

II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 5. februar 1996

om ændring af beslutning 92/532/EØF om fastlæggelse af prøveudtagningsmetoder og diagnosticeringsmetoder til påvisning og bekræftelse af bestemte fiske-sygdomme

(Tekst af betydning for EØS)

(96/240/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⁽¹⁾, senest ændret
ved direktiv 95/22/EF⁽²⁾, særlig artikel 15, og

ud fra følgende betragtninger:

Prøveudtagningsplanerne og diagnosticeringsmetoderne
til påvisning og bekræftelse af bestemte fiskesygdomme er
fastlagt i Kommissionens beslutning 92/532/EØF⁽³⁾;

siden ovennævnte beslutning blev vedtaget, har der fundet
ny praktisk og videnskabelig udvikling sted, som kræver,
at prøveudtagningsplaner og diagnosticeringsmetoder
bliver ændret;

ajourføringen vedrører prøvestørrelse, hvilke prøver der
skal tages, transport af prøverne samt metoden til
isolering af virus, der måtte være til stede i prøven;

Den Videnskabelige Veterinærkomité, oprettet ved
Kommissionens beslutning 81/651/EØF⁽⁴⁾, er blevet hørt;

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

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Bilaget til beslutning 92/53/EØF erstattes af bilaget til
denne beslutning.

Artikel 2

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 5. februar 1996.

På Kommissionens vegne

Franz FISCHLER

Medlem af Kommissionen

⁽¹⁾ EFT nr. L 46 af 19. 2. 1991, s. 1.

⁽²⁾ EFT nr. L 243 af 11. 10. 1995, s. 1.

⁽³⁾ EFT nr. L 337 af 21. 11. 1992, s. 18.

⁽⁴⁾ EFT nr. L 233 af 19. 8. 1981, s. 32.

BILAG

DEL I

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

I. Analyseprøver

1. *Prøvetagningstidspunkt*

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

2. *Udvælgelse og indsamling af prøver*

Der indsamles 30 til 150 fisk og/eller ovarievæskeprøver til undersøgelse i forbindelse med kontrolbesøg, jf. tabel 1. Hvis der er regnbueørred til stede, skal fisk af den art udgøre hele prøven. Hvis der ikke er regnbueørred til stede, skal prøven indeholde fisk af alle andre tilstedeværende arter, som er modtagelige for VHS og/eller IHN som anført i bilag A til Rådets direktiv 91/67/EØF om dyresundhedsmæssige betingelser for afsætning af akvakulturdyr og -produkter. Arterne skal være ligeligt repræsenteret i prøven. I de første to år af den indledende fireårs kontrolperiode, der går forud for opnåelsen af status som godkendt, er prøvestørrelsen 150 for at sikre, at virusbærere med en forekomst på 2 % påvises med en konfidens på 95 %, undtagen for laksefarme uden gyldebestand i kystzoner, hvor prøvestørrelsen er 30. I de sidste to år af kontrolperioden kan prøvestørrelsen nedsættes til 30 for at sikre påvisning med en konfidens på 95 % ved en forekomst på 10 %. I de følgende år (opretholdelse af status som godkendt) kan prøvestørrelsen ligeledes nedsættes til 30.

På brug med dokumentation for mindst fire års frihed for VHS og IHN (baseret på et regulært officielt sundhedskontrolprogram) kan den lille prøvestørrelse også anvendes i hele den indledende fireårige kontrolperiode.

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

3. *Forberedelse og forsendelse af fiskeprøver*

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

Ovarievæske eller stykker af organerne fra ti fisk (Tabel 1) kan indsamles i et 10 ml plastrør indeholdende 4 ml transportvæske og udgøre en samleprøve. Vævet i hver prøve bør veje mindst 0,5 g.

Rørene anbringes i isolerede beholdere (f.eks. tykvæggede polystyrenæsker) sammen med tilstrækkeligt med is eller »fryseblokke« til at sikre, at prøverne holdes nedkølet på mellem 0 og 5 °C under transport til laboratoriet. Frysing skal undgås. En prøves temperatur under forsendelsen bør aldrig overstige 10 °C, og der bør stadig findes is i transportkassen ved dens ankomst.

Den virologiske undersøgelse skal påbegyndes snarest muligt og inden 48 timer efter indsamlingen af prøverne eller i undtagelsestilfælde inden 72 timer efter indsamlingen af det materiale, der skal undersøges, når det er beskyttet af transportvæske, og temperaturkravene under transport kan opfyldes (1.1.3, stk. 3).

Der kan sendes hele fisk til laboratoriet, hvis temperaturkravene under transport kan opfyldes. Hele fisk kan indpakkes i vandsugende papir og derefter forsendes i en plastpose, der er kølet som nævnt ovenfor. Der kan også forsendes levende fisk.

4. *Indsamling af supplerende materiale til diagnosticering*

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

II. Forberedelse af prøver til virologisk undersøgelse

1. *Homogenisering af organer*

På laboratoriet skal vævet i rørene homogeniseres fuldstændigt (med stomacher, blender eller morter og støder) og derefter opslættes i den oprindelige transportvæske. Hvis prøven består af hele fisk, dvs. fisk på under 6 cm, klippes de i stykker med steril saks efter fjernelse af kroppen bag gatåbningen, homogeniseres som beskrevet ovenfor og opslættes i transportvæske. Det endelige forhold mellem vævsmateriale og transportvæske skal justeres til 1:10.

2. *Centrifugering af homogenatet*

Homogenatet centrifugeres i en kølecentrifuge ved 2-5 °C og 2 000-4 000 × g i 15 minutter, hvorefter supernatanten opsamles og behandles i 4 timer ved 15 °C eller natten over ved 4 °C med antibiotika, f.eks. kan gentamicin 1 mg/ml være nyttig på dette trin.

Hvis prøven er forsendt i transportvæske (dvs. tilsat antibiotika), kan behandling af supernatanten med antibiotika udelades.

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

Hvis den opsamlede supernatant opbevares ved -80 °C inden for 48 timer efter prøvetagningen, kan den optøs og genanvendes til virologisk undersøgelse, dog højst én gang.

Hvis der opstår praktiske vanskeligheder (f.eks. at varmeskabet svigter, eller der er problemer med cellekulturer), som gør det umuligt at pøde celler inden for 48 timer efter indsamlingen af vævsprøverne, kan supernatanten fryses ved -80 °C, og den virologiske undersøgelse foretages inden for 14 dage.

Inden supernatanten podes på cellerne, blandes den med en tilsvarende mængde passende fortyndet pool af antiserum mod de hjemlige serotyper af IPN-virus og inkuberes hermed i mindst 1 time ved 15 °C eller i højst 18 timer ved 4 °C. Antiserumtiteren skal være mindst 1/2 000 i en 50 % pladeneutraliseringsprøve.

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

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

III. Virologisk undersøgelse

1. *Cellekulturer og -væsker*

BF-2 eller RTG-2 og enten EPC- eller FHM-celler dyrkes ved 20-30 °C i en passende væske, f.eks. Eagle's MEM (eller modifikationer heraf), tilsat 10 % føtalt bovint serum og antibiotika i standardkoncentrationer.

Når cellerne dyrkes i lukkede glas, anbefales det at benytte bicarbonat som buffer til væsken. Til den væske, der anvendes til dyrkning af celler i åbne enheder, kan Tris-HCl (23 mM) og Na-bicarbonat (6 mM) benyttes som buffer.

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

2. *Podning af cellekulturer*

En antibiotikabehandlet organopslætning podes på cellekulturer i to fortyndinger, dvs. primærtfortyndingen og derudover en tifoldsfertynding heraf, så der fremkommer slutopløsninger af vævsmateriale i cellekulturvæske på henholdsvis 1:100 og 1:1 000 (for at hindre homolog interferens). Mindst to cellelinjer skal podes (jf. III.1). Forholdet mellem podestoffets og cellekulturmediets rumfang bør være ca. 1:10.

For hver fortynding og hver cellelinje anvendes et celleområde på mindst ca. 2 cm² svarende til et hul på en cellekulturplade med 24 huller. Det anbefales at benytte cellekulturplader, men andre enheder med tilsvarende eller større vækstareal kan også accepteres.

3. Inkubation af cellekulturer

Podede cellekulturer inkuberes ved 15 °C i 7-10 døgn. Hvis cellekulturvæsken ændrer farve fra rød til gul, som er tegn på forurening af væsken, skal pH-værdien justeres med steril bicarbonatopløsning eller tilsvarende stoffer for at sikre, at cellematerialet lader sig inficere med virus.

Der gennemføres hver sjette måned titrering af frosne lagre af VHS- og IHN-virus for at sikre, at cellekulturerne lader sig identificere.

4. Mikroskopi

Podede cellekulturer undersøges dagligt for forekomst af CPE ved ca. 40 ganges forstørrelse. Hvis der konstateres tydelig CPE, skal der omgående iværksættes virusidentificeringsmetoder som beskrevet i afsnit IV.

5. Dyrkning af subkulturer

Er der ingen udvikling af CPE efter primærinkuberingen i 7-10 døgn, gennemføres der dyrkning af subkulturer med friske cellekulturer på et celleareal af samme størrelse som primærkulturens.

Mængder af væsken (supernatanten) fra alle kulturer/huller, som udgør primærkulturen, samles pr. cellelinje 7-10 døgn efter podningen og podes på homologe cellekulturer, der er uforyndet eller i tifoldsforyndinger (som giver slutforyndinger af supernatanten på henholdsvis 1:10 og 1:100) som beskrevet i I.III.2. Inden podningen kan der foretages en inkubation af fortyndingerne med antiserum mod IPN-virus i passende fortynding som beskrevet i I.II.2.

De podede kulturer inkuberes derefter i 7-10 døgn ved 15 °C og observeres som beskrevet i III.4.

Hvis den forekommer toksisk CPE i løbet af de første 3 inkubationsdøgn, kan der dyrkes subkulturer på det stadium, men cellerne skal i så fald inkuberes i 7 døgn og dyrkes i subkultur igen med yderligere 7 døgn inkubation. Hvis den udvikler sig toksisk CPE efter 3 døgn forløb, kan cellerne passeres en gang og inkuberes, således at man kommer op på de i alt 14 døgn fra primærpodningen. Der bør ikke være noget tegn på toksicitet i de sidste 7 inkubationsdøgn.

IV. Virusidentificering

1. Virusidentificeringsprøver

Hvis der er konstateret tegn på CPE i en cellekultur, indsamles væsken (supernatanten) og undersøges efter en eller flere af følgende metoder: neutralisation, immunfluorescens (IF) eller ELISA.

Hvis prøverne ikke har gjort det muligt at identificere virus med sikkerhed i løbet af en uge, skal virus overføres til et nationalt referencelaboratorium for fiskesygdomme eller til EF-referencelaboratoriet for fiskesygdomme til øjeblikkelig identificering.

Immunreagenser, der benyttes til virusidentificering, skal være af referencekvalitet og godkendt af det nationale laboratorium for fiskesygdomme med hensyn til titer og specificitet.

2. Neutralisation

Cellerne fjernes fra den opsamlede væske ved centrifugering (2 000-4 000 × g) eller membranfiltrering (0,45 µg), og væsken fortyndes 1:100 og 1:10 000 i cellekulturvæske.

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

— gruppespecifikt antistof mod VHS-virus (egtvædsygevirus)	1: 50 (1)
— gruppespecifikt antistof mod IHN-virus (infektios hæmatopietisk nekrosevirus)	1: 50 (1)
— specifik pool af antiserum mod de hjemlige serotyper af IPN-virus (infektios pankreasnekrosevirus) (referencestammer Sp, Ab eller VR 299)	1: 50 (1)
— væske	1: 1

Der skal fra hver virus-serum-blanding podes mindst to cellekulturer med 50 µl hver, som derefter inkuberes ved 15 °C. CPE-udviklingen kontrolleres som beskrevet i III.4.

Andre neutralisationsprøver, hvis effektivitet er godtgjort, kan anvendes.

(1) Eller som angivet af referencelaboratoriet med hensyn til antiseraenes eventuelle cytotoxicitet.

3. *Immunofluorescens (IF)*

Til identificering af hvert enkelt virusisolat udstryges der EPPC-celler på mindst 8 dækglasser eller lignende med en tæthed, der giver ca. 60-90 % sammenflydning efter 24 timers dyrkning. Der vælges EPC-celler hertil, fordi de klæber stærkt til glasoverflader.

Når cellerne har sat sig på glasoverfladen (ca. 1 time efter udstrygningen), eller når kulturerne er inkuberet i indtil 24 timer, podes det virus, der skal identificeres. 4 kulturer podes i forholdet 1:10 og 4 kulturer i forholdet 1:100.

Mellem 20 og 30 timer efter podningen skylles kulturerne to gange i Eagle's MEM uden serum, fikseres i acetone og farves ved brug af et tolags-IFAT. Det første reagenslag består af poly- eller monoklonale antistoffer af referencekvalitet. Det andet reagenslag er et FITC-konjugeret antiserum mod immunglobulinet i det første lag. For hver af de testede antisera skal der farves mindst en højdosis- og en lavdosispodet kultur. Prøven skal omfatte en passende negativ og positiv kontrol.

De farvede kulturer præpareres med glycerolsaltopløsning. De undersøges under indfaldende UV-lys. Der anvendes okularer, som forstørrer 10 eller 12 gange og objektiver på 25 eller 40 gange med en blænde på henholdsvis <math><0,7</math> og 1,3.

Nogle stammer af egtsvedsygevirus reagerer kraftigt med antiserum mod referencestamme F1 ved IFAT, selvom de ikke reagerer i neutralisationsprøver.

Ovenstående IF-metode er anført som eksempel. Andre IF-metoder (mht. cellekulturer, fiksering og antistoffer af referencekvalitet), hvis effektivitet er godkendt, kan anvendes.

4. *ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)*

Hullerne i mikrotiterplader (f.eks. Nunc-immunplader, Maxisorp, Nunc, Denmark) dækkes natten over med anbefalede fortyndinger af protein-A-rensede immunglobulinfraktioner af antistoffer af referencekvalitet.

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

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

Tabel 1 A

Opnåelse af status

	Antal kliniske undersøgelser om året — år 1 og 2	Fisk i vækst: Undersøgelse af organer — antal fisk — år 1 og 2	... Gydebestande: Undersøgelse af ovarievæske — antal fisk — år 1 og 2
<i>Kontinentalzoner</i>			
a) Brug med gydebestand	2	120 (1. undersøgelse) (*) 150 (2. undersøgelse)	30 (1. undersøgelse) 0
b) Brug med udelukkende gydebestand	2	0	150 (1. eller 2. undersøgelse)
c) Brug uden gydebestand	2	150 (1. og 2. undersøgelse)	0
<i>Kystzoner</i>			
a) Laksebrug uden gydebestand	2	30 (1. og 2. undersøgelse)	0
b) Ikke-laksebrug uden gydebestand	2	150 (1. og 2. undersøgelse)	0
c) Brug med gydebestand	2	120 (1. undersøgelse) 150 (2. undersøgelse)	30 (1. undersøgelse) 0
	Antal kliniske undersøgelser om året — år 3 og 4	Undersøgelse af organer — antal fisk — år 3 og 4	Undersøgelse af ovarievæske — antal fisk — år 3 og 4
<i>Kontinentalzoner</i>			
a) Brug med gydebestand	2	20 (1. eller 2. undersøgelse)	10 (1. eller 2. undersøgelse)
b) Brug med udelukkende gydebestand	2	0	30 (1. eller 2. undersøgelse)
c) Brug uden gydebestand	2	30 (1. eller 2. undersøgelse)	0
<i>Kystzoner</i>			
a) Brug uden gydebestand	2	30 (1. eller 2. undersøgelse)	0
b) Brug med gydebestand	2	20 (1. eller 2. undersøgelse)	10 (1. eller 2. undersøgelse)

Maksimalt antal fisk pr. samleprøve: 10.

(*) Kliniske undersøgelser.

Tabel 1 B

Bevarelse af status

	Antal kliniske undersøgelser om året	Fisk i vækst: Undersøgelse af organer — antal fisk (1)	Gydebestande: Undersøgelse af ovarievæske — antal fisk (1)
<i>Kontinentalzoner:</i>			
a) Brug med gydebestand	2	20 (1. eller 2. undersøgelse)	10 (1. eller 2. undersøgelse) (2)
b) Brug med udelukkende gydebestand	2	0	30 (1. eller 2. undersøgelse) (2)
c) Brug uden gydebestand	2	30 (1. eller 2. undersøgelse)	0
<i>Kystzoner</i>			
a) Brug uden gydebestand	1	30 (3)	0
b) Brug med gydebestand	2	20 (1. eller 2. undersøgelse)	10 (1. eller 2. undersøgelse) (2)

Maksimalt antal fisk pr. samleprøve: 10.

(1) Der skal kun indsamles prøver fra 50 % af fiskebrugene i zonen efter tur hvert år.

(2) Hvis det er umuligt at få ovarievæske, kan organer i undtagelsestilfælde prøves i stedet.

(3) Prøverne skal indsamles tidligst 3 uger efter overførsel af fisk fra ferskvand til saltvand.

DEL II

DIAGNOSTICERINGSMETODER TIL BEKRÆFTELSE AF IHN OG VHS VED MISTANKE OM UDBRUD

IHN og VHS kan diagnosticeres efter en af følgende metoder:

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

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

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

II.A. Konventionel virusisolering med efterfølgende serologisk virusidentificering**II.A.I.1. Udvalgelse af prøver**

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

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

Som I.I.3.

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

Som I.I.4.

II.A.II. Forberedelse af prøver til virologisk undersøgelse

Som I.II.

II.A.III. Virologisk undersøgelse

Som I.III, undtagen at der kan benyttes enten BF-2 eller RTG-2 og enten EPC- eller FHM-celler til podning med vævs materiale.

II.A.IV. Virusidentificering

Som I.IV.

II.B. Virusisolering med samtidig serologisk virusidentificering**II.B.I.1. Udvalgelse af prøver**

Som II.A.I.1.

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

Som I.I.3.

II.B.I.3. Indsamling af supplerende diagnostisk materiale

Som I.I.4.

II.B.II.1. Homogenisering af organer

Som I.II.1.

II.B.II.2. Centrifugering af homogenatet

Som I.II.2.

II.B.II.3. Behandling af supernatanten med diagnostiske antisera

Organopslæmningen, der er behandlet med antibiotika og anti-IPN, fortyndes 1:10 og 1:10 000 i cellekulturvæske, og mængder blandes og inkuberes i 60 minutter ved 15 °C med lige dele af de i I.IV.2 nævnte reagenser.

II.B.III.1. *Cellekulturer og -væsker*

BF-2 eller RTG-2 og enten EPC eller FHM-celler dyrkes ved 20-30 °C i en passende væske, f.eks. Eagle's MEM (eller modifikationer heraf), tilsat 10 % føtalt bovint serum og antibiotika i standardkoncentrationer.

Når cellerne dyrkes i lukkede glas, anbefales det at benytte bicarbonat som buffer til væsken. Til den væske, der anvendes til dyrkning af celler i åbne enheder, kan Tris-HCl (23 mM) og Na-bicarbonat (6 mM) benyttes som buffer. pH-værdien skal ligge så tæt som muligt på 7,6.

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

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

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

II.B.III.3. *Inkubering af cellekulturer*

Som I.III.3.

II.B.III.4. *Mikroskopi*

Podede cellekulturer undersøges dagligt for forekomst af CPE ved ca. 40 ganges forstørrelse. Hvis et af de benyttede antisera forhindrer udvikling af CPE, anses virus for identificeret.

Hvis ingen af antiseraene forhindrer udvikling af CPE, skal en af identificeringsmetoderne i I.IV benyttes.

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

Hvis der ikke er nogen udvikling af CPE efter 7 døgn, skal der dyrkes subkulturer ud fra kulturer podet med supernatanten plus væske (II.B.II.3) efter I.III.5.

II.C. Andre diagnosticeringsmetoder

Supernatant som beskrevet i II.A.II.2 kan analyseres ved IFAT eller ELISA efter henholdsvis II.A.IV.3 eller II.A.IV.4. Disse hurtigmetoder skal suppleres med en virologisk undersøgelse efter enten A eller B inden for 48 timer efter prøveudtagningen, hvis

- a) reaktionen er negativ, eller
- b) reaktionen er positiv med materiale fra første tilfælde af IHN eller VHS i godkendte zoner.

Vævsmateriale kan analyseres efter andre diagnosticeringsmetoder såsom IF på frosne sektioner eller immunhistokemi på formalinfikseret vævsmateriale. Disse metoder skal altid ledsages af podning af ufikseret vævsmateriale på cellekulturer.

FORKORTELSER

BF-2	bluegill-fibroblast (cellelinje)
CPE	cytopatisk effekt
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (cellelinje)
FHM	fathead minnow (cellelinje)
FITC	fluoresceinisothiocyanat
HRP	peberrodsperoxidase
IF	immunfluorescens
IFAT	indirekte fluorescent antistoftest
IHN(V)	infektøs hæmatopoietisk nekrose (virus)
IPN(V)	infektøs pankreasnekrose (virus)
MEM	mindste essentielle væske
OPD	ortophenyldiamin
PBS	fosfatbufferet saltopløsning
RTG-2	regnbueørredgonade (cellelinje)
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan — HCl
VHS(V)	egtvedsyge (virus)
