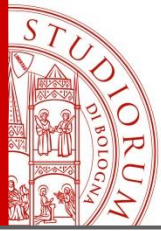
Water temperature as abiotic factor influencing the course of the disease:

*Optimal range: 4-14°C; 1-5°C: chronic course with **low** daily mortality rate and high cumulative mortality; 15-18°C shorter course with acute daily mortality and **low** cumulative mortality.*

*Mortality starts 5-7 days p.e. with an incubation period of 1-6 weeks*

Uccelli ittiofagi (spt. aironi) possono essere vettori meccanici

*Role played by fish-eating birds ad mechanical vectors*

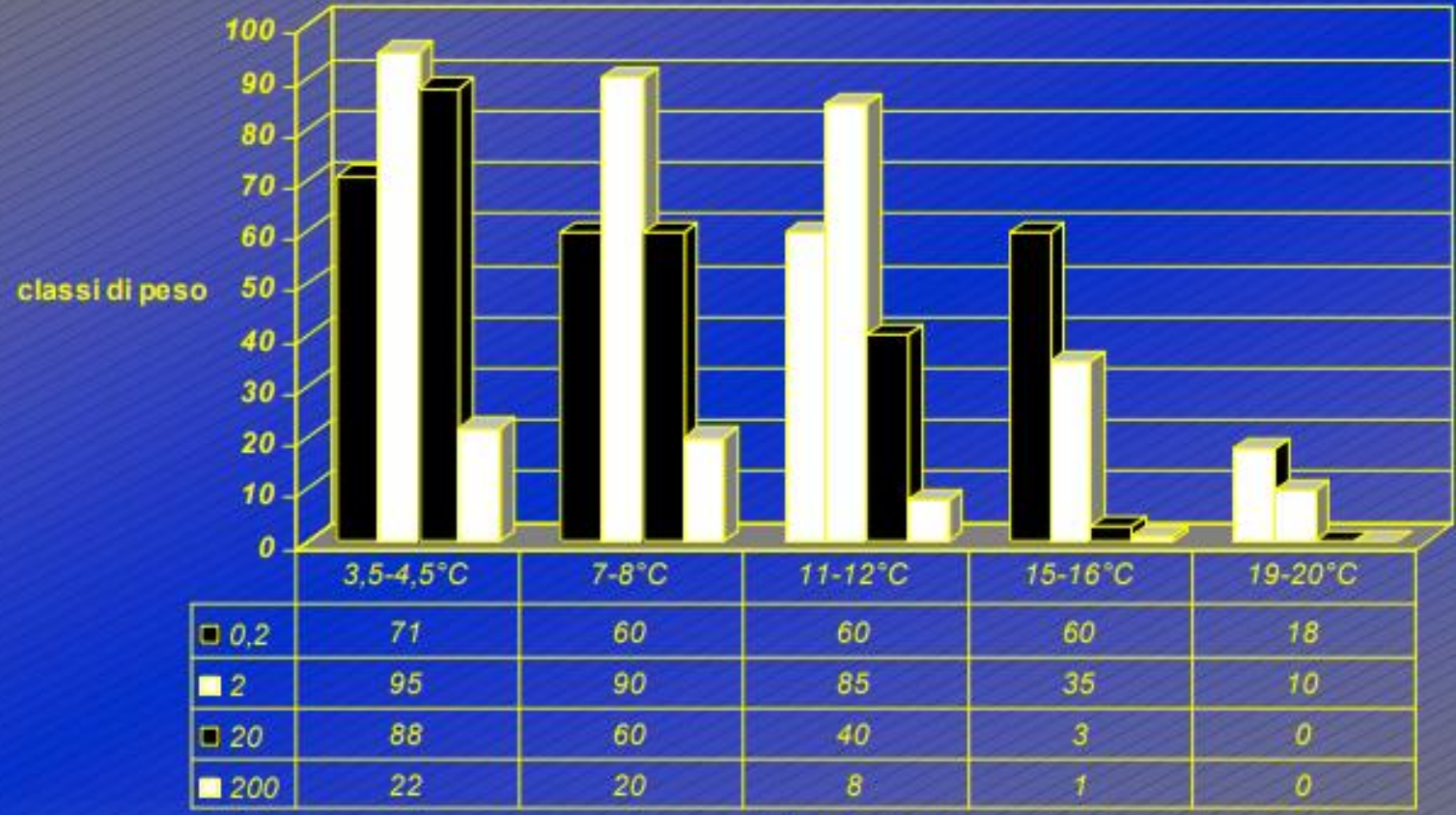


# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

Tutte la classi di età sono suscettibili

*All ages classes are susceptible*

relazione tra mortalita', peso e temperature



Fonte: IZS Venezia

# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

## Epidemiologia - *Epidemiology*

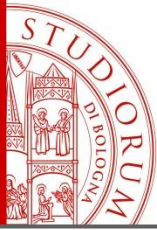


Frequenti infezioni subcliniche e stati di portatore che eliminano virus

- il virus viene eliminato con le urine + feci + fluidi gonadici
- i pesci che superano la malattia rimangono portatori per lunghi periodi
- lo stress può indurre eliminazione del virus

*Frequent sub-clinical infections and survivors that eliminate the virus for a long time through urines, feces and gonadic fluids*

*Stress as viral elimination inducer*



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

La trasmissione del virus si attua spt. per via orizzontale / contatto diretto con secreti di pesci infetti (urine + feci + fluidi ovarici/sperma, ...) / via attrezzature contaminate / via acqua

*Horizontal transmission through contact with urine, faeces, gonadal fluids*  
**FOMITES**

La trasmissione verticale non è stata dimostrata

*No vertical transmission*

Disinfezione delle uova per ridurre il rischio di trasmissione da riproduttori infetti

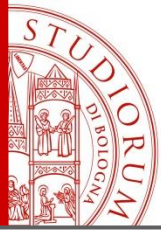
*Eggs disinfection protocols*

Sopravvive nel fango fino a 10 giorni a 4°C e nell'acqua si ha l'inattivazione del 90% dopo 14 giorni a 10°C. Sopravvivenza prolungata a -20°C

*Virus survival in the mud for 10 days at 4°C, 90% in the water for 14 days at 10°C.*  
*Long persistence at -20°C*

Il virus può essere veicolato per 10-20 km in acqua di fiume

*Virus can spread through water for 10-20km*



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

## Diagnosi

Segni clinici ed anatomo-patologici tipici

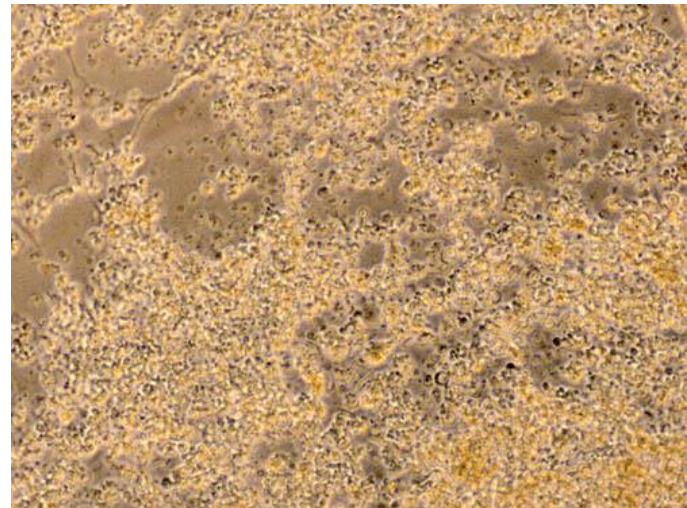
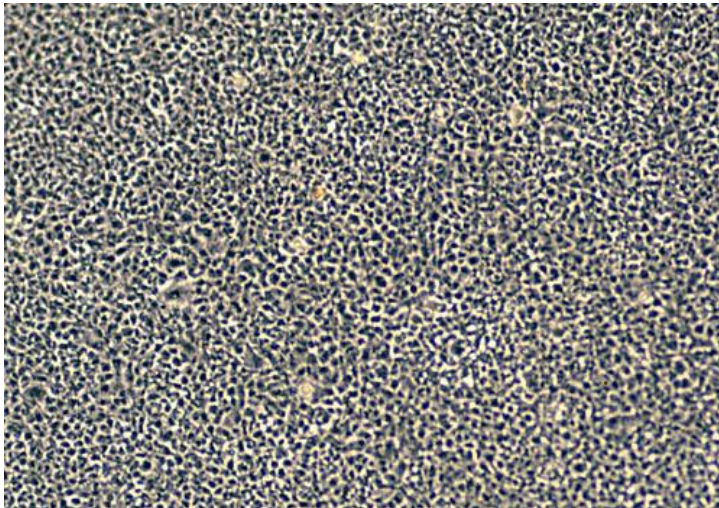
*Typical clinical symptoms and pathological signs*

Isolamento su linee cellulari- Centrarchidi, Salmonidi e ciprinidi (BF-2, CHSE-214 e RTG-2 o EPC e FHM) - *Cells lines isolation*

Effetto citopatico (EC) 3-6 giorni (15°C) (clusters di cellule arrotondate)

Identificazione con siero neutralizzazione, IFA, immunostaining, ELISA, blotting o RT-PCR

**METODI UFFICIALI SU “AQUATIC MANUAL” DELL’OIE – validated methods on the Aquatic Manual**





# ISOLAMENTO VIRALE

## *VIRAL ISOLATION ON CELLS CULTURE*

---

L'isolamento virale è condotto inoculando monostrati di cellule sensibili con l'estratto ottenuto da pool di organi:

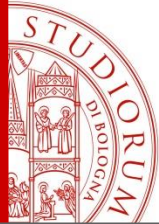
RENE ANTERIORE

MILZA

CERVELLO

CUORE

I monostrati inoculati sono incubati a temperature idonee ed osservati per la comparsa di ECP



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

## Prevenzione e Controllo

Ripopolamento solo con pesci/uova da aziende riconosciute

*Restocking only with fish/eggs from A category farms*

Evitare l'utilizzo di acqua contaminate

*Water virus-free*

- Utilizzare acqua di pozzo
- Well water/spring water
- Trattamento dell'acqua in entrata con UV (praticabile solo per avannotterie)
- UV water treatment (feasible only for hatcheries)
- Assenza di pesci infetti/specie suscettibili nelle acque utilizzate per alimentare l'allevamento
- No wild fish of susceptible species upstream

Buone pratiche igienico-sanitarie (pulizia, disinfezione, vuoto sanitario)

Good hygiene practices

Ingresso ristretto a personale/mezzi autorizzati

*Biosecurity measures on entrance  
and fish eating birds*

Protezione da uccelli ittiofagi

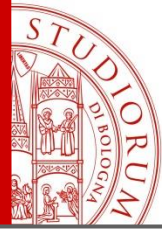
# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

## Disinfezione delle uova – *Eggs disinfections*

- Gli iodofori inattivano VHSV in 4 minuti a 100 ppm sia in condizioni di acqua pulita che di acqua sporca - *Iodophores: effective at 100 ppm for 4'*
- Con 50 ppm per 30 minuti si è osservato un residuo di infettività solo in condizioni di acqua "sporca" – in "dirty water" residual infectivity at 50 ppm for 30'







## Tempo approssimativo richiesto per l'inattivazione di almeno il 99,9% di VHSV quando esposto a differenti agenti (Vestergaard-Joergensen, 1974; Roberts, 1978)

Esposizione a:	Tempo
50% etere etilico	<1 ora
50% cloroformio	<1 ora
50% glicerolo	1-2 sett.
2% formalina	<5 min.
pH 2,5	10 min.
pH 12,2	2 ore
70°C	<1 min.
50°C	<10 min.
30°C	<24 ore
20°C	<4 sett.
4°C	diversi mesi
-20°C	diversi anni
Essiccato a 4°C	1 sett.
In acqua a 14°C	>24 ore
In carcassa di trota a 20°C	<48 ore
In carcassa di trota a 4°C	1 sett.
In carcassa di trota a -20°C	diversi mesi

## Risultati di prove di inattivazione di VHSV. 1

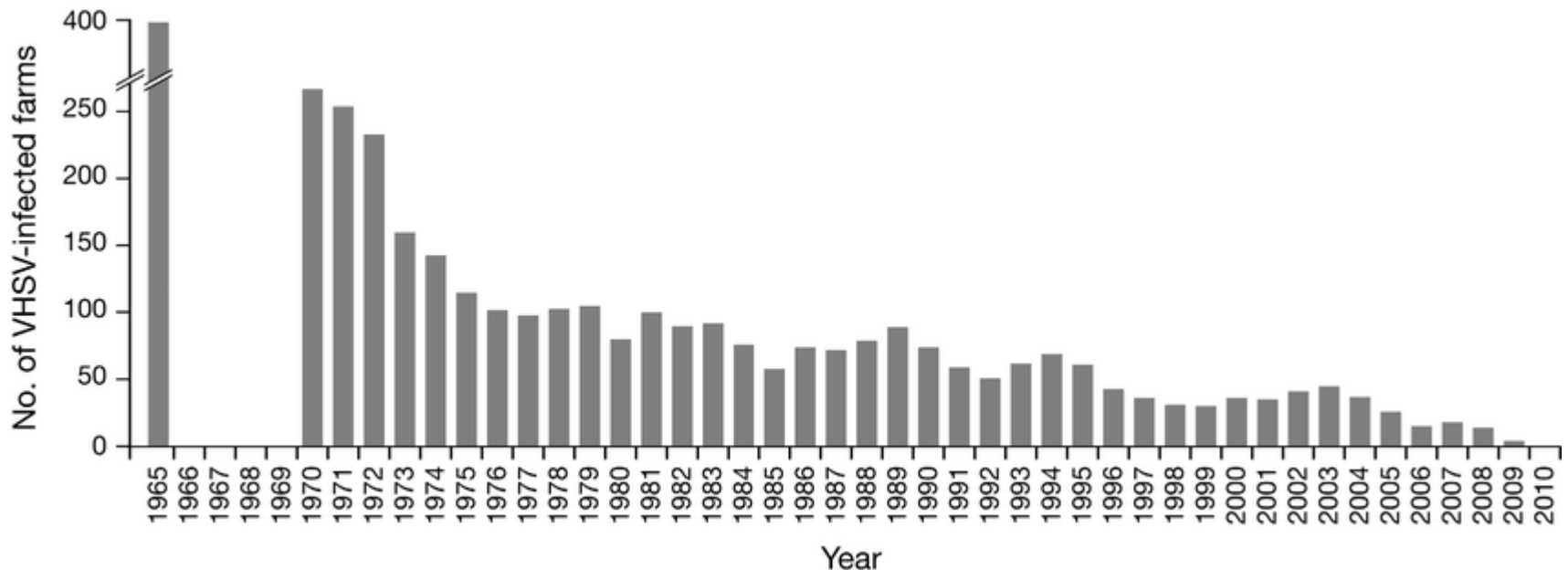
Metodo	Dose	Tempo di contatto	Risultato /Riduzione titolo	Mezzo/ temperatura	Referenza
Calore	30°C	24 ore	99,9%		Vestergård-Jørgensen, 1974
	50°C	10 min	99,9%		Vestergård-Jørgensen, 1974
	70°C	1 min	99,9%		Vestergård-Jørgensen, 1974
UV-C	7,9 mJ		99,9%	acqua dolce	Øye & Rimstad, 2001
Acidi	pH 2,5	10 min	99,9%		Vestergård-Jørgensen, 1974
	pH 3	60 min	99,9%		Ahne, 1982
	pH 3	180 min	Inattivato		Ahne, 1982
NaOH	pH 12	5-10 min	Inattivato	2%	Ahne, 1982
	pH 12,2	2 ore	99,9%		Vestergård-Jørgensen, 1974
Cloro	7,6 mg/l	10 min	99	10°C	Ahne, 1982
	25-54 mg/l	5 min	99	10°C	Ahne, 1982
	98 mg/l	2 min	99	10°C	Ahne, 1982
	25-98 mg/l	10 min	99	10°C, 2,5% FCS	Ahne, 1982
	515 mg/l	2 min	99	10°C, 2,5% FCS	Ahne, 1982
Formalina	2%	5 min	99.9%		Jørgensen, 1973
	3%	5 min	Inattivato	10% FCS	Ahne, 1982
Metanolo	40%	300 sec	Inefficace	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	40%	300 sec	Inefficace	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Etanolo	40%	300 sec	Inefficace	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	40%	120 sec	Inattivato	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Propanolo	30%	30 sec	Inattivato	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	20%	120 sec	Inattivato	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002

## Risultati di prove di inattivazione di VHSV. 2

Metodo	Dose	Tempo di contatto	Risultato /Riduzione titolo	Mezzo/ temperatura	Referenza
Fenolo	2,5%	5 min	Inattivato	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	2,5%	5 min	Inattivato	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Cresolo	0,1%	5 min	Inattivato	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	0,25%	15 min	Inattivato	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Sali quaternari d'ammonio	1%	6 ore	Inefficace		Ahne, 1982
	1:1000	30 min	Efficace	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	1:1000	5 min	Efficace	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Iodofori	100 ppm	4 min	Inattivato		Ahne & Held, 1980
	50 ppm	1 min	Efficace	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	50 ppm	1 min	Efficace	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Ipoclorito di sodio	50 ppm	1 min	Efficace	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	100 ppm	5 min	Efficace	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002
Bleaching powder	50 ppm	2,5 min	Efficace	PBS, 15°C	Kurita, 2002
	50 ppm	60 min	Efficace	acqua marina, 15°C	Kurita, 2002

# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

- Malattia notificabile in base alla Direttiva 2006/88 (Allegato IV, parte II, tra le malattie non esotiche)
- *Notifiable not exotic disease for EC Directive 2006/88*
- Successo di campagne di eradicazione (es. Danimarca da oltre 560 allevamenti infetti nel 1965 a poche decine nel 2004 ed ora indenne)
- *Successful eradication in Denmark*



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

- Vaccini sperimentali efficaci ma non autorizzati
- *Vaccines are effective but not authorized*
- In caso di malattia: riduzione della densità di biomassa e delle attività stressanti (manipolazioni, selezioni, ecc.)
- During disease, biomass and stress reduction helps to limit the impact
- Aumento della temperatura (non applicabile)
- Increase of water temperature not feasible for trouts

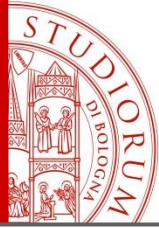


□ Malattia notificabile

The recommendations in this Chapter apply to: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), brown trout (*Salmo trutta*), grayling (*Thymallus thymallus*), white fish (*Coregonus* spp.), pike (*Esox lucius*), turbot (*Scophthalmus maximus*), herring and sprat (*Clupea* spp.), Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.), Atlantic cod (*Gadus morhua*), Pacific cod (*G. macrocephalus*), haddock (*G. aeglefinus*) and rockling (*Onos mustelus*). These recommendations also apply to any other *susceptible species* referred to in the *Aquatic Manual* when traded internationally.

**Importation or transit of aquatic animals and aquatic animal products for any purpose from a country, zone or compartment not declared free from viral haemorrhagic septicaemia**

1. *Competent Authorities* should not require any VHSV related conditions, regardless of the VHSV status of the *exporting country, zone or compartment* when authorising the importation or transit of the following *aquatic animals and aquatic animal products* from the species referred to in Article 10.9.2. intended for any purpose and complying with Article 5.3.1.:
  - a) heat sterilised, hermetically sealed fish products (i.e. a heat treatment at 121°C for at least 3.6 minutes or any time/temperature equivalent);
  - b) pasteurised fish products that have been subjected to a heat treatment at 90°C for at least 10 minutes (or to any time/temperature equivalent which has been demonstrated to inactivate VHSV);
  - c) mechanically dried, eviscerated fish (i.e. a heat treatment at 100°C for at least 30 minutes or any time/temperature equivalent which has been demonstrated to inactivate VHSV);
  - d) naturally dried, eviscerated fish (i.e. sun-dried or wind-dried);
  - e) fish oil;
  - f) fish *meal*; and
  - g) fish skin leather.



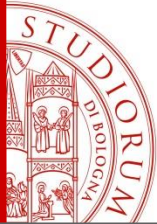
# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

Per tutti gli altri scopi le Autorità Competenti possono chiedere certificazioni specifiche relative all'indennità per VHS al paese da cui importa richiedendo un "international aquatic animal health certificate" sullo stato di indennità (ad eccezione delle "commodities" prima riportate)

Quando si importano pesci vivi da Paesi, zone e/o compartimenti non indenni, le Autorità Competenti dovranno definire i rischi e, quando giustificati, adottare precauzioni (sistema chiuso, trattamenti dei reflui, ecc.) a meno che non si intenda stabilire un nuovo "stock" ed allora si dovranno seguire le indicazioni del Code of Practice on the Introductions and Transfers of Marine Organisms dell'ICES (International Council for the Exploration of the Sea)

Anche in caso di importazione di pesci morti (eviscerati o meno) da paesi non dichiarati indenni da VHS vanno applicate misure che mitighino i rischi di infezione/diffusione (consegna diretta, misure di biosicurezza/quarantena e trattamento di reflui/rifiuti)

In caso di importazione di uova disinfettate da Paesi, zone e/o compartimenti non indenni, le Autorità competenti del paese importatore dovranno definire i rischi e applicare eventuali misure di precauzione (disinfezione, isolamento, nuova disinfezione all'arrivo...)



# VHS – Aquatic code

## Article 10.9.8.

Importation of live aquatic animals for aquaculture from a country, zone or compartment not declared free from viral haemorrhagic septicaemia

1. When importing, for *aquaculture*, live *aquatic animals* of the species referred to in Article 10.9.2. from a country, *zone* or *compartment* not declared free from VHS, the *Competent Authority* of the *importing country* should assess the *risk* and, if justified, apply the following *risk* mitigation measures:

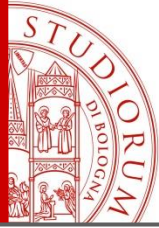
1. the direct delivery to and lifelong holding of the consignment in biosecure facilities for continuous isolation from the local environment; and
2. the treatment of all effluent and waste material in a manner that ensures inactivation of VHSV.

2. If the intention of the introduction is the establishment of a new stock, the Code of Practice on the Introductions and Transfers of Marine Organisms of the International Council for the Exploration of the Seas (ICES) should be followed.

3. For the purposes of the *Aquatic Code*, the ICES Code (full version see: <http://www.ices.dk/indexfla.asp>) may be summarised to the following main points:

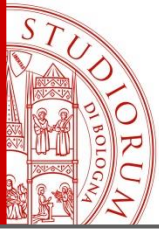
1. identify stock of interest (cultured or wild) in its current location;
2. evaluate stock health/disease history;
3. take and test samples for VHSV, pests and general health/disease status;
4. import and quarantine in a secure facility a founder (F-0) population;
5. produce F-1 generation from the F-0 stock in *quarantine*;
6. culture F-1 stock and at critical times in its development (life cycle) sample and test for VHSV and perform general examinations for pests and general health/disease status;
7. if VHSV is not detected, pests are not present, and the general health/disease status of the stock is considered to meet the *basic biosecurity conditions* of the *importing country*, *zone* or *compartment*, the F-1 stock may be defined as VHS free or specific pathogen free (SPF) for VHSV;
8. release SPF F-1 stock from *quarantine* for *aquaculture* or stocking purposes in the country, *zone* or *compartment*.





# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

- Inclusa nell'art. 1 del RPV con OM 10/05/1991 (malattia denunciabile)
- **2006/88 CE: inclusa nell'elenco delle malattie non esotiche (Allegato IV, parte II) - notificabile**
  - Il territorio di un paese membro viene suddiviso in zone o compartimenti riconosciuti o non riconosciuti
  - Per essere riconosciuta una zona/compartimento deve possedere questi requisiti:
  - non devono essere presenti specie sensibili alla malattia
  - 
  - l'agente patogeno non è in grado di sopravvivere nelle sue acque
  - 
  - a) se non è stato riscontrato nessun caso di malattia per almeno 10 anni prima della data di applicazione pur essendo presenti specie sensibili (in tal caso in quest'arco di tempo si deve dimostrare di aver rispettato condizioni di biosicurezza, che l'infezione non sia notoriamente presente nei selvatici e che siano state applicate a scambi ed importazioni misure atte a prevenire la diffusione);



# VHS – EC Dir. 2006/88

## CHAPTER VII

### DISEASE-FREE STATUS

#### Article 49

##### *Disease-free Member State*

1. *A Member State shall be declared free of one or more of the non-exotic diseases listed in Part II of Annex IV in accordance with the procedure referred to in Article 62(2), if para-graph 2 of this Article is complied with and:*

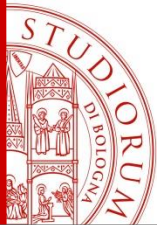
*(a) none of the species susceptible to the disease(s) in question is present in its territory;*

*Or*

*(b) the pathogen is known not to be able to survive in the Member State, and in its water source;*

*Or*

*(c) the Member State meets the conditions laid down in Part I of Annex V.*



# VHS – EC Dir. 2006/88

## ANNEX V

*Requirements for declaring a Member State, zone or compartment disease-free*

### PART I

*Disease-free Member State*

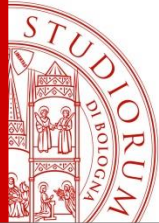
#### 1. *On historical grounds*

*1.1. A Member State where susceptible species are present, but where there has not been any observed occurrence of the disease for at least for a period of 10 years before the date of application for the disease-free status despite conditions that are conducive to its clinical expression may be considered disease-free where:*

*(a) basic biosecurity measure conditions have been in place continuously for at least a period of 10 years before the date of application for the disease-free status;*

*(a) infection is not known to be established in wild populations;*

*(b) the implementation of trade and imports conditions to prevent the introduction of the disease into the Member State is effective.*

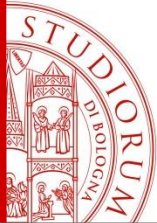


# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

---

Se è stato riscontrato l'ultimo caso di malattia negli ultimi 10 anni o non è nota la situazione (in tal caso in quest'arco di tempo deve dimostrare di aver rispettato condizioni di biosicurezza e che sia in atto da almeno 2 anni un sistema di sorveglianza mirata (che può estendersi anche ai selvatici) senza individuare la presenza del patogeno.

Gli stessi requisiti vengono richiesti a compartimenti costituiti da una o più aziende il cui stato sanitario dipende da quello del sistema idrico circostante.



# VHS – EC Dir. 2006/88

*Based on targeted surveillance*

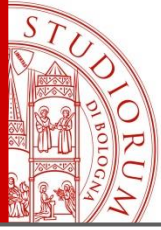
*A Member State where the last known clinical occurrence was within 10 years before the date of application for the disease-free status or where the infection status prior to targeted surveillance was unknown, for example because of the absence of conditions conducive to clinical expression, may be considered free of the specific disease where:*

*(a) the Member State meets the basic disease control conditions laid down in point 1.2;*

*And*

*(b) targeted surveillance in accordance with methods adopted pursuant to Article 49(3), has been in place for at least a period of two years without detection of the disease agent on farm, or in mollusc farming areas that rears any of the susceptible species.*

*Where there are parts of the Member State in which the number of farms, or mollusc farming areas is limited, and consequently targeted surveillance in these parts do not provide sufficient epidemiological data, but in which there are wild populations of any of the susceptible species, those wild populations shall be included in the targeted surveillance.*



# Setticemia Emorragica Virale (SEV)

Le nuove aziende il cui stato sanitario non dipende da quello del sistema idrico circostante possono essere considerate riconosciute se presentano questi requisiti:

- rifornirsi di acqua tramite un impianto di trattamento in grado di inattivare l'agente patogeno o utilizzare acqua di pozzo o di sorgente;
- possedere un sistema che ostacoli l'ingresso di pesci selvatici in azienda;
- sia protetta da inondazioni o infiltrazioni dal sistema idrico circostante;
- introduzione solo di pesci provenienti da aziende riconosciute.

## *SEZIONE 4*

### ***Misure di lotta minime in caso di conferma di malattie non esotiche negli animali d'acquacoltura***

#### *Articolo 38*

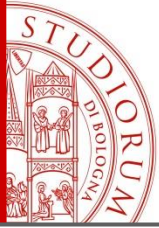
#### **Disposizioni di carattere generale**

1. In caso di confermata presenza di una delle malattie non esotiche elencate nell'allegato IV, parte II in uno Stato membro, una zona o un compartimento non dichiarati indenni da tale malattia, lo Stato membro interessato a) applica le misure contemplate dalla sezione 3 per riottenere lo status di indenne da tale malattia;

Oppure b) elabora un programma di eradicazione conformemente all'articolo 44, paragrafo 2.

2. In deroga all'articolo 34, paragrafo 2, quando uno Stato membro decide di applicare le misure contemplate dalla sezione 3, esso può consentire che animali clinicamente sani raggiungano la taglia commerciale prima dell'abbattimento per il consumo umano o siano trasportati in un'altra zona o compartimento infetti. In questi casi sono adottate misure volte a ridurre, e per quanto possibile ad evitare, l'ulteriore diffusione della malattia.

3. Qualora lo Stato membro interessato non intenda riottenere lo status di indenne da malattia, si applicano le disposizioni di cui all'articolo 39.



# VHS – EC Dir. 2006/88

## SECTION 4

*Minimum control measures in the case of confirmation of non-exotic diseases in aquaculture animals*

### *Article 38*

#### *General provisions*

*1. In the case of confirmation of a non-exotic disease listed in Part II of Annex IV in a Member State, zone or compartment declared free of that disease, the Member State concerned shall either:*

*(a) apply the measures provided for in Section 3 in order to regain such disease-free status,*

*or*

*(b) draw up an eradication programme in accordance with Article 44(2).*

*2. By way of derogation from Article 34(2), where a Member State decides to apply the measures provided for in Section 3, it may allow clinically healthy animals to be raised to market size before slaughter for human consumption or to be moved to another infected zone or compartment. In such cases, measures shall be taken to reduce and as far as possible, prevent the further spreading of the disease.*

*3. Where the Member State concerned does not wish to regain disease-free status, Article 39 shall apply.*



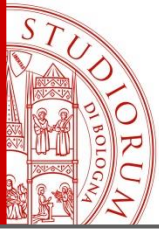
## *Articolo 39*

### **Misure di contenimento**

In caso di confermata presenza di una delle malattie non esotiche elencate nell'allegato IV, parte II in uno Stato membro, una zona o un compartimento non dichiarati indenni da tale malattia, lo Stato membro interessato adotta misure atte a contenere la diffusione della malattia.

Tali misure consistono almeno:

- a) nel dichiarare l'azienda o la zona destinata a molluschicoltura azienda o zona infetta;
- b) nel creare un'idonea zona di protezione della malattia in questione, che comprenda una zona destinata a protezione e sorveglianza intorno all'azienda o alla zona destinata a molluschicoltura dichiarata infetta;
- c) nel limitare la movimentazione degli animali d'acquacoltura dalla zona di protezione; tali animali possono essere unicamente:
  - i) introdotti in aziende o zone in conformità dell'articolo 12, paragrafo 2;
  - o
  - ii) raccolti e abbattuti per il consumo umano in conformità dell'articolo 33, paragrafo 1;
- d) nel rimuovere e smaltire, entro un idoneo periodo di tempo, i pesci e crostacei morti, sotto il controllo dell'autorità competente, [...], in relazione al tipo di produzione e al rischio di ulteriore diffusione della malattia.



# VHS – EC Dir. 2006/88

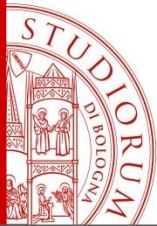
## Article 39

### Containment measures

*In the case of confirmation of a non-exotic disease listed in Part II of Annex IV in a Member State, zone or compartment not declared free of that disease, the Member State concerned shall take measures to contain the disease.*

*Those measures shall at least consist of:*

- (a) declaring the farm or mollusc farming area to be infected;*
- (b) establishing a containment area appropriate to the disease in question, including a protection zone and surveillance zone around the farm or mollusc farming area declared infected;*
- (c) restricting the movement of aquaculture animals from the containment area to the effect that such animals may only be:
  - (i) introduced into farms or mollusc farming areas in accordance with Article 12(2);*Or
  - (ii) harvested and slaughtered for human consumption in accordance with Article 33(1);**
- (d) the removal and disposal of dead fish and crustaceans, under the supervision of the competent authority in accordance with Regulation (EC) No 1774/2002, in an appropriate time-frame taking into account the type of production and the risk such dead animals pose for further spread of the disease.*



# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI) Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)

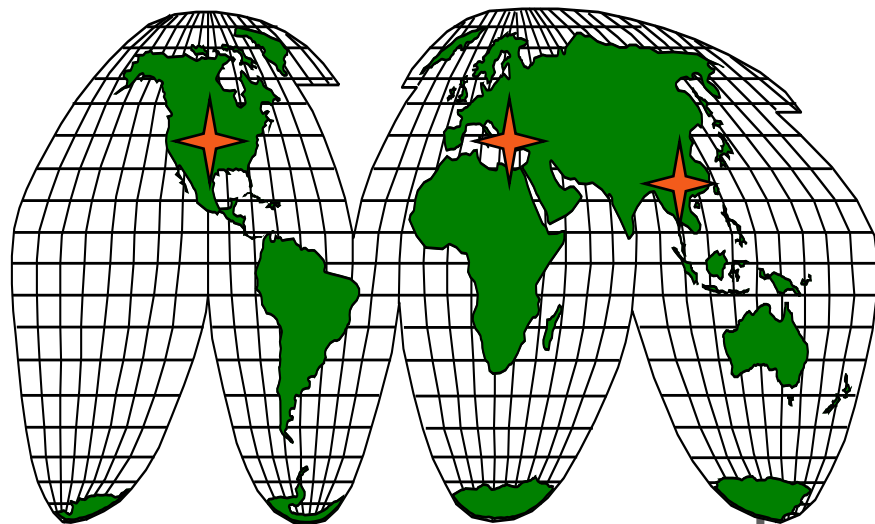
La Necrosi Ematopoietica Infettiva è una malattia virale sistemica descritta dal 1953 lungo la costa occidentale del Nord America, dove è considerata endemica nelle popolazioni di salmoni della costa del Pacifico dalla California alla Groenlandia. Negli anni '70 cominciò a manifestarsi come agente causale di malattia nelle trote iridee d'allevamento negli Stati Uniti. In seguito il virus si diffuse con la movimentazione di trote infette in diversi paesi dell'Europa occidentale (nel 1987 in Francia e Italia, nel 1992 in Germania, successivamente in Spagna e Svizzera) e dell'Asia orientale, causando gravi perdite negli allevamenti di trota iridea.

*USA are endemic for IHN in salmon populations. Known since 1953 spread in '70 to US rainbow trout farms then to Europe and East Asia*

## Range di ospiti – Host range

Salmonidi (varia in base alla specie ittica ed al ceppo virale) - Salmonids

Anguille - Eels



# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI) Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)

## Segni esterni

- Melanosi, esoftalmo, emorragie sulla superficie del corpo, alla base delle pinne ed endoculari; feci mucoidi filiformi
- Letargia alternata ad atassia natatoria
- Deformità spinali nei soggetti che sopravvivono
- Assenza di sintomi in episodi iperacuti

## *External signs*

- *Melanosis, exophthalmia, hemorrhages on body surface, fins and in the eyes, feces whitish and mucoids*
- *Lethargy and athaxia*
- *Spinal deformities in survivors*
- *No symptoms in hyperacute outbreaks*





# **Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)**

## **Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)**

### Segni interni

- Pallore del rene (spt. tratto anteriore) e del fegato
- Fluido mucoide nell'intestino
- Emorragie nel muscolo + grasso periviscerale e raramente su vescica natatoria
- Talvolta ascite

### *Internal signs*

- *Kidney and liver paleness*
- *Mucoid fluid in the intestine*
- *Hemorrhages in muscle, perivisceral fat and swimbladder (rare)*
- *Ascitis*

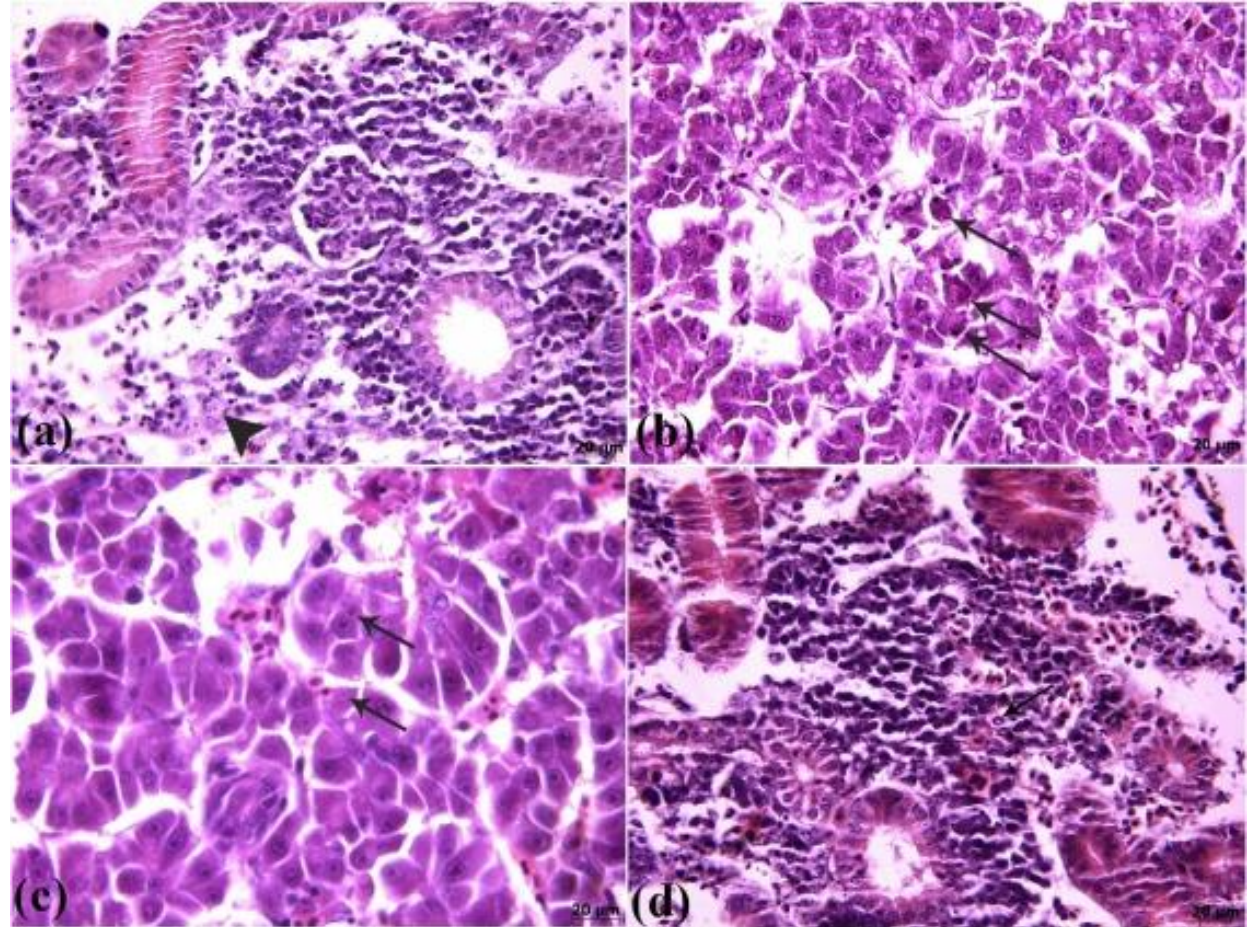


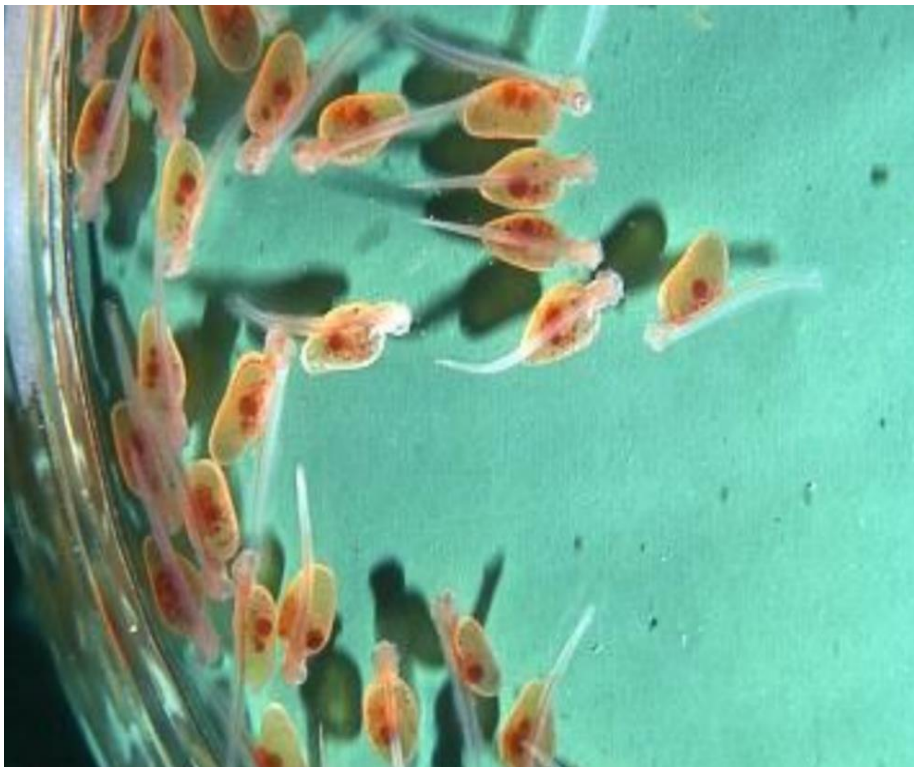
# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI) Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)

## Lesioni microscopiche – *Microscopical lesions*

Grave necrosi del  
tessuto ematopoietico  
a livello di rene  
anteriore e milza +  
fegato e pancreas

*Severe necrosis in  
head kidney, spleen,  
liver and pancreas*



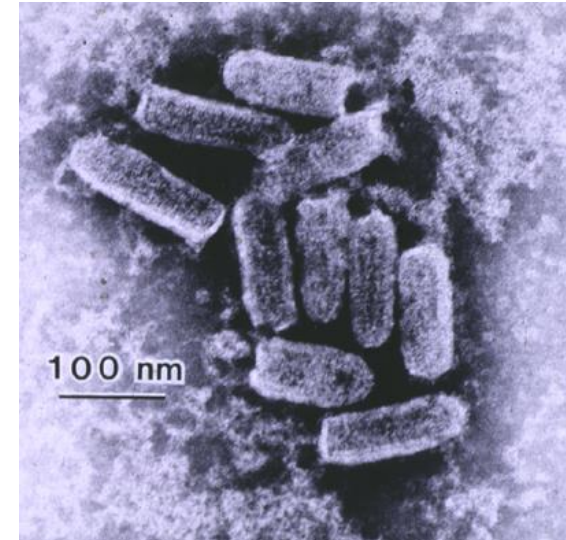




# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI) Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)

## Caratteristiche del virus – Virus features

- RNA virus
- Morfologia del virione
  - Tipico Rhabdoviridae con forma “a proiettile”
  - Dimensioni: 160-180 x 70-90 nm



## Tassonomia

Famiglia *Rhabdoviridae*

Genere *Novirhabdovirus*

Specie *Infectious hematopoietic necrosis virus* (IHNV)

## 3 Genotipi distinti – 3 Genotypes

**U-clade** – Aree settentrionali del Pacifico nord-occidentale USA + Giappone

**M-clade** – Hagerman Valley in Idaho USA + **isolati europei francesi ed italiani** da trota iridea

**L-clade** – California USA + Giappone

# Epidemiologia

Età = fattore chiave (avannotti molto suscettibili)

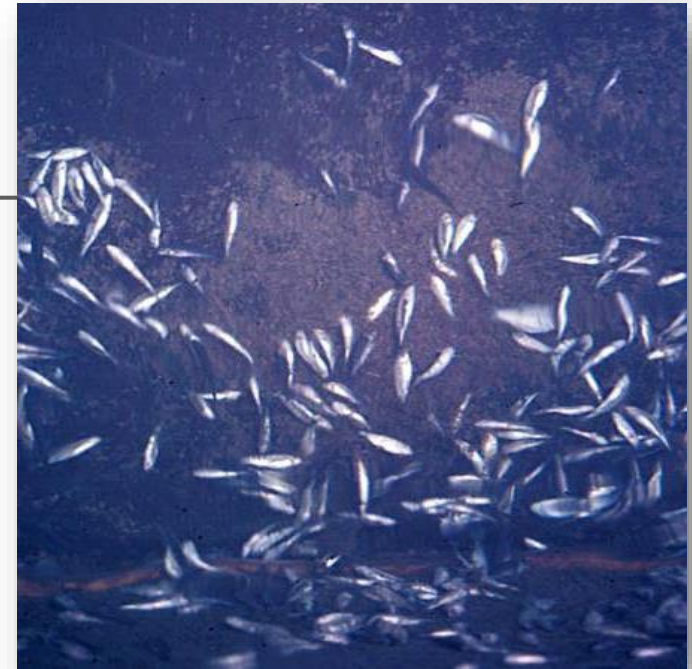
*High susceptibility of fingerlings*

Mortalità fino a 90% in pesci <2 mesi d'età

*Up to 90% mortality in younger fish (<60days)*

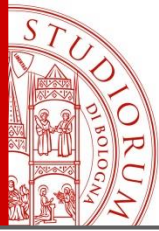
Importante la temperatura dell'acqua (<14°C)

Water temperature <14°C



Trasmissione del virus orizzontale – *Horizontal transmission*

- Via acqua (stabile fino ad 1 mese in acqua dolce) – *Through water (1 month survival)*
- Associata alle uova (trasmissione verticale non dimostrata) – *Through contaminated eggs*
- Riproduttori: eliminazione di elevate quantità di virus nei fluidi sessuali – *Broodstock*
- Possibile ruolo degli invertebrati acquatici come vettori (es. crostacei) + ectoparassiti ematofagi
- *Aquatic invertebrates as vectors and hematophagous parasites*
- Uccelli ittiofagi possibili vettori meccanici – *Fish-eating birds as mechanical vectors*
- Deformità scheletriche: problema commerciale in trotticoltura – *Skeletal deformities*
- Frequente concomitanza con infezioni batteriche da Flavobacteriaceae
- *Frequent secondary infections by Flavobacteriaceae*



# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

## Diagnosi

Segni clinici ed anatomopatologici tipici in pesci giovani

*Age-related clinical and pathological signs*

Isolamento su linee cellulari

*Cell lines isolation*

Salmonidi e ciprinidi: CHSE-214 e EPC

Effetto citopatico (EC) 5-7 giorni (15°C)

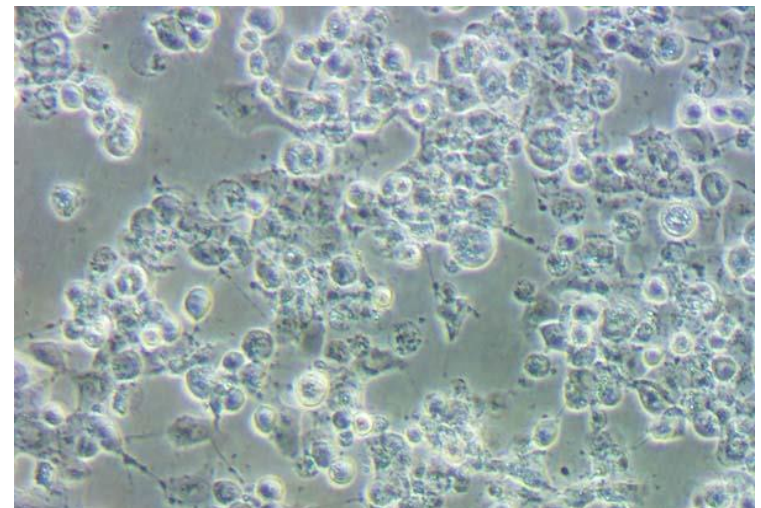
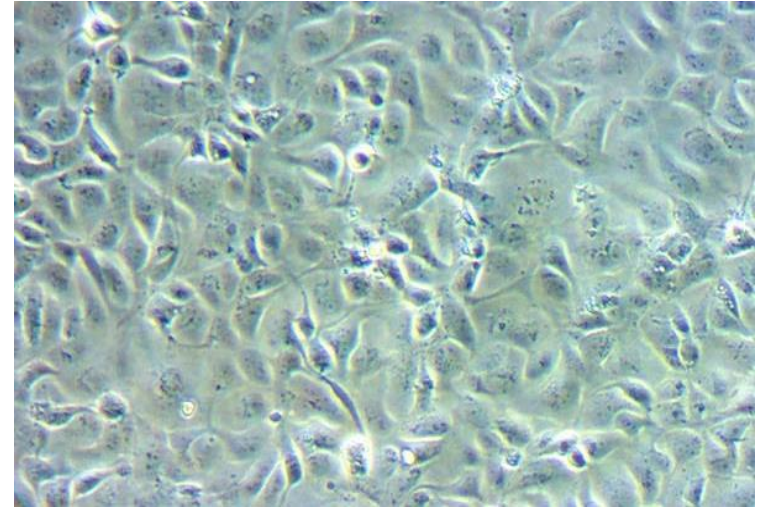
clusters a grappolo di cellule arrotondate

*CPE in 5-7days at 15°C*

Identificazione con siero neutralizzazione, IFA, ELISA o blotting con sonde ad acido nucleico o PCR

Indirect methods and PCR for identification

**METODI UFFICIALI SU "AQUATIC MANUAL" DELL'OIE**





# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

## Prevenzione e Controllo

Ripopolamento solo con pesci/uova da aziende riconosciute

*Restocking only with fish/eggs from A category farms*

Evitare l'utilizzo di acqua contaminate

*Water virus-free*

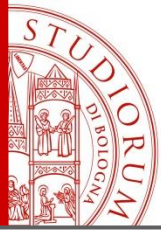
- Utilizzare acqua di pozzo
- Well water/spring water
- Trattamento dell'acqua in entrata con UV (praticabile solo per avannotterie)
- UV water treatment (feasible only for hatcheries)
- Assenza di pesci infetti/specie suscettibili nelle acque utilizzate per alimentare l'allevamento
- No wild fish of susceptible species upstream

Buone pratiche igienico-sanitarie (pulizia, disinfezione, vuoto sanitario)

Good hygiene practices

Ingresso ristretto a personale/mezzi autorizzati

Protezione da uccelli ittiofagi



# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

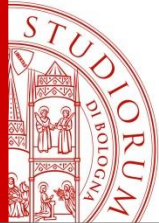
## Prevenzione e Controllo

Esposizione a:	Tempo
10% etere etilico	<1 ora
50% glicerolo	1-2 sett.
pH 3	rapida inattivazione
60°C	30 min.
32°C	<12 ore
21°C	<6 sett.
15°C	<16 sett.
10 e 4°C	>36 sett.
-20 e -90°C	invariato

Tempo approssimativo richiesto per l'inattivazione di almeno il 99,9% di IHNV quando esposto a differenti agenti (Vestergaard-Joergensen, 1974; Roberts, 1978).

## Risultati di prove di inattivazione di IHNV

Metodo	Dose	Tempo di contatto	Risultato /Riduzione titolo	Mezzo/ temperatura	Referenza
Calore	28°C	330 min	90%	MEM-1	Gosting & Gould, 1981
	32°C	90 min	99,9%	MEM-1	Gosting & Gould, 1981
	35°C	5 ore	Inattivato	MEM-0	Whipple & Rohovec, 1994
	38°C	15 min	99,9%	MEM-1	Gosting & Gould, 1981
	40°C	20 min	Inattivato	MEM-0	Whipple & Rohovec, 1994
	45°C	10 min	Inattivato	MEM-0	Whipple & Rohovec, 1994
	50°C	90 sec	Inattivato	MEM-0	Whipple & Rohovec, 1994
	55°C	30 sec	Inattivato	MEM-0	Whipple & Rohovec, 1994
UV-C	10-30 mJ		99%		Yoshimizu et al., 1986
	20 mJ		99,9%		Sako & Sorimachi, 1985
Acidi	pH 4 (Fosfato citrico)	7 ore	Incompleta	22°C	Whipple & Rohovec, 1994
	pH 3,8-4,3 (pesce insilato)	30 sec	Inattivato	22°C	Whipple & Rohovec, 1994
NaOH					
Cloro	0,1 mg/l	30 sec	Inattivato	10°C (H <sub>2</sub> O dist.)	Wedemeyer et al., 1978
	0,5 mg/l	5 min	Inattivato	10°C (H <sub>2</sub> O lago dolce)	Wedemeyer et al., 1978
	0,5 mg/l	10 min	Inattivato	10°C (H <sub>2</sub> O lago dura)	Wedemeyer et al., 1978
	1 mg/l	30 sec	Inattivato	10°C (H <sub>2</sub> O lago dura)	Wedemeyer et al., 1978
	10 mg/l	30 min	Inattivato	S	Amend & Pietsch, 1972
Formalina	0,2%	60 min	Incompleta		Amend & Pietsch, 1972
Iodofori	25 ppm	15 sec	Inattivato	pH 7	Amend & Pietsch, 1972
	12 ppm	30 sec	Inattivato	pH 7	Amend & Pietsch, 1972
Ozono	0,01 mg/l	1 min	Inattivato	10°C (H <sub>2</sub> O dist.)	Wedemeyer et al., 1978
	70 mg/h/l	10 min	Inattivato	10°C (H <sub>2</sub> O lago dolce e dura)	Wedemeyer et al., 1978

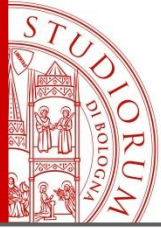


# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

## Prevenzione e Controllo

- Malattia notificabile in base alla Direttiva 2006/88 (Allegato IV, parte II, tra le malattie non esotiche)
- *Notifiable not exotic Disease according to EC Dir. 2006/88*
- Vaccini sperimentali (anche a DNA) efficaci ma non autorizzati
- *Vaccine effective but not authorized*
- Controllo delle infezioni intercorrenti (Flavobatteriosi, Aeromonosi)
- *Secondary infection control (Flavobacterium, Aeromonas)*
- Disinfezione delle uova
- *Eggs disinfection*
  - il 99,9% di IHNV viene inattivato dopo solo 7,5 secondi di contatto con 0,1 mg/l di iodio (Batts *et al.*, 1991)
  - *Iodine is very effective at 0.1 mg/l*





# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

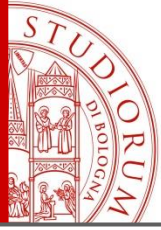
## Prevenzione e Controllo

- Disinfezione delle uova – *Eggs disinfection (Goldes & Mead, 1995)*

Trattamento disinfettante delle uova consigliato da Goldes e Mead (1995):

- 100 ppm per 10 minuti su uova embrionate
- pH tra 6 e 8 (ottimale: 7-7,5)
- all'arrivo le uova embrionate devono essere poste in acqua per 30-60 minuti prima della disinfezione
- dopo la disinfezione va operato un accurato risciacquo
- 1 litro di soluzione 100 ppm di iodio / 2000 uova di salmonidi
- att! gli avannotti appena schiusi sono particolarmente sensibili agli iodofori (neutralizzazione possibile con tiosolfato di sodio - 1,5 g/l)
- att! gli operatori devono usare mezzi di protezione individuale





# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

## Prevenzione e Controllo

### Disinfezione delle uova secondo La Patra (1997) – *La Patra protocol for eggs disinfection*

Spremere le uova in un setaccio separandole dal fluido ovarico (che può contenere alte concentrazioni di virus e proteine che possono ridurre la capacità disinfettante degli iodofori)

Lavare le uova con soluzione fisiologica 0,9% NaCl per 30-60 sec. (rimozione di microrganismi e materiale organico che potrebbero essere attaccati alle uova)

Aggiungere lo sperma, fecondare per 5-15 min., quindi lavare le uova con soluzione fisiologica 0,9% NaCl per 30-60 sec.

Immergere in una soluzione di iodofori 100 ppm per 1 min. (lo iodio si combinerà con il materiale organico rimanente con perdita di efficacia disinfettante – basta mettere una quantità sufficiente a coprire le uova)

Eliminare la soluzione residua e immergere completamente le uova (1 parte di uova: 4 di iodofori) in una nuova soluzione di iodofori a 100 ppm per 15-30 min. mescolando. Il trattamento andrebbe eseguito durante la fase di “indurimento” in modo che gli iodofori raggiungano lo spazio perivitellino

Lavare bene le uova con acqua pulita/sterilizzata per 30-60 sec.

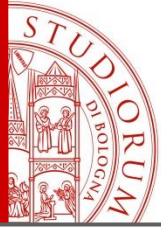
## □ Raccomandazioni Aquatic Code OIE per IHN

### □ Malattia notificabile

The recommendations in this Chapter apply to: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), brown trout (*Salmo trutta*), grayling (*Thymallus thymallus*), white fish (*Coregonus* spp.), pike (*Esox lucius*), turbot (*Scophthalmus maximus*), herring and sprat (*Clupea* spp.), Pacific salmon (*Oncorhynchus* spp.), Atlantic cod (*Gadus morhua*), Pacific cod (*G. macrocephalus*), haddock (*G. aeglefinus*) and rockling (*Onos mustelus*). These recommendations also apply to any other *susceptible species* referred to in the *Aquatic Manual* when traded internationally.

**Importation or transit of aquatic animals and aquatic animal products for any purpose from a country, zone or compartment not declared free from viral haemorrhagic septicaemia**

1. *Competent Authorities* should not require any VHSV related conditions, regardless of the VHSV status of the *exporting country, zone or compartment* when authorising the importation or transit of the following *aquatic animals and aquatic animal products* from the species referred to in Article 10.9.2. intended for any purpose and complying with Article 5.3.1.:
  - a) heat sterilised, hermetically sealed fish products (i.e. a heat treatment at 121°C for at least 3.6 minutes or any time/temperature equivalent);
  - b) pasteurised fish products that have been subjected to a heat treatment at 90°C for at least 10 minutes (or to any time/temperature equivalent which has been demonstrated to inactivate VHSV);
  - c) mechanically dried, eviscerated fish (i.e. a heat treatment at 100°C for at least 30 minutes or any time/temperature equivalent which has been demonstrated to inactivate VHSV);
  - d) naturally dried, eviscerated fish (i.e. sun-dried or wind-dried);
  - e) fish oil;
  - f) fish *meal*; and
  - g) fish skin leather.



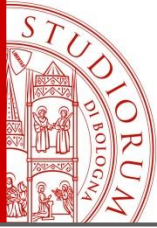
# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

Per tutti gli altri scopi le Autorità Competenti possono chiedere certificazioni specifiche relative all'indennità per IHN al paese da cui importa richiedendo un "international aquatic animal health certificate" sullo stato di indennità (ad eccezione delle "commodities" prima riportate)

Quando si importano pesci vivi da Paesi, zone e/o compartimenti non indenni, le Autorità Competenti dovranno definire i rischi e, quando giustificati, adottare precauzioni (sistema chiuso, trattamenti dei reflui, ecc.) a meno che non si intenda stabilire un nuovo "stock" ed allora si dovranno seguire le indicazioni del Code of Practice on the Introductions and Transfers of Marine Organisms dell'ICES (International Council for the Exploration of the Sea)

Anche in caso di importazione di pesci morti (eviscerati o meno) da paesi non dichiarati indenni da VHS vanno applicate misure che mitighino i rischi di infezione/diffusione (consegna diretta, misure di biosicurezza/quarantena e trattamento di reflui/rifiuti)

In caso di importazione di uova disinfettate da Paesi, zone e/o compartimenti non indenni, le Autorità competenti del paese importatore dovranno definire i rischi e applicare eventuali misure di precauzione (disinfezione, isolamento, nuova disinfezione all'arrivo...)



# IHN – Aquatic code

## Article 10.9.8.

Importation of live aquatic animals for aquaculture from a country, zone or compartment not declared free from viral haemorrhagic septicaemia

1. When importing, for *aquaculture*, live *aquatic animals* of the species referred to in Article 10.9.2. from a country, *zone* or *compartment* not declared free from VHS, the *Competent Authority* of the *importing country* should assess the *risk* and, if justified, apply the following *risk* mitigation measures:

1. the direct delivery to and lifelong holding of the consignment in biosecure facilities for continuous isolation from the local environment; and
2. the treatment of all effluent and waste material in a manner that ensures inactivation of VHSV.

2. If the intention of the introduction is the establishment of a new stock, the Code of Practice on the Introductions and Transfers of Marine Organisms of the International Council for the Exploration of the Seas (ICES) should be followed.

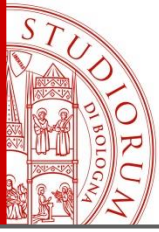
3. For the purposes of the *Aquatic Code*, the ICES Code (full version see: <http://www.ices.dk/indexfla.asp>) may be summarised to the following main points:

1. identify stock of interest (cultured or wild) in its current location;
2. evaluate stock health/disease history;
3. take and test samples for VHSV, pests and general health/disease status;
4. import and quarantine in a secure facility a founder (F-0) population;
5. produce F-1 generation from the F-0 stock in *quarantine*;
6. culture F-1 stock and at critical times in its development (life cycle) sample and test for VHSV and perform general examinations for pests and general health/disease status;
7. if VHSV is not detected, pests are not present, and the general health/disease status of the stock is considered to meet the *basic biosecurity conditions* of the *importing country*, *zone* or *compartment*, the F-1 stock may be defined as VHS free or specific pathogen free (SPF) for VHSV;
8. release SPF F-1 stock from *quarantine* for *aquaculture* or stocking purposes in the country, *zone* or *compartment*.



# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

- Inclusa nell'art. 1 del RPV con OM 10/05/1991 (malattia denunciabile)
- **2006/88 CE: inclusa nell'elenco delle malattie non esotiche (Allegato IV, parte II) - notificabile**
  - Il territorio di un paese membro viene suddiviso in zone o compartimenti riconosciuti o non riconosciuti
  - Per essere riconosciuta una zona/compartimento deve possedere questi requisiti:
    - non devono essere presenti specie sensibili alla malattia
    - 
    - l'agente patogeno non è in grado di sopravvivere nelle sue acque
    -
  - a) se non è stato riscontrato nessun caso di malattia per almeno 10 anni prima della data di applicazione pur essendo presenti specie sensibili (in tal caso in quest'arco di tempo si deve dimostrare di aver rispettato condizioni di biosicurezza, che l'infezione non sia notoriamente presente nei selvatici e che siano state applicate a scambi ed importazioni misure atte a prevenire la diffusione);



# IHN – EC Dir. 2006/88

## CHAPTER VII

### DISEASE-FREE STATUS

#### Article 49

##### *Disease-free Member State*

1. *A Member State shall be declared free of one or more of the non-exotic diseases listed in Part II of Annex IV in accordance with the procedure referred to in Article 62(2), if para-graph 2 of this Article is complied with and:*

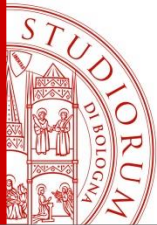
*(a) none of the species susceptible to the disease(s) in question is present in its territory;*

*Or*

*(b) the pathogen is known not to be able to survive in the Member State, and in its water source;*

*Or*

*(c) the Member State meets the conditions laid down in Part I of Annex V.*



# ***IHN – EC Dir. 2006/88***

## ***ANNEX V***

### ***Requirements for declaring a Member State, zone or compartment disease-free***

#### ***PART I***

##### ***Disease-free Member State***

###### ***1. On historical grounds***

***1.1. A Member State where susceptible species are present, but where there has not been any observed occurrence of the disease for at least for a period of 10 years before the date of application for the disease-free status despite conditions that are conducive to its clinical expression may be considered disease-free where:***

- (a) basic biosecurity measure conditions have been in place continuously for at least a period of 10 years before the date of application for the disease-free status;***
- (a) infection is not known to be established in wild populations;***
- (b) the implementation of trade and imports conditions to prevent the introduction of the disease into the Member State is effective.***



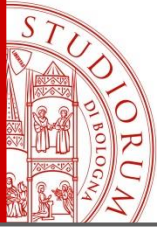
# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

---

Se è stato riscontrato l'ultimo caso di malattia negli ultimi 10 anni o non è nota la situazione (in tal caso in quest'arco di tempo deve dimostrare di aver rispettato condizioni di biosicurezza e che sia in atto da almeno 2 anni un sistema di sorveglianza mirata (che può estendersi anche ai selvatici) senza individuare la presenza del patogeno.

Gli stessi requisiti vengono richiesti a compartimenti costituiti da una o più aziende il cui stato sanitario dipende da quello del sistema idrico circostante.





# ***IHN – EC Dir. 2006/88***

*Based on targeted surveillance*

*A Member State where the last known clinical occurrence was within 10 years before the date of application for the disease-free status or where the infection status prior to targeted surveillance was unknown, for example because of the absence of conditions conducive to clinical expression, may be considered free of the specific disease where:*

*(a) the Member State meets the basic disease control conditions laid down in point 1.2;*

*And*

*(b) targeted surveillance in accordance with methods adopted pursuant to Article 49(3), has been in place for at least a period of two years without detection of the disease agent on farm, or in mollusc farming areas that rears any of the susceptible species.*

*Where there are parts of the Member State in which the number of farms, or mollusc farming areas is limited, and consequently targeted surveillance in these parts do not provide sufficient epidemiological data, but in which there are wild populations of any of the susceptible species, those wild populations shall be included in the targeted surveillance.*



# Necrosi Ematopoietica Infettiva (NEI)

---

Le nuove aziende il cui stato sanitario non dipende da quello del sistema idrico circostante possono essere considerate riconosciute se presentano questi requisiti:

- rifornirsi di acqua tramite un impianto di trattamento in grado di inattivare l'agente patogeno o utilizzare acqua di pozzo o di sorgente;
- possedere un sistema che ostacoli l'ingresso di pesci selvatici in azienda;
- sia protetta da inondazioni o infiltrazioni dal sistema idrico circostante;
- introduzione solo di pesci provenienti da aziende riconosciute.

### SEZIONE 4

#### **Misure di lotta minime in caso di conferma di malattie non esotiche negli animali d'acquacoltura**

##### Articolo 38

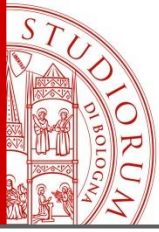
#### **Disposizioni di carattere generale**

1. In caso di confermata presenza di una delle malattie non esotiche elencate nell'allegato IV, parte II in uno Stato membro, una zona o un compartimento non dichiarati indenni da tale malattia, lo Stato membro interessato a) applica le misure contemplate dalla sezione 3 per riottenere lo status di indenne da tale malattia;

Oppure b) elabora un programma di eradicazione conformemente all'articolo 44, paragrafo 2.

2. In deroga all'articolo 34, paragrafo 2, quando uno Stato membro decide di applicare le misure contemplate dalla sezione 3, esso può consentire che animali clinicamente sani raggiungano la taglia commerciale prima dell'abbattimento per il consumo umano o siano trasportati in un'altra zona o compartimento infetti. In questi casi sono adottate misure volte a ridurre, e per quanto possibile ad evitare, l'ulteriore diffusione della malattia.

3. Qualora lo Stato membro interessato non intenda riottenere lo status di indenne da malattia, si applicano le disposizioni di cui all'articolo 39.



# IHN – EC Dir. 2006/88

## SECTION 4

*Minimum control measures in the case of confirmation of non-exotic diseases in aquaculture animals*

### *Article 38*

#### *General provisions*

*1. In the case of confirmation of a non-exotic disease listed in Part II of Annex IV in a Member State, zone or compartment declared free of that disease, the Member State concerned shall either:*

*(a) apply the measures provided for in Section 3 in order to regain such disease-free status, or*

*(b) draw up an eradication programme in accordance with Article 44(2).*

*2. By way of derogation from Article 34(2), where a Member State decides to apply the measures provided for in Section 3, it may allow clinically healthy animals to be raised to market size before slaughter for human consumption or to be moved to another infected zone or compartment. In such cases, measures shall be taken to reduce and as far as possible, prevent the further spreading of the disease.*

*3. Where the Member State concerned does not wish to regain disease-free status, Article 39 shall apply.*

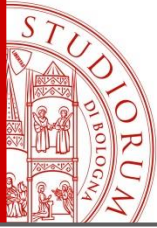
### *Articolo 39*

#### **Misure di contenimento**

In caso di confermata presenza di una delle malattie non esotiche elencate nell'allegato IV, parte II in uno Stato membro, una zona o un compartimento non dichiarati indenni da tale malattia, lo Stato membro interessato adotta misure atte a contenere la diffusione della malattia.

Tali misure consistono almeno:

- a) nel dichiarare l'azienda o la zona destinata a molluschicoltura azienda o zona infetta;
- b) nel creare un'idonea zona di protezione della malattia in questione, che comprenda una zona destinata a protezione e sorveglianza intorno all'azienda o alla zona destinata a molluschicoltura dichiarata infetta;
- c) nel limitare la movimentazione degli animali d'acquacoltura dalla zona di protezione; tali animali possono essere unicamente:
  - i) introdotti in aziende o zone in conformità dell'articolo 12, paragrafo 2;
  - o
  - ii) raccolti e abbattuti per il consumo umano in conformità dell'articolo 33, paragrafo 1;
- d) nel rimuovere e smaltire, entro un idoneo periodo di tempo, i pesci e crostacei morti, sotto il controllo dell'autorità competente, [...], in relazione al tipo di produzione e al rischio di ulteriore diffusione della malattia.



# IHN – EC Dir. 2006/88

## Article 39

### Containment measures

*In the case of confirmation of a non-exotic disease listed in Part II of Annex IV in a Member State, zone or compartment not declared free of that disease, the Member State concerned shall take measures to contain the disease.*

*Those measures shall at least consist of:*

- (a) declaring the farm or mollusc farming area to be infected;*
  - (b) establishing a containment area appropriate to the disease in question, including a protection zone and surveillance zone around the farm or mollusc farming area declared infected;*
  - (c) restricting the movement of aquaculture animals from the containment area to the effect that such animals may only be:
    - (i) introduced into farms or mollusc farming areas in accordance with Article 12(2);**
- Or*
- (ii) harvested and slaughtered for human consumption in accordance with Article 33(1);*
  - (d) the removal and disposal of dead fish and crustaceans, under the supervision of the competent authority in accordance with Regulation (EC) No 1774/2002, in an appropriate time-frame taking into account the type of production and the risk such dead animals pose for further spread of the disease.*

# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI) *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

## Range di ospiti – *Host range*

Salmonidi (*Salmo*, *Oncorhynchus* e *Salvelinus* spp.) - *Salmonids*

+ birnavirus acquatici da moltissime specie ittiche ed invertebrati acquatici di ambienti dulciacquicoli, salmastri e marini

*Birnaviruses widespread in a number of fish species and aquatic invertebrates*

## Range geografico – *Geographic distribution*

Inizialmente Canada, USA (orientale ed occidentale)

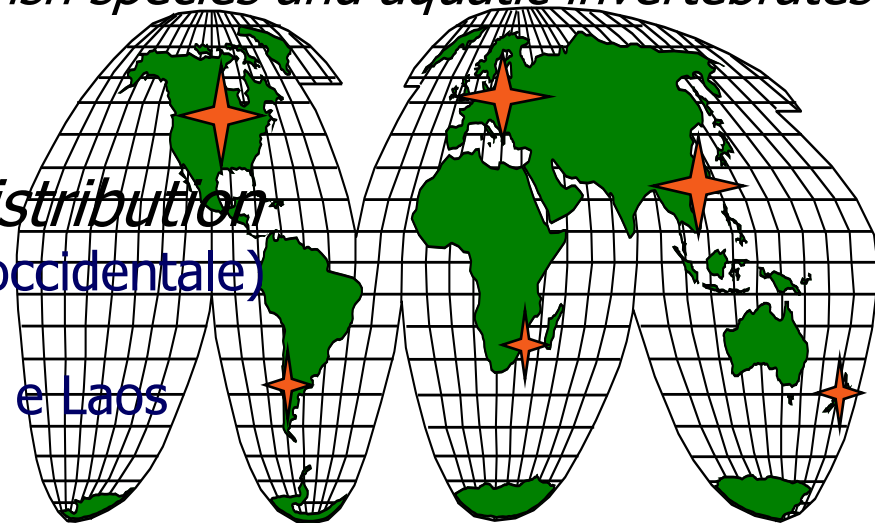
Europa

Giappone, Taiwan, Corea, Cina, Tailandia e Laos

Nuova Zelanda

Cile

Sud Africa



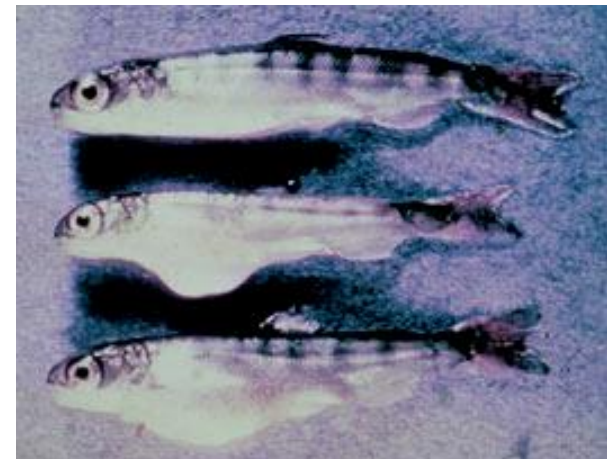
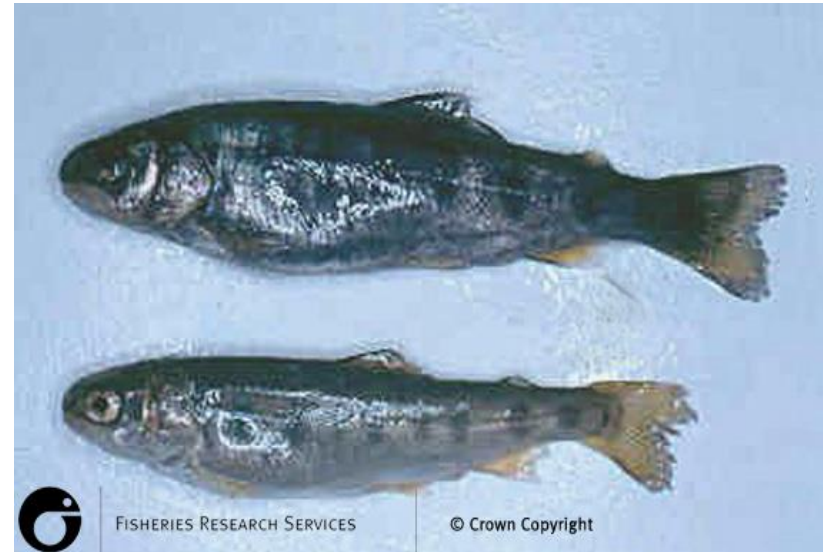
# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI) *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

## Segni esterni

Anoressia, nuoto a spirale/atassia, melanosi, esoftalmo, emorragie sulla superficie ventrale del corpo. Addome rigonfio (“malattia della pancetta”).

## *External signs*

*Anorexia, abnormal swimming behavior, melanosis, exophthalmia, hemorrhages in the ventral side. Abdominal swelling*

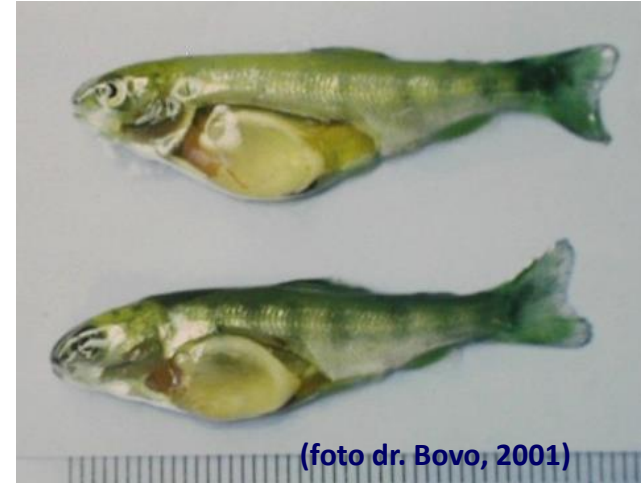




# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI) *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

## Segni interni – *Internal signs*

- Anemia branchiale
- Anemia sistemica (spt. milza e fegato)
- *Gill and systemic anemia*
- Talvolta emorragie petecchiali sugli organi interni (spt. ciechi pilorici)
- *Petechial hemorrhages on internal organs (pyloric caeca)*
- Stomaco ed intestino ripieni di materiale mucoide chiaro/giallastro
- *Stomach and intestine filled by yellowish mucoid material*
- Talvolta ascite - *Ascitis*



(foto dr. Bovo, 2001)

## Lesioni microscopiche – *Microscopical lesions*

Grave necrosi del pancreas - *Severe pancreatic necrosis*

Mucosa intestinale con aree necrotiche, sostituite da tessuto adiposo/fibrotico + esfoliazione epiteliale con aumento della produzione di muco e conseguente essudato catarrale. Necrosi del tessuto ematopoietico renale e dei tubuli renali. Necrosi focale del fegato. - *Necrosis in intestine, hematopoietic tissue and renal tubules, liver.*

# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI) *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

## Caratteristiche del virus – *Virus features*

### Morfologia del virione

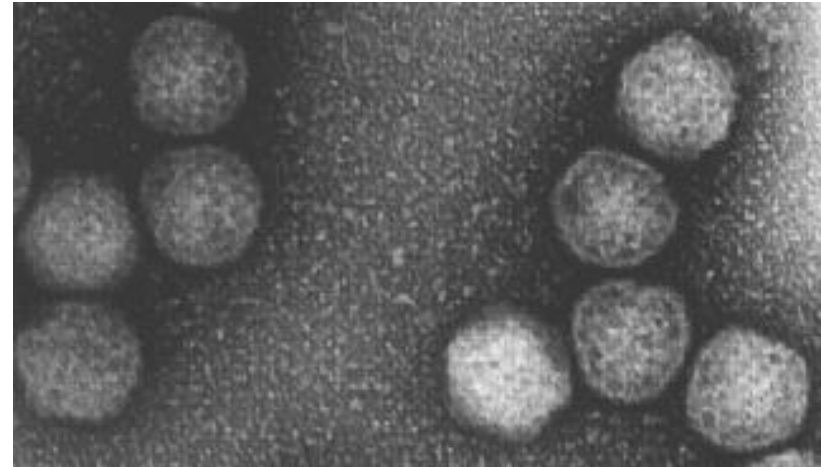
- Icosaedrico
- Privo di envelope – No enveloped
- Dimensioni: 55-75 (60) nm

### Tassonomia

Famiglia Birnaviridae

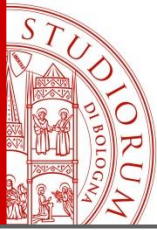
Genere *Aquabirnavirus*

Specie *Infectious pancreatic necrosis virus* (IPNV)



## □ Sierogruppi distinti - Two serogroups

- A - contiene oltre 200 isolati raggruppati in 9 sierotipi (A1-A9) corrispondenti ad altrettanti isolati originari (A1 = USA; **A2 = Europa**; ecc.) che sono stati quasi tutti associati ad IPN in salmonidi – 9 serotypes
- B – comprende un unico sierotipo (B1) con alcuni isolati da pesci ed invertebrati marini europei (solo alcuni sono virulenti per salmonidi) – 1 serotype



# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI)

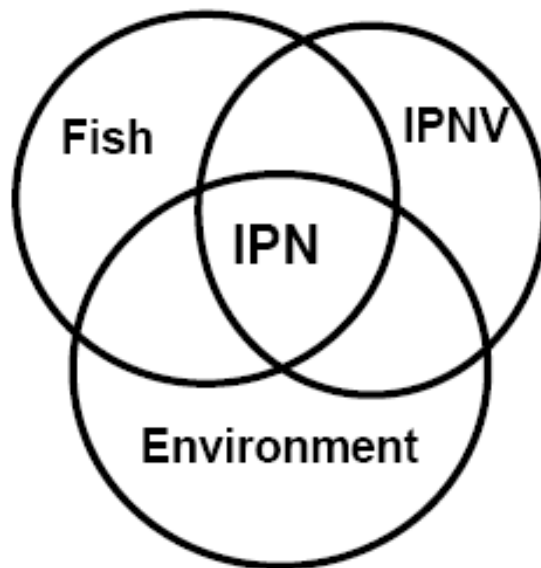
## *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

### **Epidemiologia - Epidemiology**

- Età = fattore chiave
- Mortalità fino a 50-70% in pesci <2 mesi d'età
- Raramente malattia negli adulti
- Importante la temperatura dell'acqua (8-15°C)
- Trasmissione del virus
- Verticale + Orizzontale
- Via acqua (sopravvive a lungo in acqua)
- Per ingestione di materiale infetto
- Trasporto/eliminazione da uccelli ittiofagi
- Eliminazione del virus: feci, fluidi gonadici, urine
- Reservoirs di NPI
- ✓ Stato di portatore svolto da soggetti sopravvissuti (che mantengono a lungo un elevato titolo virale) ed individui adulti portatori asintomatici
- ✓ Importanza degli invertebrati acquatici nella trasmissione del virus (gamberi d'acqua dolce, copepodi, molluschi bivalvi, ecc.)
- Altri fattori importanti: stress
- Age = key factor
- Mortality up to 50-70% in fish <60 days
- Adult usually resistant
- Strict water temperature range (8-15°C)
- Virus transmission
- ✓ Vertical + Horizontal
- ✓ Through water
- ✓ Through ingestion of infected food
- ✓ Fish-eating birds as vectors
- ✓ Through urine, feces and gonadic fluids
- Reservoirs di NPI
- ✓ Survivors and adults as asymptomatic carriers
- ✓ Important role of aquatic invertebrates
- Important role played by stress

# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI) *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

Factors to consider to control IPN  
and for infection experiments:



- The fish
  - Fish strain, age, physiology
  - Vaccination
- Environment:
  - Stress & husbandry
  - Temperature?
- IPNV
  - Avoidance (vertical and horizontal transmission)
  - Viulence of the strain of IPNV

# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI)

## *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

### Diagnosi(s)

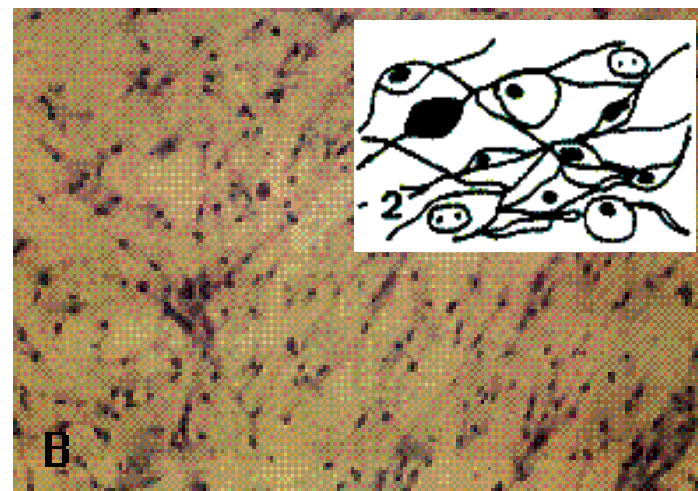
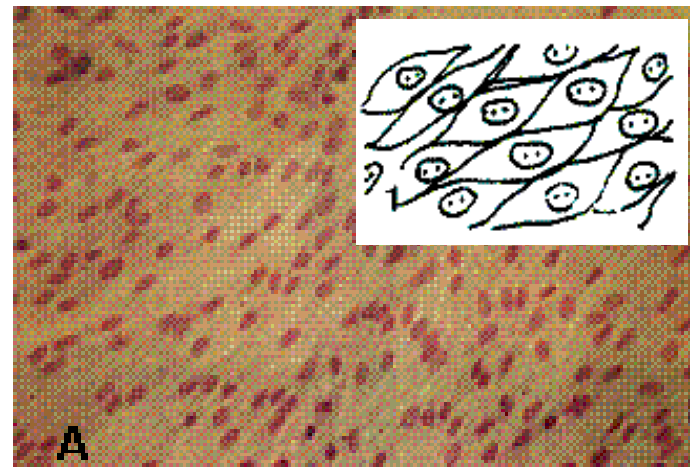
- Segni clinici ed anatomopatologici tipici in pesci giovani
- *Clinical and pathological signs in younger fish*
- Isolamento su linee cellulari (IPNV primo virus ittico isolato)
- *Isolation on cell lines*

### Centrarchidi e Salmonidi (BF-2, CHSE-214 e RTG-2)

- Effetto citopatico (EC) 5-7 giorni (15°C) (in RTG-2 in 48 ore a 20°C)
- *CPE in 5-7 days (15°C), in RTG-2 in 48hs at 20°C*

Reticolo di cellule allungate e coartate con margini stellati da cui irradiano cellule ancora vitali

- Conferma con siero neutralizzazione, IFA, ELISA o blotting o PCR
- *Confirmation by indirect methods and PCR*

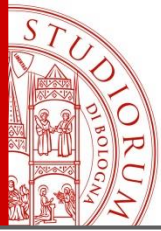




# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI) *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

## Prevenzione e Controllo – *Prevention and Control*

- Prevenire l'ingresso in allevamento - *Avoid introduction*
  - uova e pesci provenienti da allevamenti sicuri (non è una malattia notificabile) - *Biological material from safe sources*
  - Sorveglianza dei riproduttori - *Sanitary monitoring of broodstock*
  - Usare acqua di pozzo o trattata con UV – *Well or UV treated water source*
- Applicazione di procedure igieniche in avannotteria (pulizia e disinfezione) – disinfezione delle attrezzature - *Hygiene good practices*
- Evitare elevate densità di biomassa – *Avoid high biomasses*
  - Vaccini sperimentali efficaci ma non autorizzati – *Vaccines effective but not authorized*
  - Vaccini inattivati o a Dna (meno efficaci)



# Necrosi Pancreatica Infettiva (NPI)

## *Infectious Pancreatic Necrosis (IPN)*

Resiste per diverse settimane nel fondo (fango/sedimento) a 10°C e per diversi mesi in acqua filtrata a 4°C

*High resistance (weeks) in the mud at 10°C and in filtered water (months) at 4°C*

### Resistenza in giorni di IPNV (Ahne, 1988)

Virus	in acqua fiume	a secco	nel pesce
	15-20°C	10-28°C	10°C
-----			
IPN	>365	21	> 7

### Resistenza di IPNV a fattori chimici e fisici

#### Temperatura:

- a 60°C 99,999% inattivato in 30 minuti a pH 3 (5 ore a pH 7-9)
- Inattivazione significativa a 80°C per 2 ore

#### pH:

- ← inattivato in 10 minuti a pH 12,5 (parzialmente inattivato a pH 2,5 in 1 ora)

#### Inattivato da:

- ← Formalina 3% per 5 minuti
- ← Cloro 40 ppm per 30 minuti
- ← Iodio 30 ppm per 5 minuti