

# COMISSÃO

## DECISÃO DA COMISSÃO

de 13 de Junho de 2003

que estabelece critérios de definição de zonas e vigilância oficial na sequência da suspeita ou confirmação da ocorrência de anemia infecciosa do salmão (ISA)

[notificada com o número C(2003) 1831]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2003/466/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 91/67/CEE do Conselho, de 28 de Janeiro de 1991, relativa às condições de polícia sanitária que regem a introdução no mercado de animais e produtos da aquacultura <sup>(1)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada, pelo Regulamento (CE) n.º 806/2003 <sup>(2)</sup> e, nomeadamente, o seu artigo 15.º,

Tendo em conta a Directiva 93/53/CEE do Conselho, de 24 de Junho de 1993, que introduz medidas comunitárias mínimas de combate a certas doenças dos peixes <sup>(3)</sup>, com a última redacção que lhe foi dada pela Decisão 2001/288/CE da Comissão <sup>(4)</sup>, e, nomeadamente, o n.º 2 do seu artigo 5.º e o seu artigo 6.º,

Considerando o seguinte:

- (1) A Directiva 93/53/CEE estipula que a colheita de amostras e a análise laboratorial para a pesquisa da infecção com doenças das listas I e II, referidas no anexo A da Directiva 91/67/CEE, devem ser realizadas por recurso aos métodos estabelecidos em conformidade com o artigo 15.º da Directiva 91/67/CEE.
- (2) Os planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação das doenças de peixes da lista II septicémia hemorrágica viral (VHS) e necrose hematópóietica infecciosa (IHN) são estabelecidos pela Decisão 2001/183/CE da Comissão <sup>(5)</sup>.
- (3) Em conformidade com o n.º 2 do artigo 5.º e o artigo 6.º da Directiva 93/53/CEE, todas as explorações situadas na mesma zona de captação de águas ou na mesma zona costeira de uma exploração em que seja suspeitada ou confirmada a infecção com o vírus da anemia infecciosa

do salmão devem ser colocadas sob vigilância oficial. Importa estabelecer os critérios de definição de zonas e vigilância oficial.

- (4) Para definir os planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação da ISA, bem como para estabelecer os critérios de definição de zonas e vigilância oficial na sequência da suspeita ou confirmação da referida doença, deverão consultar-se peritos no domínio da sanidade dos peixes e das análises laboratoriais. Deverão também ser tidas em conta as directrizes para o diagnóstico da ISA estabelecidas na última edição do Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases do Gabinete Internacional de Epizootias.
- (5) Deve prever-se um período suficiente para a aplicação das novas exigências.
- (6) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Permanente da Cadeia Alimentar e da Saúde Animal,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

Os planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação da anemia infecciosa do salmão (ISA), bem como os critérios de definição de zonas e vigilância oficial na sequência de suspeita ou confirmação de ISA, são estabelecidos no anexo da presente decisão.

Artigo 2.º

A presente decisão é aplicável a partir de 23 de Outubro de 2003.

<sup>(1)</sup> JO L 46 de 19.2.1991, p. 1.

<sup>(2)</sup> JO L 122 de 16.5.2003, p. 1.

<sup>(3)</sup> JO L 175 de 19.7.1993, p. 23.

<sup>(4)</sup> JO L 99 de 10.4.2001, p. 11.

<sup>(5)</sup> JO L 67 de 9.3.2001, p. 65.

*Artigo 3.º*

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 13 de Junho de 2003.

*Pela Comissão*  
David BYRNE  
*Membro da Comissão*

---

## ANEXO

**planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação da anemia infecciosa do salmão (ISA) e critérios de definição de zonas e vigilância oficial na sequência de suspeita ou confirmação de ISA**

## INTRODUÇÃO E DEFINIÇÕES

O presente anexo:

- a) Estabelece directrizes e exigências mínimas aplicáveis aos planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação da ocorrência de ISA.
- b) Integra as disposições e definições estabelecidas nas Directivas 91/67/CEE e 93/53/CEE.
- c) Estabelece disposições para o diagnóstico, o controlo e a vigilância adequados da ISA, em caso de suspeita ou confirmação da sua ocorrência.
- d) Tem por destinatários as autoridades responsáveis pelo controlo da ISA e o pessoal de laboratório que executa os testes para a pesquisa da doença em causa. Confere-se especial destaque aos procedimentos de amostragem, aos princípios e aplicações dos testes laboratoriais e à avaliação dos seus resultados, bem como às técnicas laboratoriais pormenorizadas. Todavia, se adequado, os laboratórios poderão efectuar alterações aos testes descritos no presente anexo ou utilizar testes diversos, na condição de poder demonstrar-se que os mesmos apresentam uma sensibilidade e especificidade igual ou superior. Prevêem-se também critérios para o estabelecimento de zonas e vigilância oficial na sequência da suspeita ou confirmação de ISA.

Para os fins do presente anexo, utilizam-se as seguintes definições adicionais:

«Bacia de captação» designa a totalidade de uma bacia de captação, da nascente à foz, ou a parte de uma bacia de captação compreendida entre a nascente de um curso de água e uma barreira natural ou artificial que impeça a migração dos peixes para jusante;

«Zona costeira» designa uma porção de costa, um corpo de água salgada ou um estuário, com delimitação geográfica precisa, que consiste num sistema hidrodinâmico homogéneo ou numa série de sistemas desse tipo.

A parte I estabelece os princípios gerais e os critérios de diagnóstico e confirmação de ISA, bem como os critérios de definição de zonas e vigilância oficial a aplicar na sequência de suspeita ou confirmação da ocorrência de ISA.

A parte II estabelece as inspecções e amostragens a efectuar para a detecção da ocorrência de ISA.

A parte III estabelece os métodos a utilizar para o exame virológico.

A parte IV descreve o procedimento para a análise de amostras por RT-PCR, tendo em vista a detecção de ISA.

A parte V descreve o protocolo a utilizar para o exame de impressões renais por IFAT, para a pesquisa de ISA.

A parte VI refere-se à metodologia no domínio histológico.

A parte VII apresenta uma lista dos acrónimos e abreviaturas utilizados.

**I. Critérios de diagnóstico da ISA e de definição de zonas; medidas de controlo e vigilância oficial****I.1. Princípios gerais de diagnóstico da ISA**

Os motivos fundamentados para suspeitar a infecção de peixes com ISAV são definidos na parte I.2 do presente anexo. Sempre que se suspeite a infecção de peixes de uma exploração com ISAV, os Estados-Membros deverão assegurar a realização num prazo tão breve quanto possível de uma investigação oficial com o objectivo de confirmar ou excluir a ocorrência da doença, procedendo a inspecções e exames clínicos, bem como à colheita e selecção de amostras e à aplicação dos métodos de exame laboratorial referidos nas partes III-VI do presente anexo. Para a confirmação oficial da ocorrência de ISA, devem ser satisfeitos todos os critérios das três séries de critérios estabelecidos na parte I.3 do presente anexo.

**I.2. Suspeita de infecção com ISA**

I.2.1. Deve suspeitar-se a ocorrência de ISA se for satisfeito pelo menos um dos seguintes critérios:

- a) Existência de dados necrópsicos compatíveis com a ISA, com ou sem sinais clínicos da doença. Os sinais necrópsicos e os sinais clínicos de doença devem corresponder aos estabelecidos na última edição do Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases do GIE;
- b) Isolamento e identificação de ISAV em culturas celulares de uma amostra isolada de um peixe da exploração, como descrito na parte III;

- c) Dados fundamentados da presença de ISAV obtidos por dois testes laboratoriais independentes tais como RT-PCR (parte IV) e IFAT (parte V);
- d) Transferência de peixes vivos para uma exploração relativamente à qual existem motivos razoáveis para supor que se encontrava infectada com ISA aquando da transferência;
- e) Existência de dados de investigação que revelem outras relações epidemiológicas significativas com explorações em que a infecção com ISA seja suspeita ou confirmada.

I.2.2. Uma suspeita de ISA poderá ser infirmada se uma investigação contínua que inclua, pelo menos, uma inspecção clínica por mês num período de seis meses não revelar provas significativas da ocorrência de ISA.

### I.3. *Confirmação da ISA*

A ocorrência de ISA deverá considerar-se confirmada se forem satisfeitos os critérios referidos em a), b) ou c):

- a) Observação de sinais clínicos e sinais necrópsicos compatíveis com a ISA, em conformidade com última edição do Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases do GIE, nomeadamente peixes mortos ou enfraquecidos, sinais de anemia, outros sinais necrópsicos e alterações patológicas, bem como detecção de ISAV por um ou mais dos seguintes métodos:
  - i) isolamento e identificação do ISAV em culturas celulares de, pelo menos, uma amostra de um peixe da exploração, da forma descrita na parte III,
  - ii) detecção do ISAV por RT-PCR, de acordo com a metodologia descrita na parte IV,
  - iii) detecção do ISAV em tecidos ou preparações de tecidos por intermédio de anticorpos específicos contra o ISAV (por exemplo, IFAT com impressões renais, do modo descrito na parte V);
- b) Isolamento e identificação do ISAV em duas amostras provenientes de um ou mais peixes da exploração examinadas em ocasiões diversas, de acordo com o método descrito na parte III;
- c) Isolamento e identificação do ISAV em, pelo menos, uma amostra de um peixe da exploração por recurso ao método descrito na parte III, incluindo resultados obtidos por de RT-PCR (parte IV) ou IFAT (parte V) que corroborem a presença de ISAV em preparações de tecidos de um peixe da exploração.

### I.4. *Critérios para o estabelecimento e a revogação de zonas de controlo e vigilância oficial na sequência de uma suspeita ou confirmação de infecção com ISA*

I.4.1. Para efeitos do estabelecimento de um programa oficial de vigilância dos riscos, os Estados-Membros deverão definir zonas de controlo e vigilância adequadas nas imediações de uma exploração em que a infecção com ISA seja suspeita ou confirmada.

I.4.2. As zonas a estabelecer serão definidas por análise caso a caso dos riscos de propagação da doença. De acordo com a situação epizootológica, a bacia de captação ou zona costeira em causa:

- deverá ser definida coma zona de controlo, ou
- no caso de bacias de captação e zonas costeiras extensas, deverá ser dividida numa zona de controlo e uma zona de vigilância, sem prejuízo da prevenção da propagação do ISA.

Além disso, poderão estabelecer-se zonas de vigilância adicionais no exterior da bacia de captação ou zona costeira, em função das necessidades.

I.4.3. Os principais factores a ter em conta para o estabelecimento das zonas atrás referidas são os factores que influenciam os riscos de propagação da doença a peixes de cultura e peixes selvagens, nomeadamente a mortalidade, a taxa de mortalidade e a distribuição da mortalidade dos peixes na exploração em que a infecção com ISAV seja suspeita ou confirmada; a causa da mortalidade na exploração em questão; a distância às explorações vizinhas e a densidade populacional das mesmas; as explorações em contacto; as espécies presentes nas explorações; a gestão aplicada às explorações afectadas e explorações vizinhas; as condições hidrodinâmicas e outros factores de relevância epidemiológica estabelecidos no contexto da investigação epizootica efectuada em conformidade com o n.º 2 do artigo 5.º e o artigo 8.º da Directiva 93/53/CEE.

I.4.4. Para o estabelecimento das zonas deverão aplicar-se os seguintes critérios mínimos:

I.4.4.1. Uma «zona de controlo» deverá ser estabelecida pelo Estado-Membro do modo que seguidamente se descreve, na vizinhança imediata de uma exploração em que a infecção com ISAV seja suspeita ou confirmada:

- em zonas costeiras: área inscrita num círculo de raio mínimo igual a uma excursão de maré, mas nunca inferior a 5 km, centrado na exploração cuja infecção com ISAV tenha sido confirmada, ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados,
- em zonas interiores: a totalidade da bacia de captação da exploração cuja infecção com ISAV tenha sido confirmada; no caso de bacias de captação extensas, os Estados-Membros podem limitar a extensão da zona a porções da bacia de captação, sem prejuízo da prevenção da propagação da ISA.

I.4.4.2. Uma «zona de controlo temporária» é estabelecida em caso de suspeita da ocorrência de ISA, com base nos mesmos critérios aplicáveis ao estabelecimento da «zona de controlo».

I.4.4.3. Se necessário, o Estado-Membro poderá estabelecer uma «zona de vigilância» no exterior na zona de controlo, em áreas em que se considere suficiente uma vigilância menos intensiva; a «zona de vigilância» é definida do seguinte modo:

- em zonas costeiras: uma área em torno da zona de controlo resultante da sobreposição de zonas de excursão de maré, ou uma área inscrita num círculo de 10 km de raio em torno da zona de controlo e concêntrica com esta, ou uma área equivalente determinada em função de dados hidrodinâmicos ou epidemiológicos adequados,
- em zonas interiores: se necessário, deverá consistir numa zona alargada no exterior da zona de controlo estabelecida;

I.5. *Vazio sanitário e revogação de zonas estabelecidas*

I.5.1. A autoridade competente do Estado-Membro deverá assegurar que todas as explorações na zona de controlo sejam sujeitas a um período adequado de vazio sanitário, após a remoção da totalidade dos peixes, e desinfectadas de acordo com as necessidades. A duração do período de vazio sanitário em explorações em que seja confirmada a infecção com ISA não deverá ser inferior a seis meses. A extensão do período de vazio sanitário a outras explorações nas zonas de controlo deverá ser determinada pela autoridade competente com base numa avaliação de riscos caso a caso. Após o esvaziamento de todas as explorações da zona de controlo, deve prever-se um período mínimo de seis semanas de vazio sanitário sincronizado.

Além disso, a autoridade competente poderá decidir o vazio sanitário de explorações em zonas de vigilância estabelecidas.

I.5.2. As zonas de controlo estabelecidas não podem ser revogadas nem repovoadas sem que tenham sido removidos os peixes de todas as explorações situadas nas mesmas e que as explorações em causa tenham sido desinfectadas de acordo com as necessidades e sujeitas a vazio sanitário em conformidade com o disposto em I.5.1. Após o repovoamento das zonas, as zonas de controlo deverão ser convertidas em zonas de vigilância de acordo com o disposto em I.4.4.3.

I.5.3. As zonas de controlo temporárias estabelecidas não podem ser revogadas até a suspeita de ISA ser excluída, em conformidade com a disposto na parte I.2.2. Em caso de confirmação de ISA em conformidade com o disposto na parte I.3, a zona de controlo temporária deverá ser convertida em zona de controlo.

I.5.4. As zonas de vigilância estabelecidas não podem ser revogadas menos de dois anos após a revogação da zona de controlo.

I.6. *Vigilância oficial na sequência de suspeita ou confirmação de infecção com ISA*

I.6.1. Em conformidade com o n.º 2 do artigo 5.º e o artigo 6.º da Directiva 93/53/CEE e com o objectivo de estabelecer a distribuição e a evolução da doença na sequência de uma suspeita ou confirmação da ocorrência de ISA numa exploração, a autoridade competente ou os serviços sanitários qualificados deverão aplicar um programa de vigilância oficial dos riscos em todas as explorações situadas nas zonas estabelecidas.

I.6.2. Para fins de aplicação do referido programa de vigilância oficial, a autoridade competente deverá, se necessário através de uma inspecção no local, identificar todas as explorações nas zonas estabelecidas e proceder a um recenseamento oficial das espécies, categorias e dos números de peixes existentes nas explorações, incluindo dados relativos à mortalidade.

- I.6.3. Na sequência do recenseamento oficial, as explorações situadas em zonas de controlo temporário(as) estabelecidas que contenham salmão do Atlântico (*Salmo salar*), ou quaisquer outras espécies referidas na última edição do Aquatic Animal Health Code do GIE como sensíveis à ISA ou potenciais vectores da mesma, deverão comunicar as mortalidades à autoridade competente de 14 em 14 dias. Deverá comunicar-se o aumento de mortalidade por jaula e por dia. A autoridade competente deverá investigar qualquer aumento significativo da mortalidade numa dada exploração.

Se a suspeita for confirmada, todas as explorações na zona de controlo estabelecida deverão comunicar semanalmente à autoridade competente a mortalidade por jaula e por dia.

As explorações nas zonas de vigilância deverão comunicar à autoridade competente a mortalidade de 14 em 14 dias.

Além disso, deverão realizar-se ao longo do ano inspecções regulares nas zonas estabelecidas, com a frequência referida no quadro 1. Todavia, se as condições climáticas impossibilitarem a realização das inspecções durante uma parte do ano, os planos de emergência estabelecidos pelos Estados-Membros deverão fixar outras frequências de inspecção.

#### Quadro 1

##### Programa de vigilância oficial

Localização da exploração	Número mínimo de inspecções anuais	Número mínimo de inspecções anuais após a revogação da zona de controlo
Zona de controlo	12	
Zona de vigilância	6	6
Zona de controlo temporária	6	

O programa de vigilância deverá ser aplicado até à revogação das zonas.

- I.6.4. As inspecções, bem como a selecção, colheita, preparação e expedição das amostras, deverão ser efectuadas do modo referido na parte II.1-II.4. A análise das amostras deverá ser efectuada em conformidade com a parte III-VI.

## II. Inspeção e amostragem

### II.1. *Inspeção, selecção e colheita de amostras em explorações suspeitas de infecção com ISA*

- II.1.1. No âmbito das inspecções regulares efectuadas no contexto do programa de vigilância oficial referido na parte I.6, todas as instalações (jaulas, tanques ou lagos) das explorações suspeitas de infecção com ISA devem ser inspeccionadas para a pesquisa de peixes mortos, enfraquecidos ou com um comportamento anormal. Sempre que possível, os peixes recentemente mortos (sem sinais de decomposição), enfraquecidos ou com comportamento anormal devem ser examinados para pesquisa de sinais clínicos ou dados necrópsicos compatíveis com a ISA, em conformidade com o descrito na última edição do Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases do GIE.

- II.1.2. Caso se observem sinais clínicos recentes compatíveis com a ISA, ou se um inspector ou veterinário tiver outro motivo para suspeitar a existência de peixes infectados, deve colher-se uma amostra de, pelo menos, 10 peixes. Sempre que possível, a amostra deverá ser constituída por peixes mortos recentemente, enfraquecidos ou que exibam um comportamento anormal. Se o número de peixes que mostrem sinais clínicos for insuficiente, a amostra poderá ser suplementada com peixes saudáveis seleccionados das jaulas, tanques ou lagos que exibam a mortalidade mais elevada ou o maior número de peixes com sinais clínicos da doença.

- II.1.3. Caso se observem peixes mortos recentemente, enfraquecidos ou com comportamento anormal mas os sinais clínicos e dados necrópsicos não forem compatíveis com a ISA, a colheita de amostras não é obrigatória, embora o inspector ou veterinário possam solicitar a recolha das mesmas para a realização de um diagnóstico diferencial.

II.1.4. Caso se suspeite a infecção de peixes selvagens com ISA, os Estados-Membros providenciarão pela colheita e análise de amostras adequadas, que deverão ser examinadas pelos métodos clínicos e laboratoriais adequados estabelecidos nas partes II e III-VI, de forma a excluir ou confirmar a ocorrência de ISA, bem como avaliar se a ocorrência da doença constitui um risco significativo para os peixes de cultura.

## II.2. *Preparação das amostras de peixes*

II.2.1. Apenas devem colher-se amostras para exame histológico de peixes recentemente mortos que apresentem sinais clínicos ou necróticos compatíveis com a ocorrência da doença. Devem colher-se, com o auxílio de um bisturi, amostras de quaisquer lesões externas ou internas, bem como, de forma sistemática, amostras de fígado, rim médio, coração e baço, transferindo-as para uma solução-tampão isotónica de formol a 8-10 %. A proporção fixador/tecido deve ser de, pelo menos, 20:1, de modo a garantir a conservação satisfatória dos tecidos.

II.2.2. Devem colher-se, para exame virológico, tecidos de todos os peixes das amostras. As amostras devem ser colhidas em duplicado, para fins comprovativos. Com o auxílio de um instrumento estéril, remover pedaços de fígado, rim anterior, coração e baço do peixe e transferir para tubos de plástico com 9 ml de solução de transporte (meio de cultura celular com antibióticos). Uma mistura de 12,5 µg/ml de fungizona, 200 IU/ml de polimixina B, e 200 µg/ml de canamicina é adequada, podendo contudo utilizar-se outras misturas de eficiência comprovada. Podem juntar-se no mesmo tubo com solução de transporte tecidos provenientes de cinco peixes, constituindo assim uma amostra grupada. A massa de tecido de cada amostra deve ser da ordem de  $1,0 \pm 0,5$  g.

II.2.3. As impressões renais para exame por IFAT devem ser colhidas de peixes mortos recentemente, isto é, nas duas horas seguintes à morte. Remover um pedaço de rim médio do peixe por recurso a um instrumento estéril. Limpar o tecido com papel absorvente, para remover o sangue em excesso, e pressioná-lo repetidamente contra uma lâmina de vidro revestida com poli-L-lisina. As impressões devem ser adjacentes, sem sobreposição, de forma a obter uma única camada contínua de células. O sangue e os tecidos fluidos não apresentam relevância para o teste em causa. Deve evitar-se o contacto prolongado da amostra de rim com papel absorvente, facto que pode conduzir à coagulação do sangue, com o consequente depósito de quantidades elevadas de proteínas séricas na lâmina. Secar as impressões ao ar e mantê-las ao abrigo do calor e da humidade, caso não sejam fixadas imediatamente. A fixação das impressões deve ser efectuada nas 72 horas seguintes à colheita das amostras de peixe. Em alternativa, as impressões podem ser congeladas após a secagem ao ar e armazenadas por um período não superior a um mês, a  $-20$  °C, antes da fixação.

II.2.4. Os peixes que apresentem sinais de anemia podem ser atordoados, devendo colher-se de imediato amostras de sangue heparinizado para exame hematológico, nomeadamente determinação do hematócrito.

II.2.5. Para análise por RT-PCR, devem colher-se amostras de todos os peixes recolhidos. Com o auxílio de um instrumento estéril, remover um pedaço de rim anterior ou médio do peixe e transferir para um tubo de microcentrifugadora contendo 1 ml de solução de RNA de conservação de eficácia comprovada. Podem juntar-se no mesmo tubo com solução de transporte tecidos provenientes de cinco peixes, constituindo assim uma amostra grupada. A massa de tecido numa amostra deverá ser de aproximadamente 0,5 g. Caso os peixes forem demasiado pequenos para obter uma amostra com a massa pretendida, podem recolher-se, por ordem de preferência, pedaços de rim, coração, baço, fígado e cego pilórico, até perfazer a referida massa.

## II.3. *Expedição das amostras de peixes*

II.3.1. As amostras de sangue e os tubos que contêm tecidos de peixes para exame virológico ou análise por transcrição reversa devem colocar-se em recipientes isolados (por exemplo, caixas espessas de poliestireno) com uma quantidade de gelo ou de blocos congeladores suficiente para assegurar a refrigeração das amostras durante o transporte para o laboratório. Deve evitar-se a congelação; todavia, aquando da recepção, deverá ainda estar presente gelo na caixa ou, caso se tenha utilizado blocos congeladores, um ou mais destes últimos deverão estar ainda total ou parcialmente congelados. Em casos excepcionais, as amostras para transcrição reversa e exame virológico podem ser sujeitas a congelação rápida e transportadas para o laboratório a uma temperatura igual ou inferior a  $-20$  °C.

II.3.2. As lâminas para IFAT devem ser expedidas em caixas adequadas com uma quantidade de exsiccante suficiente para manter as impressões secas e refrigeradas como descrito *supra*.

II.3.3. Se os tecidos de peixes forem transportados em fixador para exame histológico, deverão ser expedidos em tubos estanques colocados em resistentes ao impacto, nomeadamente caixas espessas de poliestireno.

- II.3.4. Excepto no caso de amostras terem sido congeladas, o exame virológico deverá ter início logo que possível, menos de 72 horas após a colheita das amostras. A amostra para análise comprovativa deverá ser armazenada a uma temperatura igual ou inferior a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  à chegada ao laboratório.
- II.3.5. Podem ser transportados peixes inteiros para o laboratório, se for possível cumprir os requisitos de temperatura referidos em II.3.1. Os peixes inteiros deverão ser envolto em papel absorvente e expedidos num invólucro de plástico, refrigerado do modo descrito *supra*.
- II.3.6. Podem também expedir-se peixes vivos, mas apenas sob a supervisão do serviço oficial.
- II.3.7. No caso da análise por R-PAR de tecidos conservados em RALatex, a extracção do RA deverá ser efectuada num determinado período, em função da temperatura de armazenagem das amostras. Apresentam-se de seguida os períodos em causa:
- |                                 |                 |
|---------------------------------|-----------------|
| — $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  | um dia          |
| — $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  | uma semana      |
| — $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   | um mês          |
| — $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ | indefinidamente |
- II.3.8. Todas as operações de embalagem e rotulagem devem ser executadas em conformidade com a regulamentação em vigor para o transporte nacional ou internacional, consoante o caso.

#### II.4. Colheita de material de diagnóstico complementar

Com o acordo do laboratório de diagnóstico, podem colher-se e preparar-se para exame complementar outros tecidos de peixes.

### III. Exame pirológico

#### III.1. Preparação das amostras

III.1.1. Caso SURJA dificuldades práticas que impossibilitem a inoculação das células nas 72 horas subsequentes à colheita das amostras de tecidos, pode congelar-se o tecido a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período não superior a 28 dias. O tecido deverá ser congelado e descongelado uma única vez antes do exame.

III.1.2. Cada amostra (mistura de tecidos em solução de transporte) deverá ser perfeitamente homogeneizada num digestor, misturador ou almofariz e centrifugada a 2000-4000 g durante 15 minutos, a  $0-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , devendo o sobrenadante ser filtrado num filtro de  $0,45\text{ }\mu\text{m}$  e incubado com igual volume de uma mistura devidamente diluída de antissoros contra o serótipo indígena de IPNV. O título do antissor deverá ser de, pelo menos, 1:2000, num teste de neutralização em placa a 50 %. Após incubação a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante uma hora, esta mistura constitui o inóculo.

O tratamento de todos os inóculos com antissor anti-vírus IPN (vírus que, em algumas regiões da Europa, ocorre em 50 % das amostras de peixes) tem por objectivo evitar a ocorrência, nas células de cultura inoculadas, de efeito citopático devido ao vírus IPN, reduzindo desta forma a duração dos exames virológicos, bem como o número de casos em que a ocorrência de efeito citopático seria considerada como um potencial indicador de ISAV.

O tratamento dos inóculos com antissor anti-vírus IPN pode ser omitido no caso de amostras provenientes de unidades de produção, consideradas indemnes de IPN.

#### III.2. Inoculação das culturas celulares

III.2.1. Cultivar células SHK-1 (com um número de passagens não superior a 80) ou TO em meio L-15 contendo 5 % de soro fetal de bovino, 2 % (v/v) de L-glutamina 200 mM e 0,08 % (v/v) de 2-mercaptoetanol 50 mM, em placas de 12 ou 24 alvéolos. Para o isolamento do ISAV podem utilizar-se outras linhagens celulares de eficácia e sensibilidade comprovadas, tendo em conta a variabilidade das estirpes e a capacidade de replicação das diversas estirpes em diversas linhagens celulares. Inocular a suspensão de órgão tratada com antissor em culturas celulares jovens numa fase de crescimento activo, de forma a obter uma diluição final do tecido no meio de cultura de 1:1000. Para cada suspensão de órgão, adicionar 40  $\mu\text{l}$  de inóculo a um alvéolo com 2 ml de meio de cultura. Para minimizar o risco de contaminação cruzada, recomenda-se a utilização de placas de 12 ou 24 alvéolos separadas para amostras provenientes de explorações piscícolas diferentes.

III.2.2. Não inocular uma das placas, que constituirá a testemunha negativa. Inocular outra placa com um isolado de referência de ISAV (testemunha positiva), da forma que seguidamente se descreve. Inocular 100 µl de preparação-mãe de ISAV (título mínimo: 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/50 ml) no primeiro alvéolo, misturando bem. Transferir uma porção deste material do primeiro alvéolo para o segundo, de forma a obter uma diluição de 1:10; misturar bem. Repetir a operação de forma a obter seis diluições 1:10. A preparação-mãe de ISAV pode ser armazenada a - 80 °C durante, pelo menos, dois anos, devendo todavia ser utilizada nos três dias seguintes ao descongelamento. Nota: devem adoptar-se os cuidados necessários para evitar a contaminação cruzada das placas em análise com material proveniente de testemunhas positivas. Para tal, as placas utilizadas para as testemunhas positivas devem ser diferentes das utilizadas para as amostras a analisar e ser manipuladas separadamente.

III.2.3. Incubar as amostras a 14 ± 2 °C por um período não superior a 15 dias.

### III.3. *Microscopia*

Efectuar o exame microscópico das culturas celulares para pesquisa de efeito citopático duas vezes, designadamente 5-7 dias e 12-14 dias após a inoculação. Caso se observe efeito citopático em algum alvéolo, iniciar de imediato os procedimentos de identificação viral (III.6). Caso não se observe o referido efeito até ao 14.º dia, realizar um teste de hemadsorção (III.4).

### III.4. *Hemadsorção*

A replicação do vírus ISAV em culturas celulares nem sempre produz efeito citopático. Desta forma, todos os alvéolos devem ser sujeitos a um teste de hemadsorção do modo que se descreve de seguida ou, alternativamente, a um teste de imunofluorescência, descrito em III.6.1.

III.4.1. Remover o meio de cultura celular de todos os alvéolos, incluindo os alvéolos das testemunhas positiva e negativa, e colocar em tubos estéreis rotulados. Adicionar a cada alvéolo 500 µl de uma suspensão a 0,2 % (v/v) de eritrócitos lavados de coelho ou cavalo ou de uma suspensão a 0,05 % (v/v) de eritrócitos lavados de truta arco-íris ou salmão do Atlântico e incubar à temperatura ambiente durante 45 minutos. Remover os eritrócitos e lavar cada alvéolo duas vezes com meio L-15. Proceder ao exame microscópico de todos os alvéolos.

III.4.2. A presença de aglomerados de eritrócitos na superfície das células SHK-1 ou TO indica uma provável infecção com um ortomixovírus. Caso um teste de hemadsorção se revele positivo, deverá efectuar-se de imediato um teste de identificação viral (III.6).

### III.5. *Subcultura ou passagem*

III.5.1. Efectuar a subcultura entre o 13.º e o 15.º dia. Em placas de 12 alvéolos, adicionar 225 µl de sobrenadante de cultura a alvéolos que contenham novas células SHK-1 em crescimento activo e incubar a 14 ± 2 °C por um período não superior a 18 dias. Proceder ao exame microscópico das culturas celulares para a pesquisa de efeito citopático duas vezes, designadamente entre o 5.º e o 7.º dia e entre o 14.º e o 18.º dia após a inoculação. Se alguma cultura exhibir efeito citopático, deverão iniciar-se de imediato os procedimentos de identificação do vírus (III.6). Caso não se observe efeito citopático entre o 14.º e o 18.º dia, deverá efectuar-se um teste de hemadsorção (III.4).

III.5.2. Caso se observe citotoxicidade nos primeiros sete dias de incubação, a subcultura deverá ser efectuada de imediato; incubar as células durante 14-18 dias e proceder a uma nova subcultura, incubando durante um período complementar de 14-18 dias. Se ocorrer citotoxicidade após o 7.º dia, efectuar uma única subcultura e incubar as células de forma a que o período de incubação total seja de 28-36 dias a contar da primeira inoculação.

III.5.3. Em caso de ocorrência de contaminação bacteriana da cultura primária, o teste deverá ser repetido utilizando o homogeneizado de tecido armazenado a - 80 °C. Centrifugar o homogeneizado de tecido a 4000 g durante 30 minutos, a 0-6 °C, e filtrar o sobrenadante num filtro de 0,22 µm, antes da inoculação. Se ocorrer contaminação bacteriana na fase de subcultura, filtrar o sobrenadante num filtro de 0,22 µm, inocular em células novas e incubar durante 14-18 dias suplementares.

### III.6. Testes de identificação viral

Caso se observe efeito citopático em alguma fase ou um teste de hemadsorção se revele positivo, deverá proceder-se à identificação viral. Os métodos a utilizar para a identificação de ISAV são a imunofluorescência (III.6.1) e a transcrição reversa/polimerização em cadeia (parte IV). Caso se considere provável a presença de outros vírus, recomenda-se a realização de testes de identificação viral complementares. Se os testes em causa não permitirem a identificação definitiva do vírus numa semana, deverá enviar-se o sobrenadante para um laboratório nacional de referência ou para o laboratório de referência da UE para as doenças de peixes, para identificação imediata.

#### III.6.1. Imunofluorescência

- III.6.1.1. Cultivar células SHK-1 (com um número de passagens não superior a 80) ou TO em meio L-15 contendo 5 % de soro fetal de bovino, 2 % (v/v) de L-glutamina 200 mM e 0,08 % (v/v) de 2-mercaptoetanol 50 mM, em placas de 24 ou 96 alvéolos, até obter uma confluência superior a 50 %. Podem utilizar-se outras linhagens celulares ou meios de cultura de eficácia comprovada. Adicionar 225 µl de sobrenadante de cada cultura supostamente infectada com vírus a cada um de dois alvéolos, misturar e transferir 225 µl para dois novos alvéolos (diluição 1:5). Devem manter-se, como testemunhas, dois alvéolos adicionais não inoculados. As amostras provenientes de explorações piscícolas diversas devem ser examinadas em placas separadas, o mesmo sucedendo com a testemunha positiva. Esta última deverá ser preparada a partir do isolado de referência de ISAV.
- III.6.1.2. Incubar as placas a  $14 \pm 2$  °C e efectuar o exame microscópico até ao 7.º dia. Caso se observe efeito citopático num estágio precoce, ou caso não se observe qualquer efeito citopático até ao 7.º dia, o passo seguinte consistirá na fixação. Lavar os alvéolos com PBS e fixar por incubação com acetona a 80 % durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Secar as placas ao ar e corá-las de imediato ou, alternativamente, armazená-las a 0-6 °C por um período não superior a 24 horas antes da coloração.
- III.6.1.3. Corar os alvéolos em duplicado com anticorpo monoclonal 3H6F8 anti-ISAV ou outro anticorpo monoclonal de eficácia e especificidade comprovadas, diluir em PBS e incubar a  $37 \pm 4$  °C durante 30 minutos. Remover o anticorpo monoclonal e lavar as placas três vezes com solução a 0,05 % de Tween 20 em PBS. Adicionar a cada alvéolo conjugado FITC IgG anti-ratinho diluído em PBS e incubar a  $37 \pm 4$  °C durante 30 minutos. Nota: as diluições dos diversos lotes de anticorpo monoclonal e conjugado de FITC deverão ser optimizadas em cada laboratório. Remover o anticorpo e lavar as placas três vezes com solução a 0,05 % de Tween 20 em PBS.
- III.6.1.4. Examinar de imediato os alvéolos num microscópio invertido para microscopia de fluorescência munido de um filtro adequado para excitação de FITC. O teste deverá ser considerado positivo caso se observem células fluorescentes. Para a validação do teste, as testemunhas positivas devem apresentar resultados positivos e as testemunhas negativas devem apresentar resultados negativos.

### IV. Exame das amostras por R-PAR

IV.1. *A presente secção descreve os procedimentos para a amplificação parcial do segmento 8 do genoma ISAV por polimerização em cadeia, aplicáveis a tecidos de peixes ou culturas de ISAV*

#### IV.1.1. Extracção do RA

- a) Remover o RAlatex de todas as amostras. Adicionar a cada tubo 1 ml de água destilada tratada com DEPC e centrifugar os tubos a 13 000 rpm durante 5 minutos, a 0-6 °C;
- b) Remover o sobrenadante de todas as amostras e adicionar 800 µl de TRIzol (Invitrogen) ou de outro reagente de eficácia igual ou superior, a cada amostra, bem como a um tubo contendo uma testemunha adequada (400 µl dH<sub>2</sub>O ou homogeneizado renal de peixe isento do agente patogénico em causa). Se necessário, desagregar os tecidos por pipetagem repetida. Incubar os tubos à temperatura ambiente durante 5 minutos. Adicionar a cada tubo 160 µl de clorofórmio e agitar vigorosamente durante 3 minutos, centrifugando de seguida a 13 000 rpm, durante 15 minutos, a 0-6 °C;
- c) Remover a camada superior aquosa para um tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml rotulado contendo 500 µl de isopropanol e incubar os tubos durante 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugando de seguida a 6 500 rpm durante 15 minutos, a 0-6 °C;

- d) Remover o sobrenadante e adicionar 1 ml de etanol a 75 % ao sedimento de RA. Centrifugar os tubos a 6 500 rpm durante 5 minutos, a 0-6 °C;
- e) Remover o sobrenadante e deixar os tubos abertos durante cerca de 3 minutos, para permitir a evaporação do etanol remanescente. Adicionar 15 µl de água destilada tratada com DEPC para ressuspender o sedimento, agitando brevemente num vórtex, se necessário;
- f) Utilizar um espectrofotómetro para calcular a concentração do RA e a pureza das amostras. Determinar a densidade óptica a 260 e 280 nm;
- g) O RA a utilizar de imediato (isto é, no mesmo dia), pode ser armazenado temporariamente a 0-6 °C. O RA não utilizado de imediato deve ser armazenado a -80 °C.

#### IV.1.2. Transcrição reversa

- a) Em tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml, diluir 2 µg de RA em água destilada tratada com DEPC. Se a concentração de RA de uma determinada amostra for demasiado baixa para permitir o uso de 2 µg na reacção de transcrição reversa, deverá utilizar-se a maior quantidade possível de RA. Incubar o RA diluído a 55-60 °C durante 10 minutos;
- b) Colocar em gelo os tubos com RA e adicionar os reagentes de transcrição reversa de forma a obter concentrações finais, em tampão não diluído, de 1mM de dNTPs, 100 ng de hexámeros aleatórios, 20 U de inibidor de RNase e 200 U de MMLV-R, num volume total de 20 µl.
- c) Incubar os tubos a 37 °C durante uma hora.
- d) O cDNA deve ser armazenado a 0-6 °C até à utilização, devendo ser utilizado em PAR logo que possível.

#### IV.1.3. Polimerização em cadeia

- a) Adicionar 5 µl de cDNA a 45 µl de mistura para PAR de modo a obter concentrações finais, em tampão não diluído, de 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada iniciador e 1U de polimerase de Taq. Os iniciadores são ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (iniciador directo) e ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (iniciador inverso). Devem incluir-se testemunhas negativas nas fases de extracção, transcrição reversa e polimerização em cadeia;
- b) Colocar os tubos num aparelho de PAR programado do seguinte modo: 94 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto; 55 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 1 minuto; incubação final a 72 °C durante 5 minutos;
- c) Os resultados de polimerização em cadeia são analisados por electroforese em gel de agarose a 2 % corado com brometo de etídio dos produtos de polimerização das amostras em análise, na presença de marcadores de peso molecular e das testemunhas negativas das fases de transcrição reversa e polimerização em cadeia. A presença de um único produto de polimerização em cadeia com 155 pb deverá considerar-se indicadora da presença de RA de ISAV. Deverá também considerar-se que as amostras de que resulte um produto adicional com 310 pb contêm RA de ISAV. As amostras que contenham vários produtos de polimerização em cadeia, incluindo, pelo menos, um produto com cerca de 155 pb, podem conter RA de ISAV, facto que deverá ser objecto de pesquisa posterior por recurso a sondas de DNA ou à sequenciação de nucleótidos.

#### IV.1.4. Confirmação do isolamento de ISAV em culturas de tecidos por polimerização em cadeia

Caso se tenha observado efeito citopático total nas células SHK-1 durante o exame pirológico das amostras de tecidos, remover 400 µl de sobrenadante do alvéolo e colocar num tubo estéril de 1,5 ml. Extrair o RA desta amostra do modo descrito em III.1 e efectuar R-PAR. Caso as culturas não revelem efeito citopático total, remover o sobrenadante e raspar as células da superfície do alvéolo ou recipiente e colocá-las num tubo estéril de 1,5 ml, para extracção do RA e realização de R-PAR.

#### IV.1.5. Confirmação dos produtos de polimerização em cadeia por sonda de DNA

- a) A especificidade de um produto de polimerização em cadeia com 155 pb pode ser determinada por sondagem com um oligonucleótido que hibrida numa região do produto de polimerização em cadeia situada entre os iniciadores. Os produtos de polimerização em cadeia das amostras em análise, bem como da testemunha positiva, são sujeitos a electroforese em gel de agarose a 1 %, na presença de marcadores de peso molecular e das testemunhas negativas das fases de transcrição reversa e polimerização em cadeia;

- b) Deixar o DNA ser absorvido por uma membrana e incubar o oligonucleótido (5'-CGGGAGTT-GATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') marcado com a membrana, após as etapas de pré-hibridação adequadas.
- c) Remover da membrana, por lavagem, a sonda não ligada ou ligada inespecificamente e proceder à visualização da sonda ligada;
- d) A ligação da sonda com um fragmento de 155 pb (e 310 pb, se presente) indica a especificidade da polimerização em cadeia e, conseqüentemente, a presença de RA de ISAV na amostra.

#### IV.1.6. Sequenciação de nucleótidos de produtos de polimerização em cadeia

A especificidade do produto de polimerização em cadeia pode ser determinada por exame da sequência nucleotídica do produto de polimerização em cadeia com 155 pb.

- a) Purificar o produto de polimerização em cadeia presente no gel ou na solução de agarose;
- b) Sequenciar o fragmento com o auxílio dos mesmos iniciadores utilizados na polimerização em cadeia ou dos iniciadores do vector, em caso de clonagem num vector antes da sequenciação;
- c) Comparar a sequência nucleotídica com as sequências do segmento 8 do ISAV registadas na base de dados de sequências nucleotídicas do LEBM (códigos de registo Y10404, AJ012285, AJ242016);
- d) A presença da sequência correspondente ao segmento 8 do ISAV constitui uma prova da presença de RA de ISAV na amostra.

### V. Exame de impressões renais por IFAT

V.1. *Foi estabelecido o seguinte protocolo para o exame de impressões renais por IFAT*

V.2. *Preparação e coloração das impressões*

V.2.1. Fixar as lâminas em acetona ou mistura metanol/acetona (1:1) durante 3 minutos e secar ao ar. Antes da coloração, as lâminas devem ser examinadas e as regiões adequadas circunscritas com um marcador ImmEdge™ ou semelhante, deixando secar ao ar. Colocar as lâminas numa solução de bloqueio (6 % de leite desnatado em PBS com 0,2 % de Tween 20) e incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente, agitando suavemente. Escorrer as lâminas e colocá-las horizontalmente numa caixa adequada com papel absorvente humidificado, de forma a manter a humidade ambiente.

V.2.2. Cobrir cada impressão com uma solução de anticorpo monoclonal 3H6F8 anti-ISAV (ou outro anticorpo de especificidade e eficácia comprovadas), fechar a caixa e incubar, com agitação, durante 60 minutos, à temperatura ambiente. O anticorpo deve, em geral, ser diluído de 1:10 a 1:100 com leite desnatado a 1 %; deverá, contudo, determinar-se a diluição ideal para cada lote. Lavar as lâminas três vezes, durante dois minutos, com PBS contendo 0,1 % de Tween 20. Cobrir cada impressão com uma solução contendo conjugado FITC anti-ratinho de cabra diluído a 1:1 000 em leite desnatado a 1 % e incubar numa atmosfera húmida durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Lavar as lâminas três vezes, durante dois minutos, com PBS contendo 0,1 % de Tween 20. Cobrir cada lâmina com solução de CITIFLUOR™ (mistura de 500 µl de CITIFLUOR™ com 1,5 ml de solução a 0,1 % (v/v) de Tween 20 em PBS) ou outro meio de montagem adequado, durante 10 minutos. Lavar as lâminas três vezes com PBS contendo 0,1 % de Tween 20. Caso deva proceder-se a uma contra-coloração, cobrir cada impressão com solução de iodeto de propídio (0,01 mg/ml) em PBS contendo 0,1 % de Tween 20 e incubar durante 3 minutos à temperatura ambiente. Lavar as lâminas três vezes, durante dois minutos, com PBS contendo 0,1 % de Tween 20. Escorrer as lâminas e montar em CITIFLUOR™ ou outro meio de montagem adequado. Armazenar as lâminas ao abrigo da luz, a 4 °C, na pendência do exame microscópico.

V.3. *Exame por microscopia de fluorescência*

Examinar todas as lâminas num microscópio equipado para iluminação por epifluorescência, utilizando um filtro adequado para a excitação da FITC, de forma a que esta emita a luz verde fluorescente característica. Devem examinar-se com uma ampliação de 10 e 20 vezes todos os campos nas regiões definidas pelo marcador ImmEdge™; as áreas suspeitas (áreas com fluorescência verde) deverão ser examinadas com uma ampliação de 40 vezes e iluminação de fase/fluorescência, de forma a assegurar que a coloração fluorescente se encontra associada às células. Registrar as coordenadas da região suspeita, para confirmação posterior da natureza da fluorescência por outro observador. Após o exame pelo primeiro observador, as lâminas que se revelem positivas ou suspeitas devem ser reexaminadas por outro operador, para confirmação dos resultados.

**V.4. Testemunhas**

V.4.1. Devem incluir-se três tipos de testemunhas em cada lote de lâminas coradas para IFAT:

- impressão renal de salmão do Atlântico não infectado (testemunha negativa),
- cultura celular SHK-1 não infectada ou outra cultura celular sensível (testemunha negativa),
- cultura celular SHK-1 infectada com ISAV ou outra cultura celular sensível (testemunha positiva).

V.4.2. Recomenda-se a utilização como testemunha positiva complementar de uma impressão renal de salmão do Atlântico infectado com ISAV, se disponível.

V.4.3. Caso alguma das testemunhas negativas produza um resultado positivo, deve considerar-se o teste inválido para todas as lâminas do lote em causa. Se todas as lâminas do lote, incluindo as testemunhas positivas, produzirem resultados negativos, considera-se o teste inválido para todas as lâminas do lote. Sempre que os resultados obtidos com as testemunhas determinem a invalidação de um lote de lâminas, deverão destruir-se estas últimas e efectuar um novo teste com os duplicados das impressões.

**V.5. Exame de outros tecidos**

É possível aplicar a técnica descrita a outros tecidos do peixe, tais como tecidos do fígado, baço e coração, na condição de ser possível depositar nas lâminas uma quantidade razoável de células endoteliais, leucócitos ou linfócitos. O procedimento de coloração é idêntico para cada tecido, embora, em alguns casos, seja preferível omitir a coloração com iodeto de propídio, baseando a identificação dos tipos de células presentes na impressão na iluminação de fase.

**VI. Histologia**

Efectuar cortes de 5 µm de secções montadas em parafina e corar com hematoxilina e eosina. As alterações histológicas associadas à ISA são descritas na última edição do Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases do GIE.

**VII. Acrónimos e abreviaturas**

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CPE	Efeito citopático
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
dNTP	Trifosfato de desoxinucleótido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IF	Imunofluorescência
IFAT	Prova indirecta de fluorescência do anticorpo
OIE	Gabinete Internacional das Epizootias
IPN(V)	Necrose pancreática infecciosa (vírus)
ISA(V)	Anemia infecciosa do salmão (vírus)
PBS	Solução-tampão de fosfato isotónica
RA	Ácido ribonucleico
R-(PAR)	Transcriptase reversa (polimerização em cadeia)
SHK-1	Linhagem celular SHK-1 (Salmon head kidney)
TCID <sub>50</sub>	Dose infecciosa das culturas de tecidos a 50 % do ponto final