

# KOMMISSIONEN

## KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 13. juni 2003

### om kriterier for etablering af zoner og officielt tilsyn ved mistanke om eller bekræftet forekomst af infektiøs lakseanæmi (ISA)

(meddelt under nummer K(2003) 1831)

(EØS-relevant tekst)

(2003/466/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske 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>, senest ændret ved forordning (EF) nr. 806/2003<sup>(2)</sup>, særlig artikel 15,

under henvisning til Rådets direktiv 93/53/EØF af 24. juni 1993 om minimumsfællesskabsforanstaltninger til bekæmpelse af visse fiske sygdomme<sup>(3)</sup>, senest ændret ved Kommissionens beslutning 2001/288/EF<sup>(4)</sup>, særlig artikel 5, stk. 2, og artikel 6, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) I direktiv 93/53/EØF er det fastsat, at prøveudtagning og laboratorieundersøgelser til påvisning af liste I- og liste II-sygdomme — som er opført i bilag A til direktiv 91/67/EØF — skal foretages i overensstemmelse med de metoder, der er fastsat i henhold til artikel 15 i direktiv 91/67/EØF.
- (2) Prøveudtagningsplaner for og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af liste II-fiske sygdommene egtvedsyge (VHS) og infektiøs hæmatopoietisk nekrose (IHN) er fastlagt i Kommissionens beslutning 2001/183/EF<sup>(5)</sup>.
- (3) Ifølge artikel 5, stk. 2, og artikel 6 i direktiv 93/53/EØF skal alle brug, der er beliggende i samme afvandingsområde eller kystområde som det, i hvilket et brug mistænkes for eller er bekræftet at være inficeret med

virus af infektiøs lakseanæmi (ISA), sættes under officielt tilsyn. Kriterierne for etablering af zoner og officielt tilsyn bør fastlægges.

- (4) Ekspertter i fiskesundhed og laboratorieundersøgelser er blevet rådspurgt med henblik på at opstille prøveudtagningsplaner for og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af forekomst af ISA og på at fastlægge kriterier for etablering af zoner og officielt tilsyn efter mistanke om eller bekræftelse af ISA. Desuden skal der tages hensyn til de retningslinjer for diagnosticering af ISA, der er fastlagt i den aktuelle udgave af den *diagnosticeringshåndbog for havdyrsygdomme*, der er udgivet af Det Internationale Kontor for Epizootier (OIE).
- (5) Der bør gives tilstrækkelig tid til gennemførelsen af disse nye krav.
- (6) De i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

#### Artikel 1

Prøveudtagningsplaner for og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af infektiøs lakseanæmi (ISA) samt kriterier for etablering af zoner og officielt tilsyn efter mistanke om eller bekræftelse af ISA er fastlagt i bilaget til denne beslutning.

#### Artikel 2

Denne beslutning anvendes fra den 23. oktober 2003.

<sup>(1)</sup> EFT L 46 af 19.2.1991, s. 1.

<sup>(2)</sup> EUT L 122 af 16.5.2003, s. 1.

<sup>(3)</sup> EFT L 175 af 19.7.1993, s. 23.

<sup>(4)</sup> EFT L 99 af 10.4.2001, s. 11.

<sup>(5)</sup> EFT L 67 af 9.3.2001, s. 65.

*Artikel 3*

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 13. juni 2003.

*På Kommissionens vegne*  
David BYRNE  
*Medlem af Kommissionen*

---

## BILAG

**Prøveudtagningsplaner for og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af infektiøs lakseanæmi (ISA) og kriterier for etablering af zoner og officielt tilsyn efter mistanke om eller bekræftelse af ISA**

## INDLEDNING OG DEFINITIONER

Dette bilag:

- a) fastlægger retningslinjer og minimumskrav for prøveudtagningsplaner for og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af ISA
- b) omfatter de bestemmelser og definitioner, der er fastlagt i direktiv 91/67/EØF og 93/53/EØF
- c) fastlægger bestemmelser med henblik på korrekt diagnosticering, bekæmpelse og overvågning af ISA, hvis der foreligger mistanke om eller bekræftelse af ISA
- d) er såvel bestemt for de myndigheder, der er ansvarlige for bekæmpelsen af ISA, som for det laboratoriepersonale, der foretager undersøgelser vedrørende denne sygdom. Hovedvægten er lagt på prøveudtagningsproceduren, principperne for og anvendelsen af laboratorieundersøgelser og evalueringen af resultaterne heraf samt på de nærmere laboratoriemetoder. Hvis det er hensigtsmæssigt, kan laboratorierne dog foretage ændringer af de undersøgelser, der er beskrevet i dette bilag, eller anvende andre undersøgelser, forudsat at det kan dokumenteres, at disse har en tilsvarende eller højere sensitivitet og specificitet. Desuden fastlægges der kriterier for etablering af zoner og officielt tilsyn efter mistanke om eller bekræftelse af ISA.

I forbindelse med dette bilag anvendes desuden følgende definitioner:

»afvandingsområde«: hele afvandingsområdet fra vandløbenes udspring til munden eller en del af et afvandingsområde fra vandløbenes udspring til en naturlig eller kunstig forhindring, der standser fiskenes vandring ved denne forhindring

»kystområde«: en geografisk klart afgrænset del af en kyst eller af et havområde eller en flodmunding, som udgør et homogent hydrodynamisk system eller en række sådanne systemer.

Del I fastlægger de generelle principper og kriterierne for diagnosticering og bekræftelse af ISA samt kriterierne for den etablering af zoner og officielt tilsyn, der skal foretages efter mistanke om eller bekræftelse af ISA.

Del II fastsætter, hvilken kontrol og prøveudtagning der skal foretages med henblik på at påvise forekomst af ISA.

Del III fastlægger de metoder, der skal anvendes ved virologiske undersøgelser.

Del IV fastlægger proceduren for undersøgelse af prøver ved hjælp af RT-PCR med henblik på påvisning af ISA.

Del V beskriver den protokol, der skal anvendes ved IFAT-undersøgelse af nyreaftryk med hensyn til ISA.

Del VI fastlægger fremgangsmåden ved vævsundersøgelser.

Del VII indeholder en liste over anvendte akronymer og forkortelser.

## **I. Kriterier for diagnosticering af ISA og for etablering af zoner, visse kontrolforanstaltninger og officielt tilsyn**

### *I.1. Generelle principper for diagnosticering af ISA*

Rimelige grunde til mistanke om, at fisk er inficeret med ISAV, er anført i del I.2 i dette bilag. Hvis der opstår mistanke om, at fisk på et brug er inficeret med ISAV, skal medlemsstaterne sørge for, at der hurtigst muligt med henblik på at bekræfte eller afkræfte mistanken om forekomst af sygdommen foretages en officiel undersøgelse i form af kontrol og kliniske undersøgelser, indsamling og udvælgelse af prøver og anvendelse af laboratorieundersøgelser som fastlagt i del III-VI i dette bilag. For at opnå en officiel bekræftelse af forekomsten af ISA skal en af de tre grupper af kriterier, der er fastlagt i del I.3 i dette bilag, være opfyldt.

### *I.2. Mistanke om ISA-infektion*

I.2.1. Der er grund til mistanke om forekomst af ISA, hvis mindst et af følgende kriterier er opfyldt:

- a) obduktionsfund, der stemmer overens med ISA, det være sig hos fisk med eller uden kliniske tegn på sygdommen. Obduktionsfundene og de kliniske tegn på sygdommen skal være i overensstemmelse med dem, der er beskrevet i den aktuelle udgave af OIE's diagnosticeringshåndbog for havdyrsygdomme
- b) isolation og identifikation af ISAV i cellekultur fra en enkelt prøve af en enkelt fisk på bruget som beskrevet i del III

- c) rimeligt bevis på forekomst af ISAV fra to af hinanden uafhængige laboratorieundersøgelser såsom RT-PCR (del IV) og IFAT (del V)
- d) overførsel af levende fisk til et brug, når der er rimelig grund til mistanke om forekomst af ISA på tidspunktet for overførslen af fisk
- e) hvis en undersøgelse afslører andre epidemisk relevante forbindelser til brug, hvor der er mistanke om eller bekræftelse på forekomst af ISA.

I.2.2. Mistanke om ISA kan afkræftes, hvis løbende undersøgelser med mindst en klinisk undersøgelse om måneden over en periode på seks måneder ikke afslører yderligere signifikante beviser på forekomsten af ISA.

### I.3. *Bekræftelse af ISA*

Forekomsten af ISA anses for bekræftet, hvis kriterierne i litra a) eller b) eller c) er opfyldt:

- a) der findes kliniske tegn og obduktionsfund, der stemmer overens med ISA ifølge den aktuelle udgave af OIE's diagnosticeringshåndbog for havdyrsygdomme, herunder døde eller svage fisk eller fisk med unormal adfærd, tegn på anæmi eller andre obduktionsfund og patologiske forandringer, og ISAV påvises ved en eller flere af følgende metoder:
  - i) isolation og identifikation af ISAV i cellekultur fra mindst en prøve af en fisk på bruget, som beskrevet i del III
  - ii) påvisning af ISAV ved hjælp af RT-PCR ved de metoder, der er beskrevet i del IV
  - iii) påvisning af ISAV i væv eller vævspræparater ved hjælp af specifikke antistoffer mod ISAV (f.eks. IFAT på nyrefryk som beskrevet i del V)
- b) isolation og identifikation af ISAV i to prøver fra en eller flere fisk på bruget, der ved forskellige lejligheder er blevet undersøgt ved anvendelse af den metode, der er beskrevet i del III
- c) isolation og identifikation af ISAV fra mindst en prøve af en fisk på bruget under anvendelse af den metode, der er beskrevet i del III, og samtidig påvisning af ISAV i vævspræparater fra en fisk på bruget ved anvendelse af enten RT-PCR (del IV) eller IFAT (del V).

### I.4. *Kriterier for oprettelse og nedlæggelse af zoner for kontrol og officielt tilsyn efter mistanke om eller bekræftelse af ISA*

I.4.1. I forbindelse med udarbejdelsen af et risikobaseret program for officielt tilsyn skal medlemsstaterne i nærheden af et brug, hvor der er officiel mistanke om eller bekræftelse på, at det er inficeret med ISA, oprette passende kontrol- og overvågningszoner.

I.4.2. De zoner, der skal oprettes, skal fastlægges på grundlag af en konkret analyse af de foreliggende risici for yderligere spredning af sygdommen. Afhængigt af den epizootiske situation:

- skal det berørte afvandingsområde eller kystområde fastlægges som en kontrolzone, eller
- kan dette område, hvis der er tale om et vidtstrakt afvandingsområde eller kystområde, opdeles i en kontrolzone og en overvågningszone, hvis forebyggelsen af spredningen af ISA ikke derved kompromitteres.

Desuden kan der, hvis det skønnes nødvendigt, oprettes yderligere overvågningszoner uden for det pågældende afvandings- eller kystområde.

I.4.3. De væsentligste faktorer, der skal tages i betragtning ved oprettelsen af ovennævnte zoner, er dem, der påvirker risikoen for spredning af sygdommen til fisk på andre brug eller vildtlevende fisk, f.eks. antallet, procentdelen og fordelingen af døde fisk på det brug, hvor der er mistanke om eller bekræftelse af infektion med ISAV; dødsårsagerne på det pågældende brug; afstanden til og tætheden af de nærmest liggende brug; brug, der har været kontakt med; de tilstedeværende fiskearter på brugene; driftsformen på det pågældende og de omkringliggende brug; de hydrodynamiske betingelser og andre faktorer af epidemisk signifikans, som er konstateret i forbindelse med den epizootiske undersøgelse, der er foretaget i henhold til artikel 5, stk. 2, og artikel 8 i direktiv 93/53/EØF.

I.4.4. Ved oprettelsen af zoner gælder følgende minimumskriterier:

I.4.4.1. Omkring et brug, der er bekræftet inficeret med ISAV, opretter medlemsstaten en »kontrolzone« på følgende måde:

- i kystområder: området i en cirkel med en radius, der mindst svarer til en tidevandsbevægelse og mindst er på 5 km, med centrum på det brug, der er bekræftet inficeret med ISAV, eller et tilsvarende område fastlagt på grundlag af passende hydrodynamiske eller epidemiologiske data, eller
- i områder på land: hele afvandingsområdet for det brug, der er bekræftet inficeret med ISAV; medlemsstaten kan, hvis der er tale om vidtstrakte afvandingsområder, begrænse zonen udstrækning til dele af afvandingsområdet, forudsat at dette ikke forringer forebyggelsen af spredningen af ISA.

I.4.4.2. Hvis der er mistanke om forekomst af ISA, skal der oprettes en »midlertidig kontrolzone« efter de samme kriterier som beskrevet for en kontrolzone.

I.4.4.3. Hvor det er nødvendigt, opretter medlemsstaten uden for kontrolzonen en »overvågningszone«, der omfatter de områder, hvor en mindre intensiv overvågning findes tilstrækkelig, og som svarer til:

- i kystområder: et område omkring kontrolzonen omfattende overlappende tidevandsudbredelser; eller et område i en cirkel omkring kontrolzonen med en radius på 10 km fra kontrolzonens centrum; eller et tilsvarende område fastlagt på grundlag af passende hydrodynamiske eller epidemiologiske data; eller
- i områder på land: om nødvendigt et udvidet område omkring den oprettede kontrolzone.

#### I.5. *Braklægning og nedlæggelse af oprettede zoner*

I.5.1. Medlemsstatens myndigheder sørger for, at alle brug inden for kontrolzonen pålægges en passende braklægningsperiode, efter at alle fisk er blevet fjernet, og der er foretaget den nødvendige desinfektion. Braklægningsperioden for brug, der er bekræftet inficeret med ISA, må ikke være på under seks måneder. Braklægningsperioden for andre brug i kontrolzoner fastlægges i hvert enkelt tilfælde af myndighederne på grundlag af en konkret risikoanalyse. Når alle fisk er fjernet fra alle brug i kontrolzonen, skal der være en sammenfaldende braklægningsperiode på mindst seks uger.

Desuden kan myndighederne beslutte, at brug i de oprettede overvågningsområder skal pålægges en braklægningsperiode.

I.5.2. Oprettede kontrolzoner må ikke nedlægges, og der må ikke indsættes nye fisk, før alle brug i zonerne er blevet tømt for fisk, desinficeret i fornødent omfang og braklagt i overensstemmelse med I.5.1. Når der indsættes nye fisk i zonerne, skal kontrolzonerne omdannes til overvågningszoner som fastlagt i I.4.4.3.

I.5.3. Oprettede midlertidige kontrolzoner må ikke nedlægges, før mistanken om ISA er blevet afkræftet i overensstemmelse med del I.2.2. Hvis forekomst af ISA bekræftes i overensstemmelse med del I.3, skal den midlertidige kontrolzone omdannes til en kontrolzone.

I.5.4. Oprettede overvågningszoner må tidligst nedlægges to år efter nedlæggelsen af kontrolzonen.

#### I.6. *Officielt tilsyn efter mistanke om eller bekræftelse af ISA*

I.6.1. Efter mistanke om eller bekræftelse af ISA på et brug skal myndighederne eller en kvalificeret fiske-sundhedstjeneste i samråd med eller under tilsyn af myndighederne jf. artikel 5, stk. 2, og artikel 6 i direktiv 93/53/EØF gennemføre et risikobaseret officielt overvågningsprogram på alle brug i de oprettede zoner med henblik på at konstatere sygdommens udbredelse og sygdomsudviklingen.

I.6.2. I forbindelse med gennemførelsen af et sådant officielt overvågningsprogram skal myndighederne om nødvendigt ved kontrol på stedet identificere alle brug i de oprettede zoner og foretage en officiel optælling af arter, kategorier og antal fisk på brugene, herunder også tal om dødeligheden.

- I.6.3. Efter den indledende officielle optælling, skal de brug i de oprettede midlertidige kontrolzoner, der holder laks (*Salmo salar*) — eller andre arter, som ifølge den seneste udgave af OIE's Aquatic Animal Health Code er modtagelig for eller potentiel bærer af ISA — hver 14. dag indgive en rapport om dødeligheden til myndighederne. Øget dødelighed skal rapporteres pr. dag og pr. bur. Myndighederne skal undersøge enhver signifikant forøgelse af dødeligheden på et brug.

Hvis mistanken bekræftes, skal alle brug i den oprettede kontrolzone en gang om ugen til myndighederne indgive en rapport om dødeligheden, pr. dag og pr. bur.

Brug i overvågningszoner skal hver 14. dag til myndighederne indgive en rapport om dødeligheden.

Desuden skal der hele året igennem foretages regelmæssige kontroller i de oprettede zoner med en hyppighed som vist i tabel 1. Hvis vejrforholdene i en del af året gør sådan kontrol umulig, kan medlemsstaterne dog i beredskabsplanen fastsætte en anden hyppighed for kontrollen.

Tabel 1

Officielt overvågningsprogram

Brugets beliggenhed	Mindste antal kontroller pr. år	Mindste antal kontroller pr. år, efter at kontrolzonen er nedlagt
Kontrolzone	12	
Overvågningszone	6	6
Midlertidig kontrolzone	6	

Overvågningsprogrammet skal videreføres, indtil zonerne nedlægges.

- I.6.4. Kontrollen og udvælgelse, indsamling, forberedelse og forsendelse af prøver skal foretages som fastlagt i del II.1-II.4. Undersøgelsen af prøver skal ske i overensstemmelse med del III-VI.

## II. Kontrol og prøveudtagning

### II.1. Kontrol, udvælgelse og indsamling af prøver på et brug, hvor der foreligger mistanke om forekomst af ISA

- II.1.1. Ved den regelmæssige kontrol, der som led i det officielle overvågningsprogram, der er beskrevet i del I.6, foretages på brug, der mistænkes for at være inficeret med ISA, skal alle brugets faciliteter (bure, tanke og damme) kontrolleres for døde og svage fisk og for fisk, der udviser unormal adfærd. Om muligt skal nyligt døde fisk (som ikke er gået i opløsning), svage fisk og fisk med unormal adfærd undersøges for kliniske tegn eller obduktionstegn på ISA som beskrevet i den aktuelle udgave af OIE's diagnosticeringshåndbog for havdyrsygdomme.
- II.1.2. Hvis der konstateres nylige kliniske tegn, som kunne indikere ISA, eller hvis en inspektør eller dyrlæge har andre grunde til mistanke om, at fisk kan være inficeret, skal der udtages en prøve på mindst ti fisk. Prøven skal om muligt bestå af nyligt døde fisk, svage fisk og fisk med unormal adfærd. Hvis der ikke er et tilstrækkeligt antal fisk med kliniske tegn, suppleres prøven med sunde fisk, som udvælges fra de bure, tanke eller damme, hvor der er det største antal døde fisk eller fisk med kliniske tegn på sygdommen.
- II.1.3. Hvis der konstateres nyligt døde fisk eller svage fisk eller fisk med unormal adfærd, men de kliniske tegn og obduktionsfundene ikke kan indikere ISA, er prøveudtagning ikke obligatorisk, selv om der på inspektørens eller dyrlægens foranledning kan udtages sådanne prøver, som måtte være nødvendige for en differentialdiagnose.

II.1.4. Hvis vildtlevende fisk mistænkes for at være inficeret med ISA, sørger medlemsstaterne for, at passende prøver udtages og undersøges ved hjælp af de relevante kliniske undersøgelser og laboratoriemetoder, som er fastlagt i del II og III-VI, så forekomsten af ISA afkræftes eller bekræftes, og så det kan anslås, om den eventuelle forekomst af sygdommen indebærer en signifikant risiko for akvakulturfisk.

## II.2. Forberedelse af prøver af fisk

II.2.1. Prøver til vævsundersøgelser må kun tages fra nyligt aflivede fisk, der udviser kliniske tegn eller obduktionsfund, som kunne tyde på forekomst af sygdommen. Alle ydre eller indre læsioner skal medtages i prøven, og der skal under alle omstændigheder udtages prøver af lever, mellemnyre, hjerte og milt, som fjernes fra de enkelte fisk ved hjælp af en skalpel og anbringes i en 8-10 % (vol/vol) bufferet formaldehyd/saltopløsning. Forholdet mellem fikseringsvæske og væv skal mindst være 20:1 for at sikre en tilfredsstillende konservering af vævet.

II.2.2. Til virologisk undersøgelse udtages der væv af alle de af prøven omfattede fisk. Der udtages dobbeltprøver med henblik på en bekræftelse af resultatet. Stykker af lever, fornyre, hjerte og milt fjernes fra fisken med et sterilt instrument og anbringes i plastikrør med 9 ml transportopløsning, dvs. et dyrkningssubstrat med antibiotika. En blanding af 12,5 µg ml<sup>-1</sup> fungizon, 200 IU ml<sup>-1</sup> polymixin B, og 200 µg ml<sup>-1</sup> kanamycin er egnet, men andre blandinger med dokumenteret effektivitet kan også anvendes. Væv fra op til fem fisk kan samles i et rør med transportopløsning og udgøre en samlet prøve. Vægten af vævet i en prøve skal være på 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3. Nyreaftryk til IFAT-undersøgelse skal tages fra nyligt aflivede fisk, dvs. inden to timer efter dødens indtræden. Et stykke af mellemnyren fjernes fra fisken med sterile instrumenter. Vævet presses mod absorberende papir for at fjerne overskydende blod og presses derefter gentagne gange mod et objektglas coated med poly-L-lysin. De enkelte aftryk skal ligge ved siden af hinanden, uden at der må forekomme overlappning, så der opnås et fortløbende enkelt cellelag. Blod og vævsvæske er ikke relevant for denne test. Nyreprøven må ikke efterlades til »tørring« på det absorberende papir, da dette kan føre til, at der på grund af koaguleret blod afsættes store mængder serumprotein på objektglasset. Aftrykkene skal lufttørres og derefter opbevares køligt og tørt, hvis de ikke straks fikseres. Fikseringen af aftrykkene skal foretages inden 72 timer efter, at fisken er udtaget til prøve. Alternativt kan aftrykkene fryses efter lufttørring og opbevares ved - 20 °C i indtil en måned, inden de fikseres.

II.2.4. Fisk, der udviser tegn på anæmi, kan bedøves, hvorefter der straks udtages heparinblodprøver til blodundersøgelser såsom hæmatokritmåling.

II.2.5. Væv til RT-PCR-analyse skal udtages af alle de af prøven omfattede fisk. Et stykke af for- eller mellemnyren fjernes fra fisken med et sterilt instrument og anbringes i et mikrocentrifugeglas med 1 ml RNA-konserveringsvæske af dokumenteret effektivitet. Væv fra op til fem fisk kan samles i et glas med konserveringsvæske og udgøre en samlet prøve. Vægten af vævet i en prøve skal være på ca. 0,5 g. Hvis fisken er for lille til, at der kan opnås en prøve af den krævede vægt, kan der tages stykker af nyre, hjerte, milt, lever eller blindtarm i nævnte rækkefølge, indtil der opnås 0,5 g.

## II.3. Forsendelse af prøver af fisk

II.3.1. Blodprøver og glas med fiskevæv til virologisk undersøgelse eller RT-PCR-analyse placeres i isolerede beholdere (f.eks. tykvægede polystyren-kasser) sammen med tilstrækkeligt is eller »fryseblokke«, så det sikres, at prøverne opbevares køligt under transporten til laboratoriet. Frysning skal undgås, og ved modtagelsen skal der stadig være is i transportbeholderen, eller en eller flere af »fryseblokkene« skal stadig helt eller delvis være frosset. Under ekstraordinære omstændigheder kan RT-PCR-prøver og prøver til virologisk undersøgelse lynfryses og transporteres til laboratoriet ved -20 °C eller derunder.

II.3.2. Objektglas til IFAT forsendes i objektglasbeholdere med tilstrækkeligt tørstof til, at aftrykkene holdes tørre og kølede som ovenfor.

II.3.3. Hvis fiskevæv transporteres i fikseringsvæske til vævsundersøgelse, skal det forsendes i vandtætte rør i stødsikre beholdere som f.eks. tykvægede polystyrenkasser.

- II.3.4. Medmindre prøverne er blevet frosset, skal den virologiske undersøgelse påbegyndes så hurtigt som muligt og ikke senere end 72 timer efter indsamlingen af prøverne. Prøven til bekræftelse af analyseresultatet skal opbevares ved  $-20^{\circ}\text{C}$  eller derunder efter ankomsten til laboratoriet.
- II.3.5. Hele fisk kan transporteres til laboratoriet, hvis de under II.3.1 beskrevne krav til transporttemperaturen kan opfyldes. Hele fisk skal indpakkes i absorberende papir og forsendes i en plastikpose, der køles som ovenfor beskrevet.
- II.3.6. Levende fisk kan også forsendes, men kun under den officielle tjenestes tilsyn.
- II.3.7. Ved RT-PCR-analyse af vævsprøver, der er konserveret i RNAlater, skal RNA-ekstraktionen foretages inden for en bestemt tid for prøver opbevaret ved forskellige temperaturer. Disse tidsfrister er følgende:
- |                         |                |
|-------------------------|----------------|
| — $37^{\circ}\text{C}$  | 1 dag          |
| — $25^{\circ}\text{C}$  | 1 uge          |
| — $4^{\circ}\text{C}$   | 1 måned        |
| — $-20^{\circ}\text{C}$ | tidsbegrænset. |
- II.3.8. Al indpakning og mærkning skal foretages under iagttagelse af de gældende nationale eller i givet fald internationale transportbestemmelser.

#### II.4. *Indsamling af supplerende diagnostisk materiale*

Efter aftale med det pågældende diagnoselaboratorium kan andet fiskevæv indsamles og forberedes til supplerende undersøgelser.

### III. **Virologisk undersøgelse**

#### III.1. *Forberedelse af prøver*

- III.1.1. Hvis der opstår praktiske vanskeligheder, som gør det umuligt at pøde cellerne inden 72 timer efter indsamlingen af vævsprøverne, er det acceptabelt at fryse vævet ved  $-80^{\circ}\text{C}$  i indtil 28 dage. Vævet må kun fryses og optøes en gang inden undersøgelsen.
- III.1.2. Hver prøve (samlet vævsprøve i transportvæske) skal homogeniseres fuldstændigt ved hjælp af en stomacher, blender eller morter og støder, centrifugeres ved 2 000 til 4 000 x g i 15 minutter ved  $0-6^{\circ}\text{C}$ , og supernatanten skal filtreres ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) og inkuberes med en tilsvarende mængde passende fortyndet blanding af antiserum mod de hjemlige serotyper af IPNV. Antiserumtiteren skal være mindst 1:2 000 i en 50 % pladeneutraliseringsprøve. Blandingen inkuberes i 1 time ved  $15^{\circ}\text{C}$ . Derved opnås podestoffet.

Formålet med at behandle alle podestoffer med antiserum mod IPN-virus (et virus, som i nogle dele af Europa forekommer i 50 % af alle fiskeprøver) er at hindre CPE som følge af IPN-virus i podede cellekulturer. Det vil nedsætte de virologiske undersøgelses varighed og antallet af tilfælde, hvor CPE ellers måtte opfattes som en potentiel indikation af ISAV.

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

#### III.2. *Podning af cellekulturer*

- III.2.1. SHK-1-celler (passage 80 eller derunder) eller TO-celler skal dyrkes i et L-15-substrat indeholdende 5 % føtalt kvægsærum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin, og 0,08 % (v/v) 50 mM 2-mercaptoethanol i plader med 12 eller 24 huller. Andre cellelinjer af dokumenteret effektivitet og sensitivitet ved isole-ring af ISAV kan anvendes under hensyntagen til stammevariabilitet og de forskellige stammers evne til replikation i forskellige cellelinjer. Antiserumbehandlet organopslæmning podes på unge aktivt voksende cellekulturer, så der fremkommer en slutopløsning af vævsmateriale i dyrkningssubstrat på 1:1 000. For hver organopslæmning tilsættes 40  $\mu\text{l}$  podemateriale til et hul med 2 ml dyrkningssubstrat. For at mindske risikoen for krydskontaminering anbefales det at anvende separate plader med 12 eller 24 huller til prøver fra forskellige akvakulturbrug.



III.2.2. En plade lades upodet, så den kan bruges som negativ kontrol. En separat plade til positiv kontrol podes med et referenceisolat af ISAV på følgende måde: 100 µl af et stampræparat af ISAV (minimumstiter  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) podes i det første hul og blandes godt. En mængde af dette materiale overføres fra det første hul til det andet hul, så der opnås en fortynding på 1:10, og blandes godt. Dette gentages hen over pladen, så der opnås seks tifoldige fortyndinger. ISAV-stampræparatet kan opbevares ved -80 °C i mindst to år, men når den er optøet, skal den anvendes i løbet af tre dage. Bemærk: Det skal forhindres, at prøvepladerne krydskontamineres med positivt kontrolmateriale. For at undgå denne risiko skal positive kontroller opstilles og behandles adskilt fra prøvepladerne.

III.2.3. Prøverne inkuberes ved  $14 \pm 2$  °C i op til 15 dage.

### III.3. Mikroskopi

Cellekulturerne skal ved hjælp af et mikroskop undersøges for CPE to gange, nemlig 5-7 dage og 12-14 dage efter podningen. Hvis der i en samleprøve konstateres CPE, skal der straks foretages en virusidentifikationstest (III.6). Hvis der den 14. dag ikke er konstateret CPE, skal der foretages en hæmadsorptionstest (III.4).

### III.4. Hæmadsorption

Replikation af ISAV i cellekulturer resulterer ikke altid i CPE. Hvert hul skal derfor underkastes en hæmadsorptionstest som nedenfor beskrevet, eller der kan alternativt foretages en IF-test af hvert hul som beskrevet i III.6.1.

III.4.1. Dyrkningssubstratet fjernes fra hvert hul, også fra dem til positiv og negativ kontrol, og anbringes i sterile mærkede glas. Fem hundrede µl af en 0,2 % (v/v) opløsning af vaskede røde blodlegemer fra kaniner eller heste, eller en 0,05 % (v/v) opløsning af vaskede røde blodlegemer fra regnbueørred eller laks tilsættes i hvert hul og inkuberes ved rumtemperatur i 45 minutter. Derefter fjernes de røde blodlegemer, og hvert hul vaskes to gange med L-15-substrat. Hvert hul undersøges ved hjælp af et mikroskop.

III.4.2. Forekomsten af ansamlinger af røde blodlegemer på overfladen af SHK-1- eller TO-celler tages som tegn på en formodet infektion med en orthomyxovirus. Hvis en hæmadsorptionstest er positiv, skal der straks foretages en virusidentifikationstest (III.6).

### III.5. Dyrkning af subkulturer eller passage

III.5.1. Dyrkning af subkulturer foretages fra dag 13-15. To hundrede og femogtyve µl af cellekulturens supernatant tilsættes til huller indeholdende friske aktivt voksende SHK-1-celler i prøveplader med 12 huller og inkuberes ved  $14 \pm 2$  °C i indtil 18 dage. Cellekulturerne skal ved hjælp af et mikroskop undersøges for CPE to gange, nemlig 5-7 dage og 12-14 dage efter podningen. Hvis der i en samleprøve konstateres CPE, skal der straks foretages en virusidentifikationstest (III.6). Hvis der i perioden fra dag 14 til dag 18 ikke konstateres CPE, skal der foretages en hæmadsorptionstest (III.4).

III.5.2. Hvis der inden for de første syv inkubationsdage optræder cytotoksicitet, skal der på dette tidspunkt foretages dyrkning af subkulturer, og cellerne skal inkuberes i 14-18 dage, og der skal igen dyrkes subkulturer med yderligere inkubation i 14-18 dage. Hvis der optræder cytotoksicitet efter den syvende dag, skal der dyrkes subkulturer en gang, og cellerne skal inkuberes, indtil den samlede inkubationsperiode fra primærpodningen er på 28-36 dage.

III.5.3. Hvis der optræder bakteriekontamination i primærkulturen, skal testen foretages på ny under anvendelse af det vævshomogenat, der opbevares ved -80 °C. Inden podningen centrifugeres vævshomogenatet med  $4\ 000 \times g$  i 30 minutter ved 0-6 °C, og supernatanten filtreres med 0,22 µm. Hvis bakteriekontaminationen optræder under dyrkningen af subkulturen, skal supernatanten filtreres med 0,22 µm, podes på friske celler og inkuberes i yderligere 14-18 dage.

### III.6. Virusidentifikationstest

Hvis der på noget tidspunkt konstateres tegn på CPE, eller hvis en hæmadsorptionstest er positiv, skal der foretages virusidentifikation. De metoder, der kan vælges til identifikation af ISAV, er IF (III.6.1) og RT-PCR (del IV). Hvis det formodes, at andre vira kan være til stede, anbefales det at foretage supplerende virusidentifikationstest. Hvis sådanne test ikke i løbet af en uge har ført til en definitiv identifikation af virusset, skal supernatanten fremsendes til et nationalt referencelaboratorium eller til EU-referencelaboratoriet for fiskesygdomme med henblik på øjeblikkelig identifikation.

#### III.6.1. IF

- III.6.1.1. SHK-1-celler (passage 80 eller derunder) eller TO-celler skal dyrkes i L-15-substrat indeholdende 5 % føtalt kvægserum, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin, og 0,08 % (v/v) 50 mM 2-mercaptoethanol i prøveplader med 24 eller 96 huller med mere end 50 % konfluens. Andre cellelinjer eller vækstsubstrat af dokumenteret effektivitet kan også anvendes. To hundrede og femogtyve µl supernatant af den kultur, der formodes inficeret med virus, skal tilsættes til hver af to huller og blandes, hvorefter 225 µl overføres til to yderligere huller i en fortynding på 1:5. To yderligere huller lades upodede, så de kan fungere som kontrol. Prøver fra hver enkelt akvakulturbrug skal behandles på separate plader, og det samme gælder viruskontrollen. Der etableres en viruskontrol ved hjælp af et referenceisolat af ISAV.
- III.6.1.2. Pladerne inkuberes ved  $14 \pm 2$  °C og undersøges mikroskopisk i op til syv dage. Hvis tidlig CPE konstateres, eller hvis der ikke i løbet af syv dage konstateres CPE, er næste skridt fiksering. Hullerne skal i den forbindelse vaskes med PBS og fikseres ved inkubation med 80 % acetone i 20 minutter ved rumtemperatur. Pladerne lufttørres og farves med det samme eller efter højst 24 timers opbevaring ved 0-6 °C.
- III.6.1.3. Replikationshuller farves med monoklonalt antistof 3H6F8 mod ISAV eller et andet monoklonalt antistof af dokumenteret effektivitet og specificitet, opløses i PBS og inkuberes ved  $37 \pm 4$  °C i 30 minutter. Det monoklonale antistof fjernes, og pladerne vaskes tre gange med 0,05 % Tween 20 i PBS. Et FITC-konjugat af antimuse-IgG opløst i PBS tilsættes til hvert hul og inkuberes ved  $37 \pm 4$  °C i 30 minutter. Bemærk: Opløsningerne af forskellige partier af monoklonalt antistof og FITC-konjugat optimeres i hvert laboratorium. Antistoffet fjernes og pladerne vaskes tre gange med 0,05 % Tween 20 i PBS.
- III.6.1.4. Hullerne undersøges straks ved hjælp af et inverteret mikroskop forberedt til fluorescensmikroskopi med et filter egnet til excitering af FITC. En test betragtes som positiv, hvis der iagttages fluorescerende celler. For at en test er gyldig, skal de positive kontroller give positivt resultat og de negative kontroller give negativt resultat.

## IV. Undersøgelse af prøver ved hjælp af RT-PCR

IV.1. I denne sektion beskrives de krævede procedurer for PCR-amplifikation af en del af segment 8 af ISAV-genomet, som kan foretages på fiskevæv eller ISAV-cellekulturer

#### IV.1.1. RNA-ekstraktion

- a) RNA-later fjernes fra hver prøve. 1 ml DEPC-behandlet dH<sub>2</sub>O tilsættes til hvert glas, og glassene centrifugeres med 13 000 omdr./min i 5 minutter ved 0-6 °C.
- b) Supernatanten fjernes fra hver prøve, og 800 µl TRIzol (Invitrogen), eller alternativt et reagens med mindst samme dokumenterede effektivitet, tilsættes til hver prøve og et kontrolglas med passende kontrolmateriale (400 µl dH<sub>2</sub>O eller nyrehomogenat fra specificerede patogenfri fisk). Om nødvendigt skal vævet opslæmmes ved gentagen pipettering. Glassene inkuberes ved rumtemperatur i 5 minutter. Til hvert glas tilsættes 160 µl kloroform, og glassene rystes kraftigt i 3 minutter, hvorefter de centrifugeres med 13 000 omdr./min. i 15 minutter ved 0-6 °C.
- c) Det øvre vandige lag overføres til et mærket 1,5 ml mikrocentrifugeglas med 500 µl isopropanol, og glassene inkuberes i 10 minutter ved rumtemperatur, hvorefter de centrifugeres med 6 500 omdr./min i 15 minutter ved 0-6 °C.

- d) Supernatanten fjernes, og der tilsættes 1 ml 75 % ethanol til det fremkomne RNA-bundfald. Glassene centrifugeres derefter med 6 500 omdr./min i 5 minutter ved 0-6 °C.
- e) Supernatanten fjernes, og glassene lades åbne i ca. 3 minutter, så den resterende ethanol kan fordampe. 15 µl DEPC-behandlet dH<sub>2</sub>O tilsættes for igen at oplømme det fremkomne bundfald, og der rystes let på vortex-mixer, hvis det er nødvendigt.
- f) Der benyttes et spektrofotometer til beregning af RNA-koncentrationen og prøvernes renhed. De optiske densiteter måles ved 260 og 280 nm.
- g) RNA, der skal anvendes med det samme (samme dag), kan midlertidigt opbevares ved 0-6 °C. RNA, der ikke skal anvendes med det samme, opbevares ved -80 °C.

#### IV.1.2. RT

- a) 2 µg RNA opløses i DEPC-behandlet dH<sub>2</sub>O i 1,5 ml mikrocentrifugeglas. Hvis RNA-koncentrationen af en prøve er for lav til, at der kan anvendes 2 µg i RT-reaktionen, skal der anvendes den størst mulige mængde RNA. Opløst RNA inkuberes ved 55-60 °C i 10 minutter.
- b) Glassene med RNA anbringes derefter på is, og RT-reagenser tilsættes, så der opnås endelige koncentrationer på 1 x buffer, 1 mM dNTP'er, 100 ng tilfældige hexamerer, 20U RNase inhibitor og 200 U MMLV-RT i en samlet mængde på 20 µl.
- c) Glassene inkuberes ved 37 °C i en time.
- d) cDNA skal opbevares ved 0-6 °C indtil anvendelsen og skal anvendes i PCR så hurtigt som muligt.

#### IV.1.3. PCR

- a) 5 µl cDNA tilsættes til 45 µl PCR-blanding, så der opnås endelige koncentrationer på 1 x buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM af hver dNTP, 25 pmol af hver primer og 1U Taq polymerase. Primerne er ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (forward primer) og ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverse primer). Der skal medtages negative kontroller for ekstraktion, RT og PCR.
- b) Glassene anbringes i et varmeapparat, der er programmeret til 94 °C i 5 minutter efterfulgt af 35 cyklusser på 94 °C i 1 minut, 55 °C i 1 minut og 72 °C i 1 minut med en afsluttende inkubation ved 72 °C i 5 minutter.
- c) Resultaterne af PCR skal vurderes efter elektroforese med en 2 % agarosegel farvet med ethidiumbromid og med størrelsesmarkører langs med prøverne og de negative kontroller fra RT og PCR. Et enkelt PCR-produkt på 155 bp skal betragtes som tegn på forekomst af ISAV-RNA. Prøver, der indeholder et yderligere produkt, på 310 bp, skal også anses for at indeholde ISAV-RNA. Prøver, der giver flere PCR-produkter, herunder mindst et på ca. 155 bp, kan indeholde ISAV-RNA. Sådanne prøver kan undersøges yderligere ved anvendelse af DNA-prober eller analyse af nucleotidsekvensen.

#### IV.1.4. PCR-bekræftelse af isolering af ISAV i vævskultur

Hvis der under virologisk undersøgelse af vævsprøver har vist sig fuld CPE i SHK-1-celler, fjernes 400 µl af supernatanten fra hullet, og de anbringes i et sterilt 1,5 ml-glas. RNA ekstraheres af denne prøve som i III.1, og der foretages RT-PCR. Hvis der anvendes kulturer uden fuld CPE, fjernes supernatanten og cellerne skræbes af hullets eller beholderens overflade og anbringes i et sterilt 1,5 ml-glas med henblik på RNA-ekstraktion og RT-PCR.

#### IV.1.5. DNA-probe-bekræftelse af PCR-produkter

- a) Specificiteten af et 155 bp PCR-produkt kan vurderes ved probning med et oligonucleotid, der hybridiserer til en del af PCR-produktet, der er indeholdt i primerne. PCR-produkterne underkastes elektroforese i en 1 % agarosegel sammen med størrelsesmarkører og en positiv kontrol og de negative kontroller fra RT og PCR.

- b) DNA overføres til en membran (Southern blot), og det mærkede oligonucleotid (5'-CGGGAGTT-GATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') inkuberes med membranen efter passende prehybridisering.
- c) Ubunden og ikke-specifikt bunden probe vaskes af membranen og bunden probe synliggøres.
- d) Probe, der er bundet til et fragment med 155 bp (og med 310 bp, hvis et sådant fragment forekommer), tages som bevis på PCR's specificitet og er tegn på, at der forekom ISAV-RNA i prøven.

#### IV.1.6. Analyse af nucleotidsekvensen for PCR-produkter

PCR-specificiteten kan vurderes ved undersøgelse af nucleotidsekvensen for PCR-produktet med 155 bp.

- a) PCR-produktet skal renses for agarosegel eller -opløsning.
- b) Fragmentet sekventeres ved hjælp af de samme primere som dem, der anvendes ved PCR, eller vektorprimere, hvis der er klonet til en vektor inden sekventeringen.
- c) Nucleotidsekvensen sammenholdes med de sekvenser for ISAV-segment 8, der findes i EMBL-databasen med nucleotidsekvenser (indgangsnumrene Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) Forekomsten af en sekvens svarende til sekvensen for ISAV-segment 8 er bevis på, at prøven indeholdt ISAV-RNA.

### V. Undersøgelse af nyreaftryk ved hjælp af IFAT

V.1. *Følgende protokol er blevet fastlagt for undersøgelse af nyreaftryk ved hjælp af IFAT*

V.2. *Forberedelse og farvning af aftryk*

V.2.1. Objektglassene fikseres i acetone eller methanol/acetone (1:1) i 3 minutter og lufttørres. Inden farvningen undersøges hvert objektglas og passende områder på objektglasset omkredses med en pen, ImmEdge™ eller lignende, og der lufttørres. Objektglassene anbringes derefter i en blokerende opløsning (6 % skummetmælk i PBS indeholdende 0,2 % Tween 20) og inkuberes under langsom bevægelse i 30 minutter ved rumtemperatur. Hvert objektglas holdes, så væsken løber af, og anbringes horisontalt i en objektglasbeholder med vådt papir, så der opretholdes en fugtig luft.

V.2.2. Hvert aftryk dækkes med en opløsning af monoklonalt antistof 3H6F8 mod ISAV (eller et andet antistof af dokumenteret specificitet og effektivitet), og objektglasbeholderen lukkes og inkuberes under bevægelse i 60 minutter ved rumtemperatur. Antistoffet skal normalt fortyndes fra 1:10 til 1:100 i 1 % skummetmælk, men den faktiske fortynding skal bestemmes for hvert parti. Objektglassene vaskes 3 gange i 2 minutter i PBS indeholdende 0,1 % Tween 20. Hvert aftryk dækkes med en opløsning indeholdende FITC gede-antimusekonjugat fortyndet 1:1 000 i 1 % skummetmælk og inkuberes i fugtig miljø i 60 minutter ved rumtemperatur. Objektglassene vaskes 3 gange i 2 minutter i PBS indeholdende 0,1 % Tween 20. Hvert objektglas dækkes med CITIFLUOR™-opløsning (500 µl CITIFLUOR™ blandet med 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 i PBS) eller ethvert andet egnet mounting medium i 10 minutter. Objektglassene vaskes 3 gange i PBS indeholdende 0,1 % Tween 20. Hvis der er behov for en kontrastfarvning, kan hvert aftryk dækkes med propidiumjodid (0,01 mg/ml) i PBS indeholdende 0,1 % Tween 20 og inkuberes i 3 minutter ved rumtemperatur. Objektglassene vaskes 3 gange i 2 minutter i PBS indeholdende 0,1 % Tween 20. Objektglassene holdes, så væsken løber af, og dyppes i CITIFLUOR™ eller et andet egnet mounting medium. Objektglassene opbevares i mørke ved 4 °C forud for den mikroskopiske undersøgelse.

V.3. *Undersøgelse ved anvendelse af fluorescensmikroskopi*

Hvert objektglas undersøges med et mikroskop, der er egnet til epi-fluorescent belysning, under anvendelse af et egnet filter, der kan excitere FITC og vise den karakteristiske grønne fluorescens. Alle felter inden for de områder, der er markeret med ImmEdge™-pennen, undersøges under x 10- og x 20-objektiver, og mistænkelige områder (dem der viser grøn fluorescens) undersøges yderligere med et x 40-objektiv og fase-/fluorescens-belysning for at sikre, at fluorescensfarvningen er knyttet til celler. Objektglaskoordinaterne for de mistænkelige områder registreres med henblik på en anden medarbejders senere bekræftelse af fluorescensens art. Efter den første medarbejders undersøgelse foretager en anden medarbejder en fornyet undersøgelse af de objektglas, der er positive eller mistænkelige, så resultaterne bekræftes.

V.4. *Kontroller*

V.4.1. Der skal foretages tre typer kontrol af hvert parti objektglas, der er farvet med henblik på IFAT:

- nyreaftryk fra ikke-inficeret laks (negativ kontrol)
- ikke-inficeret SHK-1-cellekultur eller anden modtagelig cellekultur (negativ kontrol)
- ISAV-inficeret SHK-1-cellekultur eller anden modtagelig cellekultur (positiv kontrol).

V.4.2. Hvis der er mulighed herfor, anbefales et nyreaftryk af en ISAV-inficeret laks som en yderligere positiv kontrol.

V.4.3. Hvis der ved en af de negative kontroller opnås et positivt resultat, anses testen for at være ugyldig for alle objektglas i det pågældende parti. Hvis alle objektglas i et parti, herunder også de positive kontroller, giver et negativt resultat, anses testen for at være ugyldig for alle objektglas i det pågældende parti. I tilfælde, hvor forkerte kontrolresultater for et parti objektglas udelukker validering, skal de pågældende objektglas destrueres, og der skal foretages en fornyet undersøgelse under anvendelse af de aftryk, der er taget som dubletter.

V.5. *Undersøgelse af andet væv*

Denne metode kan anvendes for andet fiskevæv såsom lever, milt og hjerte, forudsat at en rimelig mængde endoteliale celler, leukocytter eller lymfocytter kan anbringes på objektglasset. Farvningsmetoden er den samme for alt væv, idet det dog for nogle former væv kan være at foretrække at undgå farvning med propidiumjodid, som er afhængig af fasebelysning ved identifikationen af de celletyper, der forekommer i aftrykket.

VI. **Vævsundersøgelse**

De i paraffin indstøbte sektioner skæres i 5 µm tynde skiver og farves med hæmatoxylin og eosin. Vævsforandringer i forbindelse med ISA er beskrevet i den seneste udgave af OIE's diagnosticeringshåndbog for havdyrsygdomme.

VII. **Akronymer og forkortelser**

cDNA	Komplementær deoxyribonukleinsyre
CPE	Cytopatisk effekt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Deoxynukleotid triphosphat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IF	Immunofluorescens
IFAT	Indirekte fluorescens-antistoftest
IPN(V)	Infektøs pankreasnekrose (virus)
ISA(V)	Infektøs Lakseanæmi (virus)
OIE	Det Internationale Kontor for Epizootier
PBS	Fosfatbufferet saltopløsning
RNA	Ribonukleinsyre
RT-(PCR)	Omvendt transcriptase (polymerasekædereaktion)
SHK-1	Nyreceller af laks
TCID <sub>50</sub>	Vævskulturinfektionsdosis ved 50 % end point