

## II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

## KOMMISSIONEN

## KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 19. november 1992

om fastlæggelse af prøveudtagningsplaner og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af bestemte fiskesygdomme

(92/532/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE  
FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det  
Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 91/67/EØF af  
28. januar 1991 om dyresundhedsmæssige betingelser for  
afsætning af akvakulturdyr og -produkter<sup>(1)</sup>, særlig  
artikel 15, og

ud fra følgende betragtninger:

Ifølge artikel 15 i det omtalte direktiv skal der fastlægges  
prøveudtagningsplaner og diagnosticeringsmetoder, der  
skal anvendes til påvisning og bekræftelse af sygdomme  
hos akvakulturdyr;

Den Videnskabelige Veterinærkomité, der blev oprettet  
ved Kommissionens beslutning 81/651/EØF<sup>(2)</sup>, er blevet  
hørt;

de i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i over-  
ensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Veterinær-  
komité —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

*Artikel 1*

Prøveudtagningsplanerne og diagnosticeringsmetoderne  
til påvisning og bekræftelse af infektiøs hæmatopoietisk  
nekrose (IHN) og egtvedsyge (VHS) er fastlagt i bilaget.

*Artikel 2*

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 19. november 1992.

*På Kommissionens vegne*

Ray MAC SHARRY

*Medlem af Kommissionen*

<sup>(1)</sup> EFT nr. L 46 af 19. 2. 1991, s. 1.

<sup>(2)</sup> EFT nr. L 233 af 19. 8. 1981, s. 32.

## BILAG

## DEL I

## METODER TIL UDTAGNING OG ANALYSE AF PRØVER FOR VHS OG IHN-OVERVÅGNING

## I. Analyseprøver

1. *Prøvetagningstidspunkt*

Brugene kontrolleres klinisk mindst to gange om året i perioden fra oktober til juni, eller når vandtemperaturen er under 14 °C. Der skal gå mindst fire måneder mellem kontrolbesøgene. Alle produktionsenheder (damme, tanke, akvarier, netbure m.v.) kontrolleres for tilstedeværelse af døde og svage fisk eller fisk med unormal adfærd. Opmærksomheden skal i særdeleshed være henledt på vandudledningsområdet (hvis det kan lade sig gøre), hvor de svage fisk har tendens til at samles på grund af vandstrømmen.

2. *Udvælgelse og indsamling af prøver*

Der indsamles 30-150 fisk og/eller ovarievæskeprøver til undersøgelse i forbindelse med kontrolbesøg, jf. tabel 1. Hvis der er regnbueørred til stede, skal fisk af den art udgøre hele prøven. Hvis der ikke er regnbueørred til stede, skal prøven indeholde fisk af alle andre tilstedeværende arter, som er modtagelige for VHS og/eller IHN som anført i bilag A til Rådets direktiv 91/67/EØF om dyresundhedsmæssige betingelser for afsætning af akvakulturdyr og -produkter. Arterne skal være ligeligt repræsenteret i prøven. I den indledende fireårs kontrolperiode, der går forud for opnåelsen af status som godkendt, er prøvestørrelsen 150 for at sikre, at virusbærere med en forekomst på 2 % påvises på et konfidensniveau på 95 %. I de følgende år (bevarelse af godkendelsen) kan prøvestørrelsen reduceres til 30 for at sikre, at virus med en forekomst på 10 % påvises på et konfidensniveau på 95 % (tabel 1B).

På akvakulturbrug, der har en dokumenteret fortid med frihed for VHS og IHN (baseret på et regulært officielt sundhedskontrolprogram), kan den lille prøvestørrelse også anvendes i den indledende fireårige kontrolperiode.

Ved anvendelse af mere end én vandkilde til fiskeproduktion kan der medtages fisk fra alle vandkilder i prøven på 150 eller 30 fisk. Hvis der forekommer svage fisk, fisk med unormal adfærd eller nyligt døde fisk (som ikke er gået i opløsning), skal disse først og fremmest medtages i prøven. Hvis der ikke forekommer sådanne fisk, skal prøven sammensættes af normalt udseende, sunde fisk, der indsamles på en sådan måde, at alle dele af akvakulturbruget og alle årgange er repræsenteret i prøven.

3. *Forberedelse og forsendelse af fiskeprøver*

Inden prøverne sendes eller overføres til laboratoriet, fjernes stykker af de organer, som skal undersøges, fra fisken med steril saks og pincet og overføres til plastrør indeholdende transportvæske, dvs. cellekulturvæske med 10 % kalveserum og antibiotika. En kombination af 200 i.e. penicillin, 200 µg streptomycin og 200 µg kanamycin pr. ml kan anbefales, men andre effektive antibiotika kan også anvendes. Det vævs-materiale, som skal undersøges, er milt, forreste nyre, hjernevæv og i nogle tilfælde ovarievæske (tabel 1A og 1B).

Stykker af organerne fra 5-10 fisk (tabel 1A og 1B) kan indsamles i et rør og udgør en samlet prøve. Vævet i hver prøve bør veje mindst 1 g, så slutopløsningen bliver 1 : 10.

Rørene anbringes i isolerede beholdere (f.eks. tykvæggede polystyrenæsker) sammen med tilstrækkeligt med is eller «frostblokke» for at sikre, at prøverne holdes nedkølet på mellem 0 og 5 °C under transport til laboratoriet. Frysning må undgås.

Den virologiske undersøgelse skal påbegyndes snarest muligt og inden 48 timer efter indsamlingen af prøverne. Hvis den fisk, der skal undersøges, er under 6 cm lang, kan hele fisken indsendes til laboratoriet i plastpose, der nedkøles som beskrevet ovenfor.

#### 4. *Indsamling af supplerende materiale til diagnosticering*

Efter aftale med det pågældende diagnostiske laboratorium kan også andet fiskevæv indsamles og forberedes til supplerende undersøgelser.

### II. Forberedelse af prøver til virologisk undersøgelse

#### 1. *Homogenisering af organer*

På laboratoriet skal vævet i rørene homogeniseres fuldstændigt (enten med stomacher, blender eller morter og pistil) og derefter opslemmes i den oprindelige transportvæske. Hvis prøven består af hele fisk, dvs. fisk på under 6 cm, klippes de i stykker med steril saks efter fjernelse af kroppen bag gatåbningen, homogeniseres som beskrevet ovenfor og opslemmes i transportvæske i forholdet 1 : 10.

#### 2. *Centrifugering af homogenatet*

Homogenatet centrifugeres i en kølecentrifuge ved 2-5 °C og 2 000-4 000 × g i 15 minutter, hvorefter den øverste væskefase indsamles til undersøgelse.

Såfremt forsendelsen af prøven er foregået i transportvæske (dvs. tilsat antibiotika), behøver den øverste væskefase ingen yderligere behandling med antibiotika.

Såfremt prøven er indsendt som hele fisk, skal homogenatet efter centrifugeringen genopslemmes i transportvæske tilsat antibiotika og henstå enten i 4 timer ved rumtemperatur eller natten over ved 4 °C.

Formålet med behandlingen med antibiotika er at undgå bakterieforurening af prøverne og overflødig filtrering gennem membranfiltre.

Umiddelbart efter centrifugeringen blandes noget af supernatanten med en tilsvarende mængde divalent antiserum mod IPN-virus passende fortyndet (referencestammerne Sp og Ab) og inkuberes i mindst 1 time ved 15 °C eller højst 18 timer ved 4 °C. Antiserumtiteren skal være mindst 1/2 000 i en 50 % pladeneutraliseringsprøve.

Formålet med at behandle alle podestoffer med antiserum mod IPN-virus (et virus, som i visse dele af Europa forekommer i op til 50 % af alle fiskeprøver) er at hindre, at der udvikles CPE som følge af IPN-virus i podede cellekulturer. Dette vil mindske varigheden af de virologiske undersøgelser og antallet af tilfælde, hvor forekomst af CPE ellers måtte opfattes som en potentiel indikation for VHS eller IHN.

Når prøverne kommer fra produktionsenheder, som anses for fri for IPN, kan behandling af podestoffer med antiserum mod IPN-virus undlades.

### III. Virologisk undersøgelse

#### 1. *Cellekulturer og -væsker*

BF-2 og enten EPC eller FHM celler dyrkes ved 20-25 °C i Eagle's MEM (eller modifikationer heraf) tilsat 10 % føtalt bovint serum og antibiotika i standardkoncentrationer.

Når cellerne dyrkes i lukkede glas, anvendes bicarbonat som buffer. I væsker til dyrkning af celler i åbne enheder anvendes som buffer Tris-HCl (23 mM) og Na-bicarbonat (6 mM) med en pH-værdi så nær ved 7,6 som muligt, en pH-værdi, som er optimal for virusmultiplikation.

Cellekulturer, som skal anvendes til podning med vævs materiale, bør være unge (4-48 timer) og være i aktiv vækst (ikke sammenflydende) på podningstidspunktet.

#### 2. *Podning af cellekulturer*

En organopslemning behandlet med antibiotika podes på cellekulturer i to fortyndinger, dvs. primærfortyndingen og derudover en fortynding heraf på 1 : 10 (for at forhindre homolog interferens). Der foretages podning af mindst to cellelinjer (se III.1). Forholdet mellem podestoffets og cellekulturvæskens rumfang bør være ca. 1 : 10.

For hver fortynding og hver cellelinje anvendes et celleområde på mindst ca. 2 cm<sup>2</sup> svarende til 1 hul på en cellekulturplade med 24 huller. Det anbefales at anvende cellekulturplader, men andre enheder med tilsvarende eller større vækstareal kan også accepteres.

### 3. Inkubation af cellekulturer

Podede cellekulturer inkuberes ved 15 °C i syv dage. Såfremt cellekulturvæsken ændrer farve fra rød til gul, hvilket er tegn på forsurening af væsken, må pH-værdien justeres med steril bicarbonatopløsning eller tilsvarende stoffer for at sikre, at cellematerialet lader sig inficere med virus.

Der gennemføres hver sjette måned en titrering af frosne lagre af VHSV og IHNV for at sikre, at cellekulturerne lader sig inficere.

### 4. Mikroskopi

Podede cellekulturer undersøges dagligt for forekomst af CPE ved ca. 40 × forstørrelse. Konstateres der tydelig CPE, må der omgående iværksættes virusidentifikationsprocedurer som beskrevet i afsnit IV.

Samtidig må der tages skridt til at suspendere godkendelsen af den produktionsenhed, hvorfra den viruspositive prøve stammer, såvel som af alle produktionsenheder længere nede ad samme vandløb.

Suspensionen af godkendelsesstatus må opretholdes, indtil laboratorieprøver har vist, at det pågældende virus ikke er VHSV eller IHNV. Der tillades maksimalt fire uger til identifikation af viruset, heri medregnet den nødvendige tid til undersøgelse på referencelaboratorier.

### 5. Dyrkning af subkulturer

Er der ingen udvikling af CPE efter inkubation i syv dage, gennemføres der en dyrkning af subkulturer med friske cellekulturer under anvendelse af et celleområde af samme størrelse som primærkulturens.

Mængder af væske fra alle kulturer/huller, som udgør primærkulturen, samles pr. cellelinje efter én frysning/optøning af kulturerne, og 0,5 ml af væsken blandes med en tilsvarende mængde antiserum mod IPN-virus som beskrevet i afsnit II.2, og blandingen inkuberes ved 15 °C i 60 minutter. Blandingen podes derefter på homologe cellekulturer i fortyndinger på 1 : 1 og 1 : 100 som beskrevet i afsnit III.2. Forud for podningen kan der foretages en inkubation af fortyndingerne med divalent antiserum mod IPN-virus i en passende fortynding.

De podede kulturer inkuberes derefter i syv døgn ved 15 °C og observeres som beskrevet i afsnit III.4.

## IV. Virusidentifikation

### 1. Neutralisation

Er der konstateret tegn på CPE i en cellekultur, indsamles væsken, cellerne fjernes ved langsom centrifugering eller membranfiltrering (0,45 µm), og væsken fortyndes 1 : 100 og 1 : 10 000 i cellekulturvæske.

Mængder af fortyndingerne blandes og inkuberes i 60 minutter ved 15 °C med lige dele af følgende reagenser hver for sig :

— Gruppenspecifikt antistof mod VHSV (Egtved-virus)	1 : 50 *
— gruppenspecifikt antistof mod infektiøs hæmatopoietisk nekrose-virus (IHNV)	1 : 50 *
— specifikt divalent antiserum mod infektiøs pankreasnekrose-virus (IPNV) (referencestammer Sp og Ab)	1 : 50 *
— væske	1 : 1

\* eller som angivet af referencelaboratoriet med sigte til antiseraenes eventuelle cytotoxicitet.

Reagenserne skal være af referencekvalitet med hensyn til titer og specificitet.

Fra hver virus-serum-blanding podes mindst to cellekulturer med 50 µl hver og inkuberes derefter ved 15 °C. Der checkes for CPE-udvikling som beskrevet i afsnit III.4.

Giver prøven ikke mulighed for sikker identifikation af viruset inden for en uge, må man tage et af følgende skridt :

- overføre viruset til et nationalt referencelaboratorium for fiskevirus med henblik på omgående identifikation ;
- anvende IFAT (afsnit IV.2), ELISA (afsnit IV.3) eller andre virusidentifikationsmetoder med reagenser af referencekvalitet.

## 2. Immunofluorescens (IFAT)

Til identifikation af hvert enkelt virusisolat udstryges der EPC-celler på mindst otte dækglasser eller lignende i en tæthed, som fører til ca. 60-90 % sammenflydning efter 24 timers dyrkning. Der vælges EPC-celler til dette formål, fordi de klæber stærkt til glasoverflader.

Når cellerne har sat sig på glasoverfladen (ca. 1 time efter udstrygningen), eller når kulturerne er blevet inkuberet i op til 24 timer, podes det virus, der skal identificeres. Fire kulturer podes i forholdet 1 : 10 (v/v), og fire kulturer i forholdet 1 : 100.

Mellem 20 og 30 timer efter podningen skylles kulturerne to gange i Eagle's MEM uden serum, fikseres i acetone og farves derefter ved hjælp af et tolags-IFAT. Det første reagenslag består af godkendt antiserum (som i afsnit IV.1). Det andet reagenslag er et FITC-konjugeret antiserum mod immunoglobulinet i det første lag. For hver af de testede antisera skal der farves mindst én høj dosis- og én lavdosispodet kultur. Prøven skal omfatte en passende negativ og positiv kontrol.

De farvede kulturer præpareres med glycerolsaltopløsning. De undersøges under indfaldende UV-lys. Der anvendes okularer, der forstørrer 10 × eller 12 ×, og × 25- eller × 40-objektiver, med en blænde på henholdsvis > 0,7 og > 1,3. Fortyndingerne af primært antiserum og FITC-konjugeret antiserum mod immunoglobulinet afhænger af den valgte eller disponible mikroskopopstilling.

Nogle stammer af Egtved-virus reagerer kraftigt med antiserum mod referencestammer F1 i IFAT, selv om de ikke reagerer i neutralisationsprøver.

## 3. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Hullerne i mikrotiterplader (f.eks. Nunc-immunoplader, Maxisorp, Nunc, Danmark) dækkes natten over med anbefalede fortyndinger af protein-A-rensede immunoglobulinfraktioner af de i afsnit IV.1 nævnte antisera.

Efter skylning af hullerne med PBS-Tween-20 buffer tilsættes det virus, som skal identificeres, til hullerne i to- eller firefoldsfortyndingstrin, og man lader det reagere med antistofbelægningen i 60 minutter ved 37 °C. Efter skylning med PBS-Tween-20 buffer tilsættes biotinylerede antistoffer af en specifitet svarende til specifiteten af antistofbelægningen, og man lader dem reagere i 60 minutter ved 20 °C. Efter endnu en skylning som ovenfor tilsættes HRP-konjugeret streptavidin, som man lader reagere i 1 time ved 20 °C. Efter en sidste skylning gøres bundet enzym synligt ved anvendelse af passende ELISA-substrater (OPD, TBM eller andre).

Ovennævnte biotin-/avidin-baserede ELISA-version gives som et eksempel. Der kan anvendes andre effektive ELISA-versioner i stedet.

Tabel 1 A

### Opnåelse af status

	Antal kliniske undersøgelser om året	Undersøgelse af organer — antal fisk	Undersøgelse af ovarievæske — antal fisk
<i>Kontinentalzoner:</i>			
a) Brug med avlsbestand	2	120 (1.) 150 (2.)	30 (1.) 0
b) Brug udelukkende med avlsbestand	2	0	150 (1. og 2.)
c) Brug uden avlsbestand	2	150 (1. og 2.)	0
<i>Kystzoner:</i>			
a) Brug uden avlsbestand	2	30 (1. og 2.)	0
b) Brug med avlsbestand	2	120 (1.) 150 (2.)	30 (1.) 0

Maksimalt antal fisk pr. samleprøve : 5

Tabel 1 B

## Bevarelse af status

	Antal kliniske undersøgelser om året	Undersøgelse af organer — antal fisk	Undersøgelse af ovarievæske — antal fisk
<i>Kontinentalzoner:</i>			
a) Brug med avlsbestand	2	15 (1. el. 2.)	15 (1. el. 2.)
b) Brug udelukkende med avlsbestand	2	0	30 (1. el. 2.)
c) Brug uden avlsbestand	2	30 (1. el. 2.)	0
<i>Kystzoner:</i>			
a) Brug uden avlsbestand	1	30 (1) (1. el. 2.)	0
b) Brug med avlsbestand	2	0	30 (1. el. 2.)

Maksimalt antal fisk pr. samleprøve: 10

(1) Prøverne skal indsamles fra måned 2 til 6 efter overførsel af fisk fra ferskvand til saltvand.

## DEL II

### DIAGNOSTICERINGSMETODER TIL BEKRÆFTELSE AF IHN OG VHS VED MISTANKE OM UDBRUD

IHN og VHS kan diagnosticeres ved hjælp af en af følgende metoder:

- A. Konventionel virusisolering med efterfølgende serologisk virusidentifikation
- B. Virusisolering med samtidig serologisk virusidentifikation
- C. Hurtige diagnosticeringsmetoder (IFAT, ELISA).

Den første diagnosticering af IHN og VHS på brug i godkendte zoner må ikke baseres på metode C alene. Metode A eller B skal også benyttes.

Det vævs materiale, der skal underkastes virologisk undersøgelse, skal i nogle tilfælde ledsages af supplerende materiale til bakteriologisk, parasitologisk, histologisk eller anden undersøgelse, for at der kan stilles en differentialdiagnose. Materialet bør indsamles efter de af IOE fastsatte metoder.

#### A. Konventionel virusisolering med efterfølgende serologisk virusidentifikation

##### A.I.1. Udvælgelse af prøver

Der udvælges mindst 10 fisk med typiske tegn på IHN eller VHS til undersøgelse.

##### A.I.2. Forberedelse og forsendelse af fiskeprøver

Inden prøverne sendes eller overføres til laboratoriet, fjernes stykker af de organer, som skal undersøges, fra fisken med steril saks og pincet og overføres til plastrør indeholdende transportvæske, dvs. cellekulturvæske med 10 % kalveserum og antibiotika. En kombination af 200 i.e. penicillin, 200 µg streptomycin og 200 µg kanamycin pr. ml kan anbefales, men andre effektive antibiotika kan også anvendes. De organer, som skal undersøges, er milt, forreste nyre og hjernevæv.

Stykker af organerne fra 5-10 fisk kan indsamles i et rør og udgør en samlet prøve. Vævet i hver prøve bør veje mindst 1 g, så slutfortyndingen bliver ca. 1:10.

Rørerne anbringes i isolerede beholdere (f.eks. tykvæggede polystyrenæsker) sammen med tilstrækkeligt med is eller »frostblokke« for at sikre, at prøverne holdes nedkølet på mellem 0 og 5 °C under transport til laboratoriet. Frysningen må undgås.

Den virologiske undersøgelse skal påbegyndes snarest muligt og inden 48 timer efter indsamlingen af prøverne. Hvis den fisk, der skal undersøges, er under 6 cm lang, kan hele fisken indsendes til laboratoriet i plastpose, der nedkøles som beskrevet ovenfor.

A.I.3. *Indsamling af supplerende materiale til diagnosticering*

Efter aftale med det pågældende diagnostiske laboratorium kan også andet fiskevæv indsamles og forberedes til supplerende undersøgelser.

A.II.1. *Homogenisering af organer*

På laboratoriet skal vævet i røerne homogeniseres fuldstændigt (enten med stomacher, blender eller morter og pistil) og derefter opslemmes i den oprindelige transportvæske. Hvis prøven består af hele fisk, dvs. fisk på under seks cm, klippes de i stykker med steril saks efter fjernelse af kroppen bag gatåbningen, homogeniseres som beskrevet ovenfor og opslemmes i transportvæske i forholdet 1 : 10.

A.II.2. *Centrifugering af homogenatet*

Homogenatet centrifugeres i en kølecentrifuge ved 2-5 °C og 2 000-4 000 × g i 15 minutter, hvorefter den øverste væskefase indsamles til undersøgelse.

Såfremt forsendelsen af prøven er foregået i transportvæske (dvs. tilsat antibiotika), behøver den øverste væskefase ingen yderligere behandling med antibiotika.

Såfremt prøven er indsendt som hele fisk, skal homogenatet efter centrifugeringen genopslemmes i transportvæske tilsat antibiotika og henstå enten i fire timer ved rumtemperatur eller natten over ved 4 °C.

Behandlingen med antibiotika tager sigte på at undgå bakterieforureningen af prøverne og overflødig filtrering gennem membranfiltre.

Umiddelbart efter centrifugeringen blandes en mængde af den øverste væskefase med en tilsvarende mængde divalent antiserum mod IPN-virus fortyndet passende (referencestammerne Sp og Ab) og inkuberes i mindst 1 time ved 15 °C eller højst 18 timer ved 4 °C. Antiserumtiteren skal være mindst 1/2000 i en 50 % pladeneutraliseringsprøve.

Formålet med at behandle alle podestoffer med antiserum mod IPN-virus (et virus, som i visse dele af Europa forekommer i op til 50 % af alle fiskeprøver) er at hindre, at der udvikles CPE som følge af IPN-virus i podede cellekulturer. Dette vil mindske varigheden af de virologiske undersøgelser og antallet af tilfælde, hvor forekomst af CPE ellers måtte opfattes som en potentiel indikation for VHS eller IHN.

Når prøverne kommer fra produktionsenheder, som anses for fri for IPN, kan behandling af podestoffer med antiserum mod IPN-virus undlades.

A.III.1. *Cellekulturer og -væsker*

BF-2 og enten EPC eller FHM celler dyrkes ved 20-25 °C i Eagle's MEM (eller modifikationer heraf) tilsat 10 % føtalt bovint serum og antibiotika i standardkoncentrationer.

Når cellerne dyrkes i lukkede glas, anvendes bicarbonat som buffer. I væsker til dyrkning af celler i åbne enheder anvendes som buffer Tris-HCl (23 mM) og bicarbonat (6 mM) med en pH-værdi så nær ved 7,6 som muligt, en pH-værdi, som er optimal for virusmultiplikation.

Cellekulturer, som skal anvendes til podning med vævsmateriale, bør være unge (4-48 timer) og være i aktiv vækst (ikke sammenflydende) på podningstidspunktet.

A.III.2. *Podning af cellekulturer*

En organopslemning behandlet med antibiotika podes på cellekulturer i to fortyndinger, dvs. primærfortyndingen og derudover en fortynding heraf på 1 : 100 (for at forhindre homolog interferens). Der foretages podning af mindst to cellelinjer (se A.III.1).

Forholdet mellem podestoffets og cellekulturvæskens rumfang bør være ca. 1 : 10.

For hver fortynding og hver cellelinje anvendes et celleområde på mindst ca. 2 cm<sup>2</sup> svarende til 1 hul på en cellekulturplade med 24 huller. Det anbefales at anvende cellekulturplader, men andre enheder med tilsvarende eller større vækstareal kan også accepteres.

A.III.3. *Inkubation af cellekulturer*

Podede cellekulturer inkuberes ved 15 °C i syv dage. Såfremt cellekulturvæsken ændrer farve fra rød til gul, hvilket er tegn på en forsurening af væsken, må pH-værdien justeres med en steril bicarbonatopløsning eller tilsvarende stoffer for at sikre, at cellematerialet lader sig inficere med virus.

Der gennemføres hver sjette måned en titrering af frosne lagre af VHSV og IHNV for at sikre, at cellekulturerne lader sig inficere.

A.III.4. *Mikroskopi*

Podede cellekulturer undersøges dagligt for forekomst af CPE ved ca. 40 × forstørrelse. Konstateres der tydelig CPE, må der omgående iværksættes virusidentifikationsprocedurer som beskrevet i afsnit A.IV.

Samtidig må der tages skridt til at suspendere godkendelsen af den produktionsenhed, hvorfra den viruspositive prøve stammer, såvel som af alle produktionsenheder længere nede ad samme vandløb.

Suspensionen af godkendelsesstatus må opretholdes, indtil laboratorieprøver har vist, at det pågældende virus ikke er VHSV eller IHNV. Der tillades maksimalt 4 uger til identifikation af viruset, heri medregnet den nødvendige tid til undersøgelse på referencelaboratorier.

A.III.5. *Dyrkning af subkulturer*

Er der ingen udvikling af CPE efter inkubation i syv dage, gennemføres der en dyrkning af subkulturer med friske cellekulturer under anvendelse af et celleområde af samme størrelse som primærkulturens.

Mængder af væske fra alle kulturer/huller, som udgør primærkulturen, samles alt efter cellelinje efter én frysning/optøning af kulturerne, og 0,5 ml af væsken blandes med en tilsvarende mængde antiserum mod IPN-virus som beskrevet i afsnit A.II.2, og blandingen inkuberes ved 15 °C i 60 minutter. Blandingen podes derefter på cellekulturer i fortyndinger på 1:1 og 1:100 som beskrevet i afsnit A.III.2. Forud for podningen kan der foretages en inkubation af fortyndingerne med divalent antiserum mod IPN-virus i en passende fortynding.

De podede kulturer inkuberes derefter i syv døgn ved 15 °C og observeres som beskrevet i afsnit A.III.4.

A.IV.1. *Neutralisation*

Er der konstateret tegn på CPE i en cellekultur, indsamles væsken, cellerne fjernes ved langsom centrifugering eller membranfiltrering (0,45 µm) og væsken fortyndes 1:100 og 1:10 000 i cellekulturvæske.

Mængder af fortyndingerne blandes og inkuberes i 60 minutter ved 15 °C med lige dele af følgende reagenser hver for sig:

— gruppespecifikt antistof mod VHSV (Egtved-virus)	1:50*
— gruppespecifikt antistof mod infektiøs hæmatopoietisk nekrose-virus (IHNV)	1:50*
— specifikt divalent antiserum mod infektiøs pankreasnekrose-virus (IPNV) (referencestammer Sp og Ab)	1:50*
— væske	1:1

\* eller som angivet af referencelaboratoriet med sigte til antiseraenes eventuelle cytotoxicitet.

Reagenserne skal være af referencekvalitet med hensyn til titer og specificitet.

Fra hver virus-/serumblanding podes mindst to cellekulturer med 50 µl hver og inkuberes derefter ved 15 °C. Der checkes for CPE-udvikling som beskrevet i afsnit A.III.4.

Giver prøven ikke mulighed for sikker identifikation af viruset inden for en uge, må man tage et af følgende skridt:

- overføre viruset til et nationalt referencelaboratorium for fiskevirus med henblik på omgående identifikation
- anvende IFAT (afsnit A.IV.2), ELISA (afsnit A.IV.3) eller andre virusidentifikationsmetoder med reagenser af referencekvalitet.

**A.IV.2. Immunofluorescens (IFAT)**

Til identifikation af hvert enkelt virusisolat udstryges der EPC-celler på mindst otte dækglass eller lignende i en tæthed, som fører til ca. 60-90 % sammenflydning efter 24 timers dyrkning. Der vælges EPC-celler til dette formål, fordi de klæber stærkt til glasoverflader.

Når cellerne har sat sig på glasoverfladen (ca. 1 time efter udstrygningen), eller når kulturerne er blevet inkuberet i op til 24 timer, podes det virus, der skal identificeres. Fire kulturer podes i forholdet 1 : 10 (v/v), og fire kulturer i forholdet 1 : 100.

Mellem 20 og 30 timer efter podningen skylles kulturerne to gange i Eagle's MEM uden serum, fikseres i acetone og farves derefter ved hjælp af et tolags-IFAT. Det første reagenslag består af godkendt antiserum (som i afsnit IV.1). Det andet reagenslag er et FITC-konjugeret antiserum mod immunoglobulinet i det første lag. For hver af de testede antisera skal der farves mindst én højdosis- og én lavdosis-podet kultur. Prøven skal omfatte en passende negativ og positiv kontrol.

De farvede kulturer præpareres med glycerolsaltopløsning. De undersøges under indfaldende UV-lys. Der anvendes okularer, der forstørrer 10 × eller 12 ×, og × 25- eller × 40-objektiver med en blænde på henholdsvis > 0,7 og > 1,3. Fortyndingerne af primært antiserum og FITC-konjugeret antiserum mod immunoglobulinet afhænger af den valgte eller disponible mikroskopstilling.

Nogle stammer af Egtved-virus reagerer kraftigt med antiserum mod referencestamme F1 i IFAT, selv om de ikke reagerer i neutralisationsprøver.

**A.IV.3. ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)**

Hullerne i mikrotiterplader (f.eks. Nunc-immunoplader, Maxisorp, Nunc, Danmark) dækkes natten over med anbefalede fortyndinger af protein-A-rensede immunoglobulinfraktioner af de i afsnit A.IV.1 nævnte antisera.

Efter skylning af hullerne med PBS-Tween-20 buffer tilsættes det virus, som skal identificeres, til hullerne i to- eller firefoldsfortyndingstrin, og man lader det reagere med antistofbelægningen i 60 minutter ved 37 °C. Efter skylning med PBS-Tween-20 buffer tilsættes biotinylerede antistoffer af en specificitet svarende til specificiteten af antistofbelægningen, og man lader dem reagere i 60 minutter ved 20 °C. Efter endnu en skylning som ovenfor tilsættes HRP-konjugeret streptavidin, som man lader reagere i 1 time ved 20 °C. Efter en sidste skylning gøres bundet enzym synligt ved anvendelse af passende ELISA-substrater (OPD, TBM eller andre).

Ovennævnte biotin-avidin-baserede ELISA-version gives som et eksempel. Der kan anvendes andre effektive ELISA-versioner i stedet.

**B. Virusisolering med samtidig serologisk virusidentifikation****B.I.1. Udvælgelse af prøver**

Som A.I.1.

**B.I.2. Forberedelse og forsendelse af fiskeprøver**

Som A.I.2.

**B.II.1. Homogenisering af organer**

Som A.II.1.

**B.II.2. Centrifugering af homogenatet**

Som A.II.2.

**B.II.3. Behandling af øverste væskefase med diagnostiske antisera**

Organopslemningen, der er behandlet med antibiotika og anti-IPN, fortyndes 1 : 10 og 1 : 10 000 i cellekulturvæske, og mængder blandes og inkuberes i 60 minutter ved 15 °C med lige dele af de i afsnit 1.IV.1 nævnte reagenser.

**B.III.1. Cellekulturer og -væsker**

Som A.III.1.

**B.III.2. Podning af cellekulturer**

Fra hver virus-/serumblanding (tilberedt efter B.II.3) podes mindst 2 cellekulturer pr. cellelinje med 50 µl hver.

**B.III.3. Inkubation af cellekulturer**

Som A.III.3.

**B.III.4. Mikroskopi**

Podede cellekulturer undersøges dagligt for forekomst af CPE ved ca. 40 × forstørrelse. Hvis et af de benyttede antisera forhindrer udvikling af CPE, kan viruset hermed identificeres. Hvis ingen af antiseraene forhindrer udvikling af CPE, må en af de i A.IV nævnte fremgangsmåder anvendes.

**B.III.5. Dyrkning af subkulturer**

Er der ingen udvikling af CPE efter 7 dage, gennemføres der en dyrkning af subkulturer ud fra kulturer podet med øverste væskefase plus væske (B.II.3).

**C. Hurtige diagnosticeringsmetoder (IFAT, ELISA)**

Supernatant fremstillet som beskrevet i A.II.2 analyseres ved hjælp af IFAT eller ELISA efter henholdsvis A.IV.2 og A.IV.3. Disse hurtige metoder må suppleres med en virologisk undersøgelse efter A eller B inden 48 timer efter prøveudtagningen, hvis

a) der opnås en negativ reaktion

eller

b) der opnås en positiv reaktion med materiale fra første tilfælde af IHN eller VHS i godkendte zoner.

---