

– Réseau d'épidémiologie – **REC** – Filière aquaculture de crevettes Pénéides

PROTOCOLE DE PRELEVEMENT POUR LES ANALYSES PAR HISTOLOGIE ET PAR PCR SUR LES CREVETTES

| KIT DE PRELEVEMENT (KIT COMPLET) | KIT TERRAIN DU CTA |
|---|--|
| REACTIFS <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fixateur de Davidson ➤ Alcool à 70° ➤ Alcool à 90° | REACTIFS <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fixateur de Davidson ➤ Alcool à 70° ➤ Alcool à 90° |
| MATERIEL <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pots à prélèvement ➤ Tubes à prélèvement ➤ Aiguille ➤ Etiquette ➤ Flaconnage stérile ➤ Glacière ➤ Lames de scalpel ➤ Paire de ciseaux ➤ Paire de gants ➤ Sachet ➤ Seringue de 5 ou 10ml | MATERIEL <ul style="list-style-type: none"> ➤ Pots à prélèvement |
| AUTRE* <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fiche d'intervention et de commémoratifs | AUTRE* <ul style="list-style-type: none"> ➤ Fiche d'intervention et de commémoratifs |

* disponible sur le site Internet : www.davar.gouv.nc

| SOLUTION DE DAVIDSON | |
|-----------------------|--|
| Composition | 330 ml d'alcool éthylique à 95% 220 ml de formol 115 ml d'acide acétique glacial 335 ml d'eau distillée |
| Condition de stockage | A conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière. |
| Précaution d'emploi | <p align="center"> ☠ Brûle la peau et les yeux, irrite la gorge ☠ Eviter tout contact avec la peau ou les yeux </p> <div align="center">    </div> <div align="center">   </div> |

Matériel et consommables :

Les intervenants du réseau d'épidémiologie ont à leur disposition le kit de terrain.

Sur demande, le LNC fourni le nécessaire de fixation.

Prélèvements à réaliser :

- Animaux moribonds ou avec des anomalies (tordue, petite, ...).
- Animaux morts : congeler les crevettes mortes depuis moins d'une heure.
- Animaux normaux pour servir de témoins (facultatif, demander conseil au préalable).

Nombre de crevettes à prélever :

En fonction du stade de développement, chaque foyer de maladie/mortalité doit faire l'objet des prélèvements suivants :

| | Histologie | PCR |
|--------------------|-----------------|------------|
| | Davidson/alcool | Alcool 90° |
| Géniteurs | 5 | 10 (2x5) |
| Juveniles/adultes | 5 | 10 (2x5) |
| Post larves (>P20) | 50 | 100 |
| Larves | 100 | 200 |

Protocole de fixation :

Les prélèvements destinés aux analyses de:

→ **Histologie** seront fixés et immergés 24h dans le Davidson puis dans l'alcool à 70° jusqu'au traitement au LNC.

☠ Port de gants et du masque obligatoires pour la manipulation du DAVIDSON

→ **PCR** seront fixés et immergés en alcool 90° jusqu'au traitement au LNC.

- Pour les larves et post-larves :

1. Les mettre directement dans le flacon contenant le fixateur (Davidson ou alcool à 90°).

Attention Si les PL ont une taille > 1 cm, il est nécessaire d'injecter le fixateur dans les tissus.

2. Séparer soigneusement dans des tubes différents les saines et les malades/moribondes
3. Noter sur un papier au crayon, les références de l'échantillon (écloserie, bac, date de prélèvement, nom du fixateur, état : larves moribondes/saines/anomalies).
4. Mettre le papier dans le pot. **1 volume de crevette pour 10 volumes de fixateur**
5. Les immerger au maximum 24h dans le Davidson si prélèvements pour l'histologie et les laisser dans l'alcool à 90° jusqu'au traitement pour les prélèvements de PCR.
6. **Mettre dans le flacon un papier avec les informations : date, ferme/écloserie, fixateur, type de prélèvement (moribonde, tordue, petites, ...)**
7. Le lendemain, vider le Davidson et le remplacer par de l'alcool à 70°.
8. Remplir la demande d'analyse en renseignant le maximum d'informations.
9. Transmettre les prélèvements et la feuille de demande au LNC dans les plus brefs délais.

- Pour les juvéniles et les adultes :

1. Prendre la crevette vivante.

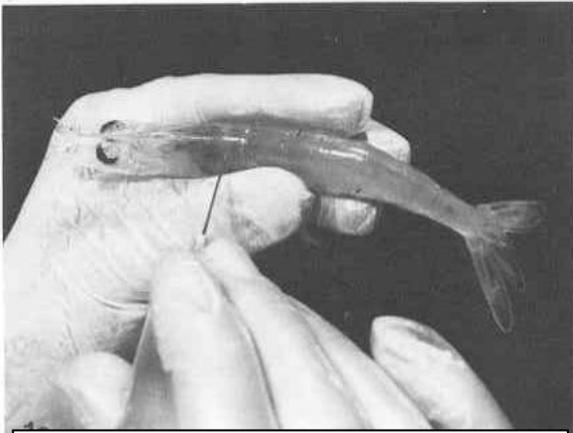
2. **Injecter** doucement avec une aiguille fine, du Davidson ou de l'alcool à 90° (5 à 10% du poids de la crevette) dans l'hépatopancréas, côté droit puis côté gauche, (fig.1-2-3-4). L'hépatopancréas doit devenir rouge-orangé.
3. Injecter doucement avec une aiguille fine, 0.1 à 1ml de fixateur dans les segments de la queue. La chair blanchie et la cuticule se colore en rose-orange.
4. Faire une **entaille** entre la tête et la queue avec des ciseaux. Pour les crevettes de plus de 10g, couper entièrement pour séparer la tête de la queue.
5. Faire une entaille entre le 3ème et le 4ème segment de la queue avec des ciseaux.
6. Mettre la crevette dans le flacon contenant le fixateur. **1 volume de crevette pour 10 volumes de fixateur**
7. Noter sur un papier au crayon, les références de l'échantillon (ferme/écloserie, bassin/bac, date du prélèvement, nom du fixateur, état : crevettes moribondes/saines/ anomalies).
8. Mettre le papier dans le pot.
9. Les immerger 24h-48h (selon la taille de la crevette) dans le Davidson si prélèvements pour l'histologie et les laisser dans l'alcool à 90° jusqu'au traitement pour les prélèvements de PCR.
10. **Mettre dans le flacon un papier avec les informations : date, ferme/écloserie, fixateur, type de prélèvement (moribonde, tordue, petites, ...)**
11. Après 24h-48h, vider le Davidson et le remplacer par de l'alcool à 70°.
12. Remplir la demande d'analyse, en renseignant le maximum d'informations (recto-verso).
13. Transmettre les prélèvements et la feuille de demande au LNC dans les plus brefs délais.

REMARQUE : LES DÉCHETS DE DAVIDSON SONT RECUPERES PAR LE LNC ET ELIMINES AVEC UNE ENTREPRISE SPECIALISEE.

Volume de fixateur en fonction du poids et du nombre de crevettes

| Pm des crevettes | Nbre de crevettes/pot | Volume de Fixateur/pot |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| ≤ 1g | 100 | 150 ml |
| 1g à 5g | 10 | 500 ml |
| 5g à 10g | 5 | |
| 10g à 15g | 3 | |
| 15g à 20g | 1 à 2 | |
| 20g à 25g | 1 à 2 | |
| > à 30g | 1 | |

SITES D'INJECTION DU FIXATEUR DE DAVIDSON POUR ANALYSES HISTOLOGIE
ET D'ALCOOL 90° POUR ANALYSES PCR



1 – Injection dans l'hépatopancréas.



1b

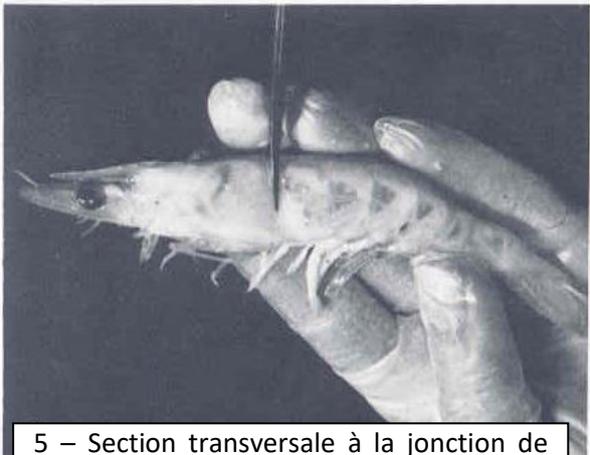
2 – Injection dans la région antérieure de l'hépatopancréas



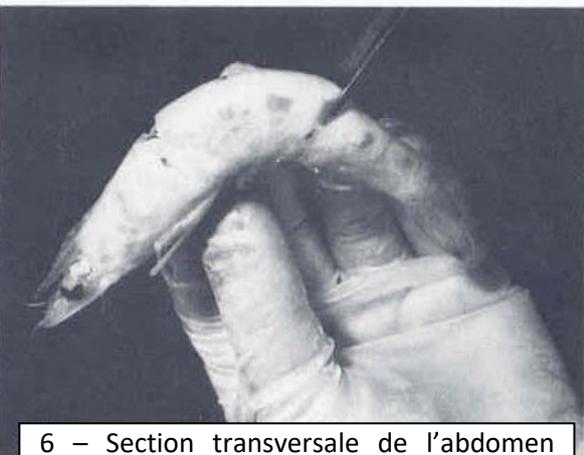
3 – Injection dans partie postérieure de l'abdomen



4 – Injection dans la région antérieure de l'abdomen



5 – Section transversale à la jonction de l'hépatopancréas et de l'abdomen.



6 – Section transversale de l'abdomen entre le 3^{ème} et le 4^{ème} segment.

Photos extraites de "A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology" Th. A. Bell and D. V. Lightner, World Aquaculture Society, 1988.