



UNIVERSITÉ
LAVAL

Direction des services vétérinaires

Procédure normalisée de fonctionnement

Objet : Programme de santé – poissons-zèbres	Numéro : CQ-4
Portée : Ceci est une directive de la Direction des services vétérinaires (DSV) à l'intention des directions des animaleries de l'Université Laval (campus et centres de recherche affiliés).	
Préparée par Anne-Marie Catudal <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 30 septembre 2020
Révisée par Geneviève Fortin Simard <i>Vétérinaire clinicienne, Direction des services vétérinaires</i>	Date : 6 octobre 2020
But : Décrire le statut de santé et le programme de surveillance à mettre en place dans les animaleries hébergeant des poissons-zèbres.	Version 1

Généralités

- Plusieurs pathogènes ont des effets connus sur l'état de santé global des poissons-zèbres et entraînent des signes cliniques non négligeables.
- Les pathogènes ne causant pas de signes cliniques peuvent aussi avoir des effets délétères notamment sur le système immunitaire de l'animal, le taux de reproduction, etc. Leurs effets ne doivent pas être écartés.
- L'éradication des pathogènes reconnus pour avoir une influence sur la validité des résultats expérimentaux et donc sur l'utilisation rationnelle des animaux est primordiale.
- Les poissons-zèbres peuvent être porteurs d'agents transmissibles à l'homme (zoonoses). Ces pathogènes devraient autant que possible être exclus des animaleries hébergeant des poissons-zèbres.
- L'utilisation d'animaux possédant le même statut de santé, donc la même flore, est un important prérequis pour permettre la reproductibilité des résultats expérimentaux.
- Afin d'améliorer les résultats expérimentaux, de favoriser les collaborations internationales et de maintenir un bon état de santé des animaux, une liste des pathogènes à exclure doit être élaborée en collaboration avec les vétérinaires de la DSV.
- Il est souhaité d'avoir le même statut de santé dans toutes les animaleries de l'Université Laval et de ses centres de recherche affiliés afin de faciliter l'utilisation des équipements disponibles dans chacune des animaleries.

- Un programme de surveillance doit être mis en place afin de **détecter** l'apparition d'une infection et pour **prévenir** la transmission du pathogène dans les colonies ou chez les animaux impliqués dans un protocole expérimental.
- L'évaluation des statuts de santé des animaux utilisés en recherche fait partie intégrante de tout programme de contrôle de la qualité et est sous la responsabilité des vétérinaires de la DSV.
- Les colonies de poissons-zèbres doivent être contrôlées au minimum une fois par année. La fréquence des tests effectués dans les secteurs d'expérimentation variera selon l'analyse effectuée par les vétérinaires de la DSV.
- Certains pathogènes ayant plus de chance d'être réactivés dans des individus âgés, il est recommandé d'euthanasier les animaux de plus de 12 mois afin d'éviter une possible infection latente.
- Si un pathogène présent dans la liste d'exclusion est détecté, des mesures seront prises au cas par cas. Un vétérinaire de la DSV doit être contacté immédiatement. D'autres pathogènes moins prévalents en animalerie de recherche ne sont pas testés, mais sont vérifiés et exclus lors de la réception d'animaux.
- L'introduction de microorganismes indésirables est reliée habituellement aux facteurs suivants : animaux, équipement, matériel biologique et utilisateurs. Il est donc impératif de mettre en place des bonnes pratiques pour diminuer les risques de contamination.
- Les procédures décrites dans la PNF R-5 Réception et quarantaine des poissons-zèbres doivent être respectées.

Procédures

Statut de santé – colonie

L'exclusion stricte de pathogènes est plus difficile chez les poissons-zèbres, puisque les institutions n'ont pas toutes mis en place des pratiques de détection adéquates et le statut de santé des animaux acquis est souvent inconnu. De plus, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de désinfection à la fois sécuritaire pour l'œuf et 100 % efficace permettant de « redérivée » les lignées comme cela se fait chez les rongeurs. Malgré les limitations, le statut de santé des colonies de poissons-zèbres doit être maintenu le plus propre possible.

- Coordonner toute nouvelle entrée d'animaux avec la DSV afin qu'aucun pathogène catégorisé comme « exclu » dans le tableau 1 ne soit introduit dans les colonies.
- À moins d'avis contraire, recevoir tous les poissons en quarantaine. La progéniture des poissons reçus pourra intégrer les supports de colonie après désinfection des œufs et obtention de résultats négatifs aux tests PCR recommandés.

Tableau 1 : Liste des pathogènes d'exclusion obligatoire – colonies

VIRUS	STATUT
Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)	●
Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)	●
BACTÉRIES	STATUT
<i>Aeromonas hydrophila</i>	● Z
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	●
<i>Flavobacterium columnare</i>	●
<i>Mycobacterium abscessus</i>	● ZP
<i>Mycobacterium chelonae</i>	● ZP
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	● Z
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	● ZP
<i>Mycobacterium marinum</i>	● Z
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	● ZP
PARASITES et FONGI	STATUT
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	●
<i>Piscinoodinium pillulare</i>	●
<i>Pleistophora hypessobryconis</i>	●
<i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	●
<i>Pseudoloma neurophila</i>	●
<i>Saprolegnia brachydanis</i>	●

● Pathogène exclu et surveillé Z : zoonose ZP : zoonose potentielle

Statut de santé – expérimentation

L'exclusion de l'ensemble des pathogènes listés au tableau 1 est souhaitable, puisque la majorité de ces agents ont des effets non négligeables sur les résultats de recherche et/ou sont des agents zoonotiques. Plus particulièrement, il est critique d'exclure *Pseudoloma neurophila* pour les études sur le système nerveux où dans lesquelles des tests de comportements sont réalisés. De même, *Pseudocapillaria tomentosa* est à exclure pour les études sur le cancer. Consulter l'annexe 1 pour un résumé des impacts des différents pathogènes sur la recherche.

Programme de surveillance

Animaux à tester

- Tester directement des poissons résidents de plus de 2 mois d'âge.

Note : Les vieux individus sont de meilleurs sujets pour l'analyse du statut de santé.

- Échantillonner plusieurs aquariums sur le support afin que l'analyse soit représentative de la population hébergée. Échantillonner différentes lignées, si elles sont plusieurs dans le support.
- Euthanasier les poissons moribonds et les poissons retrouvés dans le bassin de pompage et les conserver au congélateur jusqu'au prochain échantillonnage en les identifiant correctement.

Tests et analyses

- Effectuer les analyses dans un laboratoire reconnu pour les tests de pathogènes d'animaux de laboratoire : Charles River Laboratories (IDEXX BioResearch peut aussi être utilisé, sur demande).
- Effectuer des tests **au minimum** une fois par année pour les colonies et selon les recommandations des vétérinaires de la DSV pour les secteurs d'expérimentation.
- Étaler les tests sur toute l'année si la salle d'hébergement compte plus d'un support, afin d'avoir une évaluation en continu de la salle d'hébergement.
- Pour les colonies, effectuer le test ULaval Routine HM Frozen Fish de Charles River Laboratories pour les animaux et le test ULaval WHS Water Testing Mycobacterium PCR Panel pour l'eau filtrée.
- Effectuer les prélèvements conformément aux directives.
- Prendre au minimum un échantillon d'animaux et un échantillon d'eau par support d'aquariums d'environ 320 l.

Prélèvements

Animaux

- Euthanasier les animaux sélectionnés par surdose de TMS selon la PNF EU-5 Euthanasie des poissons.
- Placer les adultes individuellement dans des tubes de type Eppendorf™ de 2 ml, ou combiner 5 adultes dans un tube conique de 50 ml, en minimisant la quantité d'eau dans le tube. Jusqu'à 10 juvéniles (< 3 mois d'âge) peuvent être combinés dans un tube conique de 15 ou 50 ml.
- Congeler à -20 °C.

Eau

- À l'aide d'une pipette et d'un contenant autoclavé, récolter 1 l d'eau au niveau du bassin de pompage du support (milieu de la colonne d'eau).
- Travailler de manière stérile.
- Faire passer l'eau à travers un filtre 0,2 µm stérile à l'aide du vacuum, en respectant les directives du fournisseur pour la pression.
- À l'aide de pinces stériles, placer le filtre dans un pétri et retirer la périphérie en le coupant avec un scalpel stérile.
- Couper le filtre en deux, puis couper une moitié en 2 pour récupérer le quart du filtre.
- Le placer délicatement et stérilement dans un tube de type Eppendorf™ de 2 ml.
- Congeler à -20 °C.
- Faire de même pour l'autre quart et la demie du filtre et les conserver jusqu'à l'obtention des résultats négatifs.

Emballage des échantillons

Les échantillons d'origine animale dont il est permis de croire qu'ils ne contiennent pas de matière infectieuse sont en partie exemptés de la réglementation sur l'expédition de matières infectieuses. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des emballages répondant aux instructions d'emballage 620 ou 650 pour les bilans de santé de routine.

- Utiliser un colis qui comprend un triple emballage de type 1C :
 - Récipient primaire : tubes de prélèvements fermés et scellés pour éviter les fuites.
 - Emballage secondaire étanche : sac plastique hermétique (ex. Ziploc®) ou glacière selon la quantité d'échantillons. Cet emballage doit inclure le ou les récipients primaires ainsi que du matériel absorbant en quantité suffisante pour absorber la fuite de tous les échantillons.
 - Emballage extérieur robuste : boîte de carton ou enveloppe à bulles.
- Écrire la mention « *Exempt Animal Specimen* » sur l'emballage extérieur.
- Envoyer les tubes sur glace sèche au laboratoire de diagnostic pour les tests PCR. Respecter les directives du laboratoire ainsi que les exigences de transport relatives à la glace sèche.

Références

Bello-Perez, M., Medina-Gali, R., Coll, J., & Perez, L., *Viral interference between infectious pancreatic necrosis virus and spring viremia of carp virus in zebrafish*. *Aquaculture*, 500, 370–377, 2019.

Collymore, C., Crim, M.J., Lieggi, C., *Recommendations for Health Monitoring and Reporting for Zebrafish Research Facilities*, *Zebrafish 2016 Special Issue: Health Management & Biosafety*, 2016.

Crim, M.J. et al., *Comparison of Antemortem and Environmental Samples for Zebrafish Health Monitoring and Quarantine*, *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* Vol 56, No 4, pp 421-424, 2017.

Fox, James G., Anderson, Lynn C., Otto, Glen M., Pritchett-Corning, Kathleen R., Whary, Mark T., *Laboratory animal medicine – Third edition*, Elsevier, 2015.

IDEXX Laboratories Inc., *Health Monitoring for your zebrafish colonies booklet*, 2018.

LaPatra, S.E., Barone, L., Jones, G.R., & Zon, L.I., *Effects of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus and Infectious Pancreatic Necrosis Virus Infection on Hematopoietic Precursors of the Zebrafish*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26(5), 445–452, 2000.

Mocho J-P, *Three-Dimensional Screen: A Comprehensive Approach to the Health Monitoring of Zebrafish*, *ZEBRAFISH Volume 13, Supplement 1*, 2016.

Murray KN, Varga ZM, Kent ML, *Biosecurity and Health Monitoring at the Zebrafish International Resource Center*, *ZEBRAFISH Volume 13, Supplement 1*, 2016.

Annexe 1

Impacts sur la recherche des différents pathogènes de poissons-zèbres

Pathogène	Impact connu
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Cause une septicémie avec mortalité élevée. Pétéchies au niveau de la peau, des muscles et de la muqueuse orale.
<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Cause une septicémie avec mortalité élevée. Changement de comportement, perte d'appétit, nécrose tissulaire aigue.
<i>Flavobacterium columnare</i>	Mortalité, maladie des branchies, nécrose de l'épiderme (incluant nageoires) et tissus sous-jacents.
<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	Mortalité, détresse respiratoire, hyperplasie de l'épiderme et surproduction de mucus. Réponse immunitaire altérée.
Infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)	Possiblement porteurs chroniques et asymptomatiques. Infection des cellules hématopoïétiques.
Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)	Mortalité, nécrose de la rate et du rein, pétéchies généralisées. Altération de l'expression génique, suppression de l'IFN- β , stimule l'apoptose.
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Maladie pulmonaire et cutanée chez poissons immunosupprimés. Formation de granulomes dans de nombreux tissus.
<i>Mycobacterium chelonae</i>	Généralement asymptomatique. Inflammation chronique, infection de la vessie natatoire, formation de granulomes dans de nombreux tissus.
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Généralement asymptomatique, mais mortalité et diminution du taux de reproduction possibles. Baisse de fécondité, nécrose hépatique, œdème, émaciation.
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	Maladie chronique, mortalité, œdème, léthargie, anorexie, émaciation. Formation de granulomes dans de nombreux tissus possible.
<i>Mycobacterium marinum</i>	Mortalité, baisse de fécondité, maladie systémique. Formation d'ulcères et de granulomes, défaillance d'organes, altération de la production de cytokines et transcription génique.
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	Possiblement maladie chronique et asymptomatique. Pathogénicité élevée possible. Formation de granulomes possible.

<i>Piscinoodinium pillulare</i>	Maladie exacerbée par l'entassement et le stress. Mortalité, détresse respiratoire, inflammation et susceptibilité accrue aux infections bactériennes.
<i>Pleistophora hypheobryconis</i>	Pathogénicité accrue chez poissons immunosupprimés. Nécrose et inflammation des muscles squelettiques.
<i>Pseudocapillaria tomentosa</i>	Maladie chronique, anorexie, émaciation. Inflammation chronique, promotion de néoplasies intestinales.
<i>Pseudoloma neurophila</i>	Généralement chronique et asymptomatique. Baisse de fécondité, réduction de la croissance, émaciation, déformations musculosquelettiques. Encéphalite, myélite.
<i>Saprolegnia brachydanis</i>	Maladie des branchies, déséquilibres osmotiques. Mortalité liée aux septicémies bactériennes secondaires.