

32003D0466

25.6.2003.

SLUŽBENI LIST EUROPSKE UNIJE

L 156/61

ODLUKA KOMISIJE**od 13. lipnja 2003.****o utvrđivanju kriterija za zoniranje i službeno nadziranje u slučaju pojave sumnje ili potvrđene prisutnosti zarazne anemije lososa (ZAL)***(priopćena pod brojem dokumenta C(2003) 1831)***(Tekst značajan za EGP)****(2003/466/EZ)**

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 91/67/EEZ od 28. siječnja 1991. o uvjetima zdravlja životinja kojima se uređuje stavljanje na tržište životinja akvakulture i njihovih proizvoda ⁽¹⁾, kako je zadnje izmijenjena Uredbom (EZ) br. 806/2003 ⁽²⁾, a posebno njezin članak 15.,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 93/53/EZ od 24. lipnja 1993. o uvođenju minimalnih mjera Zajednice za kontrolu određenih bolesti riba ⁽³⁾, kako je zadnje izmijenjena Odlukom Komisije 2001/288/EZ ⁽⁴⁾, a posebno njezin članak 5. stavak 2. i članak 6.,

budući da:

- (1) Direktivom 93/53/EEZ određuje se da se uzorkovanje i laboratorijsko testiranje na prisutnost bolesti iz popisa I. i popisa II. (koji su navedeni u Prilogu A Direktivi 91/67/EEZ) treba provoditi korištenjem metoda utvrđenih u skladu s člankom 15. Direktive 91/67/EEZ.
- (2) Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrdu bolesti riba iz popisa II., virusne hemoragijske septikemije (VHS) i zarazne hematopoetske nekroze (ZHN), utvrđeni su Odlukom Komisije 2001/183/EZ ⁽⁵⁾.
- (3) U skladu s člankom 5. stavkom 2. i člankom 6. Direktive 93/53/EEZ, sva uzgajališta, smještena u području istog

vodenog sliva ili istog obalnog područja na kojem se nalazi uzgajalište za koje se sumnja ili za koje je potvrđeno da je zaraženo virusom zarazne anemije lososa (ZAL), stavlja se pod službeni nadzor. Treba utvrditi kriterije za zoniranje i za službeno nadziranje.

- (4) Radi utvrđivanja planova uzorkovanja i dijagnostičkih metoda za otkrivanje i potvrđivanje ZAL-a te radi utvrđivanja kriterija za zoniranje i za službeno nadziranje zbog sumnje ili potvrde zarazne anemije lososa (ZAL), obavljeno je savjetovanje sa stručnjacima za zdravlje riba i laboratorijskim stručnjacima. Nadalje, smjernice za dijagnosticiranje ZAL-a utvrđene u postojećem izdanju Dijagnostičkog priručnika za bolesti akvatičnih životinja Svjetske organizacije za zdravlje životinja (OIE) moraju se uzeti u obzir.
- (5) Za provedbu ovih novih zahtjeva treba osigurati dovoljno vremena.

- (6) Mjere predviđene ovom Odlukom su u skladu s mišljenjem Stalnog odbora za prehrambeni lanac i zdravlje životinja,

DONIJELA JE OVU ODLUKU:

Članak 1.

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrdu zarazne anemije lososa (ZAL) te kriteriji za zoniranje i za službeno nadziranje zbog sumnje ili potvrde ZAL-a utvrđeni su u Prilogu ovoj Odluci.

Članak 2.

Ova se Odluka primjenjuje od 23. listopada 2003.

⁽¹⁾ SL L 46, 19.2.1991., str. 1.⁽²⁾ SL L 122, 16.5.2003., str. 1.⁽³⁾ SL L 175, 19.7.1993., str. 23.⁽⁴⁾ SL L 99, 10.4.2001., str. 11.⁽⁵⁾ SL L 67, 9.3.2001., str. 65.

Članak 3.

Ova je Odluka upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 13. lipnja 2003.

Za Komisiju
David BYRNE
Član Komisije

PRILOG

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrdu zarazne anemije lososa (ZAL) i kriteriji za zoniranje i za službeno nadziranje zbog sumnje ili potvrde ZAL-a

UVOD I DEFINICIJE

Ovaj Prilog:

- (a) propisuje smjernice i minimalne zahtjeve za planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrdu prisutnosti ZAL-a;
- (b) objedinjuje odredbe i definicije utvrđene u Direktivama 91/67/EEZ i 93/53/EEZ;
- (c) utvrđuje odredbe za provedbu pravilne dijagnostike, kontrole i nadziranja ZAL-a u slučaju sumnje ili potvrde ZAL-a;
- (d) namijenjen je i nadležnim tijelima odgovornim za kontrolu ZAL-a i laboratorijskom osoblju koje provodi testove u vezi s ovom bolešću. Naglasak je stavljen na postupke uzorkovanja, načela i primjene laboratorijskih testova i procjenu njihovih rezultata kao i na detaljne laboratorijske tehnike. Međutim, kada je potrebno, laboratoriji mogu primijeniti modifikacije testova opisane u ovom Prilogu, ili koristiti drukčije testove pod uvjetom da se može dokazati jednaka ili veća osjetljivost i specifičnost. Nadalje, propisani su kriteriji za zoniranje i službeno nadziranje zbog sumnje ili potvrde ZAL-a.

Za potrebe ovog Priloga, primjenjuju se sljedeće dodatne definicije:

„Područje vodenog sliva” znači cjelokupno područje sliva od izvora vodenog toka do njegovog ušća ili dio područja sliva od izvora vodenog toka do prirodne ili umjetne zapreke koja sprečava migracije riba preko te zapreke.

„Obalno područje” znači dio obale ili mora ili ušća s preciznim zemljopisnim granicama koje se sastoji od homogenog hidrodinamičkog sustava ili od niza takvih sustava.

Dio I. propisuje opća načela i kriterije za dijagnozu i potvrdu ZAL-a te kriterije za zoniranje i službeno nadziranje koji se provode zbog sumnje ili potvrde ZAL-a.

Dio II. navodi inspekcije i uzorkovanje koji se provode u svrhu otkrivanja prisutnosti ZAL-a.

Dio III. propisuje metode koje se koriste u svrhu virološkog pretraživanja.

Dio IV. propisuje postupak za pretraživanje uzoraka korištenjem RT-PCR-a u svrhu utvrđivanja ZAL-a.

Dio V. opisuje protokol koji se koristi za pretraživanje bubrežnih otisaka korištenjem IFAT-a (test indirektno imunofluorescencije) u odnosu na ZAL.

Dio VI. uključuje metodologiju za histologiju.

Dio VII. navodi popis korištenih akronima i kratica.

I. Kriteriji za dijagnozu ZAL-a te za zoniranje, određene kontrolne mjere i službene nadziranje**I.1. Opća načela dijagnoze ZAL-a**

Osnovani razlozi za sumnju da je riba inficirana virusom ZAL-a navedeni su u dijelu I.2. ovog Priloga. Države članice osiguravaju da se u slučaju kad na uzgajalištu postoji sumnja na infekciju virusom ZAL-a što je prije moguće provede službeno istraživanje kako bi se prisutnost bolesti potvrdila ili isključila, i to provedbom inspekcija i kliničkih pregleda, kao i prikupljanjem i odabirom uzoraka te korištenjem metoda laboratorijskog pretraživanja, kako je navedeno u dijelovima II. – VI. ovog Priloga. Kako bi se službeno potvrdila prisutnost ZAL-a mora biti ispunjen bilo koji od tri seta kriterija navedenih u dijelu I.3 ovog Priloga.

I.2. Sumnja na infekciju ZAL

I.2.1. Na prisutnost ZAL-a treba posumnjati kada je ispunjen najmanje jedan od sljedećih kriterija:

- (a) prisutnost postmortalnih promjena karakterističnih za ZAL, s ili bez kliničkih znakova bolesti. Postmortalne promjene i klinički znakovi bolesti moraju biti u skladu s onima navedenim u važećem izdanju Dijagnostičkog priručnika za bolesti akvatičnih životinja OIE-a;
- (b) izolacija i identifikacija virusa ZAL-a u kulturi stanica iz jednog uzorka bilo koje ribe s uzgajališta, kako je opisano u dijelu III.;

- (c) osnovani dokaz prisutnosti virusa ZAL-a u dva neovisna laboratorijska testa, kao što su RT-PCR (dio IV.) i IFAT (dio V.);
- (d) premještanje živih riba na uzgajalište kada postoji osnovani razlog za sumnju da je ZAL bio prisutan u vrijeme premještanja riba;
- (e) kada su istraživanjem utvrđene druge važne epidemiološke poveznice s na ZAL sumnjivim ili potvrđenim uzgajalištima.

I.2.2. Sumnja na ZAL se može isključiti ako se kontinuiranim istraživanjem, koje uključuje najmanje jednu kliničku inspekciju mjesečno u razdoblju od šest mjeseci, ne otkriju daljnji značajni dokazi prisutnosti virusa ZAL.

1.3. Potvrda ZAL-a

Smatra se da je prisutnost ZAL-a potvrđena ako su ispunjeni kriteriji iz točke (a) ili točke (b) ili točke (c):

- (a) uočavanje kliničkih znakova i postmortalnih promjena karakterističnih za ZAL, sukladno važećoj verziji *Dijagnostičkog priručnika za bolesti akvatičnih životinja* OIE-a, uključujući uginuća, slabost ili abnormalno ponašanje riba, znakove anemije, druge postmortalne nalaze i patološke promjene, a virus ZAL-a je otkriven jednom ili više sljedećih metoda:
 - i. izolacija i identifikacija virusa ZAL-a na kulturi stanica iz najmanje jednog uzorka bilo koje ribe s uzgajališta, kako je opisano u dijelu III.;
 - ii. otkrivanje virusa ZAL-a pomoću RT-PCR-a, metodama opisanim u dijelu IV.;
 - iii. otkrivanje virusa ZAL-a u tkivima ili preparatima tkiva korištenjem specifičnih protutijela za virus ZAL-a (npr. IFAT na bubrežnim otiscima kako je opisano u dijelu V.);
- (b) izolacija i identifikacija virusa ZAL-a u dva uzorka od jedne ili više riba s uzgajališta testiranih u različito vrijeme korištenjem metode opisane u dijelu III.;
- (c) izolacija i identifikacija virusa ZAL-a iz najmanje jednog uzorka od bilo koje ribe s uzgajališta korištenjem metode opisane u dijelu III., s popratnim dokazom virusa ZAL-a u preparatima tkiva bilo koje ribe na uzgajalištu, korištenjem bilo RT-PCR-a (Dio IV.) ili IFAT-a (dio V.).

1.4. Kriteriji za uspostavu i ukidanje zona kontrole i službenog nadziranja zbog sumnje ili potvrde ZAL-a

I.4.1. U svrhu uspostave službenog programa nadziranja na temelju rizika, države članice moraju, u blizini uzgajališta gdje je službeno postavljena sumnja ili potvrđena infekcija ZAL-om, uspostaviti odgovarajuće zone kontrole i nadziranja.

I.4.2. Zone koje se uspostavljaju određuju se na temelju analize rizika za daljnje širenje bolesti za svaki pojedini slučaj. U skladu s epidemiološkom situacijom, predmetno područje vodenog sliva ili obalno područje:

- definira se kao zona kontrole, ili
- može se, kad je riječ o velikom vodenom slivu ili obalnom području, podijeliti na zonu kontrole i zonu nadziranja, ako isto ne ugrožava sprečavanje širenja ZAL-a.

Nadalje, dodatne zone nadziranja, prema potrebi, mogu se uspostaviti izvan područja vodenog sliva ili obalnog područja.

I.4.3. Glavni čimbenici koji se uzimaju u obzir prilikom uspostavljanja gore navedenih zona su oni koji utječu na rizike širenja bolesti na ribe iz uzgoja i slobodnoživuće ribe, kao što su: broj, stopa i proširenost uginuća ribe na uzgajalištu sumnjivom ili potvrđeno zaraženom virusom ZAL-a; uzrok uginuća na predmetnom uzgajalištu; udaljenost i gustoća susjednih uzgajališta; kontaktna uzgajališta; vrste prisutne na uzgajalištu; način gospodarenja ribom na zaraženom i susjednim uzgajalištima; hidrodinamički uvjeti i drugi čimbenici epidemiološkog značaja identificirani u okviru epidemiološkog istraživanja provedenog u skladu s člankom 5. stavkom 2. i člankom 8. Direktive 93/53/EEZ.

I.4.4. Prilikom uspostavljanja zona, primjenjuju se sljedeći minimalni kriteriji.

I.4.4.1. Država članica uspostavlja „zonu kontrole” u bližoj okolini uzgajališta potvrđeno zaraženim virusom ZAL-a, kako slijedi:

- u obalnim područjima: područje kruga s polumjerom od najmanje jednog plimnog doseg a ili najmanje 5 km, sa središtem u uzgajalištu potvrđeno zaraženo virusom ZAL-a, ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima, ili
- u kopnenim područjima: cjelokupno područje vodenog sliva uzgajališta potvrđeno zaraženo virusom ZAL-a; kod velikih površina vodenog sliva, država članica može ograničiti granice zone na dijelove područja vodenog sliva pod uvjetom da se time ne ugrožava sprečavanje širenja virusa ZAL-a.

I.4.4.2. „Privremena zona kontrole” uspostavlja se u slučaju sumnje na prisutnost ZAL-a, na temelju istih kriterija koji su utvrđeni za zonu kontrole.

I.4.4.3. Ako je potrebno, država članica uspostavlja „zonu nadziranja” izvan zone kontrole u područjima gdje se smatra da je dovoljno provoditi manje intenzivno nadziranje, i ona predstavlja:

- u obalnim područjima: područje koje okružuje zonu kontrole i zone preklapanja izmjene plime i oseke, područje koje okružuje zonu kontrole i uključeno u krug polumjera od 10 km od središta zone kontrole, ili odgovarajuće područje određeno u skladu s odgovarajućim hidrodinamičkim ili epidemiološkim podacima, ili
- u kopnenim područjima: ako je to potrebno, obuhvaća prošireno područje izvan uspostavljene zone kontrole.

I.5. *Mirovanje i ukidanje uspostavljenih zona*

I.5.1. Nadležno tijelo države članice osigurava da su sva uzgajališta unutar zone kontrole podvrgnuta odgovarajućem periodu mirovanja nakon što se iz njih isprazni sva riba i nakon što se prema potrebi dezinficiraju. Trajanje perioda mirovanja na uzgajalištima na kojima je potvrđena infekcija ZAL-om ne smije biti kraće od šest mjeseci. Duljinu perioda mirovanja za druga uzgajališta u zonama kontrole određuje nadležno tijelo na temelju procjene rizika za svaki pojedinačni slučaj. Kada se isprazne sva uzgajališta u zoni kontrole, primjenjuje se sinkronizirano mirovanje u trajanju od najmanje šest tjedana.

Nadalje, nadležno tijelo može odlučiti o trajanju mirovanja na uzgajalištima u uspostavljenim zonama nadziranja.

I.5.2. Uspostavljene zone kontrole ne mogu biti ukinute te porobljene sve dok se riba sa svih uzgajališta u tim zonama ne isprazni, te dezinficiraju prema potrebi i miruju u skladu s točkom I.5.1. Kad se porobljavaju ove zone, zone kontrole prelaze u zone nadziranja, kako je utvrđeno točkom I.4.4.3.

I.5.3. Uspostavljene privremene zone kontrole ne mogu biti ukinute sve dok se ne isključi sumnja na ZAL, u skladu s točkom I.2.2. U slučaju potvrde ZAL-a, u skladu s dijelom I.3., privremena zona kontrole prelazi u zonu kontrole.

I.5.4. Uspostavljene zone nadziranja ne mogu biti ukinute dok ne prođu dvije godine od ukidanja zone kontrole.

I.6. *Službeno nadziranje nakon postavljanja sumnje ili potvrde ZAL-a*

I.6.1. Upućivanjem na članak 5. stavak 2. i članak 6. Direktive 93/53/EEZ, a kako bi se utvrdila raširenost i razvoj bolesti nakon postavljanja sumnje ili potvrde ZAL-a na uzgajalištu, nadležno tijelo ili stručna služba za zdravlje riba, uz savjetovanje s nadležnim tijelom i pod njegovim nadzorom, moraju u svim uzgajalištima smještenim u uspostavljenim zonama provesti program službenog nadziranja temeljenog na riziku.

I.6.2. U svrhu primjene ovakvog službenog programa nadziranja, nadležno tijelo mora, ako je potrebno inspekcijom na licu mjesta, identificirati sva uzgajališta u uspostavljenim zonama te izraditi službeni popis vrsta, kategorija i broja riba držanih na uzgajalištima, uključujući podatke o uginućima.

- I.6.3. Nastavno na početni službeni popis, uzgajališta unutar uspostavljenih privremenih zona kontrole koja drže atlantski losos (*Salmo salar*) ili bilo koja druga vrsta navedena kao prijemljiva na ZAL ili kao mogući nositelj ZAL-a u važećoj verziji Kodeksa o zdravlju akvatičnih životinja OIE-a, moraju nadležno tijelo svakih 14 dana izvješćivati o mortalitetu. O povećanom mortalitetu izvještava se po danu i po kavezu. Nadležno tijelo istražuje svaki značajan porast mortaliteta na uzgajalištu.

Ako se sumnja potvrdi, sva uzgajališta u uspostavljenoj zoni kontrole tjedno izvješćuju nadležno tijelo o dnevnim uginućima, po kavezu.

Uzgajališta u zonama nadziranja izvješćuju nadležno tijelo o mortalitetu svakih 14 dana.

Nadalje, inspekcije se moraju provoditi redovito tijekom godine u uspostavljenim zonama i s učestalošću kako je navedeno u tablici 1. Međutim, kada klimatski uvjeti u dijelu godine onemogućavaju takve inspekcije, države članice mogu u kriznom planu odrediti drugu učestalost inspekcija.

Tablica 1.

Program službenog nadziranja

| Lokacija uzgajališta | Minimalan broj inspekcija po godini | Minimalan broj inspekcija po godini nakon ukidanja zone kontrole |
|--------------------------|-------------------------------------|--|
| Zona kontrole | 12 | |
| Zona nadziranja | 6 | 6 |
| Privremena zona kontrole | 6 | |

Program nadziranja se provodi sve do ukidanja zona.

- I.6.4. Inspekcije kao i odabir, prikupljanje, priprema i slanje uzoraka provodi se kako je određeno u dijelovima II.1. do II.4. Pretraživanje uzoraka provodi se u skladu s dijelovima III. do VI.

II. Inspekcija i uzorkovanje

II.1. Inspekcija, odabir i prikupljanje uzoraka na uzgajalištu na kojem se sumnja na prisutnost ZAL-a

- II.1.1. Pri redovitim inspekcijama koje se obavljaju u okviru programa službenog nadziranja navedenog u dijelu I.6. i u uzgajalištima za koja se sumnja da su zaražena ZAL-om, svi se objekti uzgajališta (kavezi, bazeni, ribnjaci) podvrgavaju inspekciji kako bi se utvrdila prisutnost uginulih i slabih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem. Kada je moguće, nedavno uginule (još neraspadnute) ribe te slabe ribe ili ribe neuobičajenog ponašanja podvrgavaju se pregledu radi utvrđivanja kliničkih znakova ili postmortalnih promjena koji odgovaraju ZAL-u, kako je opisano u važećem izdanju *Dijagnostičkog priručnika za bolesti akvatičnih životinja OIE-a*.
- II.1.2. Ako su primijećeni nedavni klinički znakovi koji odgovaraju ZAL-u, ili ako inspektor ili veterinar ima bilo kakav drugi razlog za sumnju da su ribe možda zaražene, uzima se uzorak od najmanje 10 riba. Ako je moguće, uzorak čine nedavna uginuća i slabe ribe ili ribe koje pokazuju neuobičajeno ponašanje. Ako nema dovoljno klinički promijenjenih riba, tada se potreban broj riba u uzorku nadopunjava zdravim ribama odabranim iz kaveza, bazena ili ribnjaka koji pokazuju najveći broj uginuća ili riba koje pokazuju kliničke znakove bolesti.
- II.1.3. Ako je primijećen nedavni mortalitet ili slabe ribe ili ribe neuobičajenog ponašanja, ali klinički znakovi i postmortalni nalazi ne odgovaraju ZAL-u, uzorkovanje nije obvezno, iako inspektor ili veterinar može odlučiti da se takvi uzorci uzmu ako su potrebni za postavljanje diferencijalne dijagnoze.

II.1.4. Kada se sumnja da su slobodno živuće ribe zaražene ZAL-om, države članice osiguravaju prikupljanje i pretraživanje odgovarajućih uzoraka primjenom odgovarajućih kliničkih i laboratorijskih metoda navedenih u dijelu II. do VI. kako bi se isključila ili potvrdila prisutnost ZAL-a i kako bi se procijenilo predstavlja li pojava bolesti značajnu prijetnju ribama u uzgajalištima.

II.2. Priprema uzoraka od riba

II.2.1. Uzorci za histološku pretragu uzimaju se samo od svježe usmrćenih riba koje pokazuju kliničke znakove ili postmortalne promjene koje ukazuju na prisutnost bolesti. Sve vanjske ili unutarnje lezije moraju se uzorkovati i u svakom slučaju se uzorci jetre, srednjeg bubrega, srca i slezene vade iz ribe pomoću skalpela i prebacuju u 8 – 10 % (vol/vol) puferiranu solnu otopinu formalina. Omjer između fiksira i tkiva mora biti najmanje 20:1 kako bi se osiguralo zadovoljavajuće očuvanje tkiva.

II.2.2. Tkiva za virološko pretraživanje uzimaju se od svih uzorkovanih riba. Radi potvrđivanja nalaza, uzimaju se dupli uzorci. Komadići jetre, prednjeg bubrega, srca i slezene vade se iz ribe sterilnim instrumentom i prebacuju u plastične epruvete koje sadrže 9 ml transportne otopine, tj. medij kulture stanica s antibiotičima. Kombinacija $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ fungizona, 200 IU ml^{-1} polimiksina B i $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamicina je prikladna, ali se mogu upotrijebiti i druge kombinacije s dokazanom učinkovitošću. Tkiva od najviše pet riba mogu se sakupiti u jednu epruvetu koja sadrži transportnu otopinu, što čini jedan skupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku treba iznositi $1,0 \pm 0,5 \text{ g}$.

II.2.3. Za pretraživanje IFAT-om uzimaju se bubrežni otisci samo od svježe usmrćenih riba, tj. unutar dva sata od uginuća. Komadić srednjeg bubrega vadi se iz ribe korištenjem sterilnih instrumenata. S tkiva se upijajućim papirom otkloni suvišna krv, a zatim se višekratno pritišće na predmetno stakalce obloženo poli-L-lizinom. Pojedinačni otisci moraju biti prislonjeni jedan uz drugi, ali se ne smiju preklapati kako bi se dobio kontinuirani jednostruki sloj stanica. Krv i tkivna tekućina nisu odgovarajući materijal za ovaj test. Treba izbjegavati ostavljanje uzorka bubrega na upijajućem papiru kako bi se „iscijedio” jer to može rezultirati zgrušavanjem krvi, što uzrokuje taloženje velikih količina serumskih proteina na predmetnom stakalcu za testiranje. Otisci se trebaju osušiti na zraku i zatim držati na hladnom i suhom mjestu, ako se neće odmah fiksirati. Fiksiranje otisaka se mora obaviti unutar 72 sata od uzorkovanja ribe. Alternativno, otisci se nakon sušenja na zraku mogu zamrznuti te pohraniti do mjesec dana na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ prije fiksiranja.

II.2.4. Riba koje pokazuju znakove anemije mogu se omamiti te se od njih mogu odmah uzeti heparinizirani uzorci krvi za hematološko pretraživanje, kao što je mjerenje hematokrita.

II.2.5. Tkivo za RT-PCR analizu uzima se od svih uzorkovanih riba. Upotrebom sterilnog instrumenta iz ribe se vadi komadić prednjeg ili srednjeg bubrega te se prebacuje u epruvetu mikrocentrifuge koja sadrži 1 ml dokazano učinkovite otopine za konzerviranje RNA. Tkivo uzeto od najviše pet riba može se sakupiti u jednu epruvetu koja sadrži otopinu za konzerviranje, što čini jedan skupni uzorak. Težina tkiva u jednom uzorku treba iznositi približno 0,5 g. Kada je riba premala da bi se dobio uzorak potrebne težine, uzimaju se komadići bubrega, srca, slezene, jetre ili piloričnih nastavaka (cekuma), upravo navedenim redoslijedom, dok se ne postigne težina od 0,5 g.

II.3. Slanje uzoraka riba

II.3.1. Uzorci krvi i epruvete koje sadrže tkivo riba namijenjeno virološkom pretraživanju ili RT-PCR analizi stavljaju se u izolirane posude (npr. kutije od polistirena s debelim stjenkama) zajedno s dovoljnom količinom leda ili „rashladnih blokova” kako bi se osiguralo rashlađivanje uzoraka tijekom prijevoza u laboratorij. Treba izbjegavati zamrzavanje, a na prijemu u kutijama za prijevoz još uvijek mora biti leda ili su jedan ili više „rashladnih blokova” još uvijek djelomično ili potpuno zamrznuti. U izuzetnim okolnostima uzorci za RT-PCR analizu ili za virološko pretraživanje mogu se naglo zamrznuti i transportirati u laboratorij pri temperaturi od $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ili nižoj.

II.3.2. Predmetna stakalca za IFAT šalju se u spremnicima za predmetna stakalca s dovoljno sredstva za isušivanje kako bi otisci ostali suhi i rashlađeni, kako je gore opisano.

II.3.3. Ako se tkiva prevoze u fiksiru za histološku pretragu, treba ih slati u zatvorenim epruvetama u ambalaži otpornoj na vanjske utjecaje, kao što su kutije od polistirena s debelim stjenkama.

II.3.4. Osim u slučaju kada su uzorci zamrznuti, virološko pretraživanje mora započeti što je prije moguće, a ne kasnije od 72 sata nakon prikupljanja uzoraka. Uzorak za dodatnu kontrolnu analizu pohranjuje se po dolasku u laboratorij na temperaturu od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili nižoj.

II.3.5. U laboratorij se može poslati cijela riba ako su tijekom prijevoza ispunjeni temperaturni zahtjevi, kako je opisano u točki II.3.1. Cijela se riba omota u upijajući papir i šalje u plastičnoj vrećici, rashlađena na gore opisani način.

II.3.6. Živa se riba može također poslati, ali samo pod nadzorom službenog servisa.

II.3.7. Za RT-PCR analizu tkiva pohranjenih u *RNAlater*, ekstrakcija RNA se mora obaviti unutar određenog vremenskog razdoblja ovisno o tome na kojoj temperaturi su pohranjeni uzorci. Ta vremenska razdoblja su sljedeća:

| | |
|---------------------------------|--------------|
| — $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ | jedan dan |
| — $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ | jedan tjedan |
| — $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ | jedan mjesec |
| — $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ | neograničeno |

II.3.8. Pakiranje i označavanje se mora obaviti u skladu s postojećim nacionalnim ili međunarodnim propisima za prijevoz.

II.4. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Uz suglasnost dijagnostičkog laboratorija, mogu se prikupiti i pripremiti i druga tkiva riba za dodatno pretraživanje.

III. Virološko pretraživanje

III.1. Priprema uzoraka

III.1.1. Kada dođe do praktičnih poteškoća koje onemogućavaju inokulaciju stanica unutar 72 sata nakon prikupljanja uzoraka tkiva, prihvatljivo je zamrzavanje tkiva na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 28 dana. Tkivo se prije virološkog pretraživanja smije zamrznuti i odmrznuti samo jedanput.

III.1.2. Svaki uzorak (skupni uzorak tkiva u transportnoj otopini) mora se potpuno homogenizirati upotrebom aparata „stomacher”, miješalice ili mužara i drobilice, centrifugiranjem pri 2 000 do 4 000 \times g kroz 15 minuta na temperaturi od 0 do $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega se supernatant filtrira ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) i inkubira s jednakim volumenom odgovarajućim razrijeđenjem skupnog antiseruma za autohtone serotipove virusa ZNG. Titar antiseruma mora biti najmanje 1:2 000 u 50 % plak neutralizacijskom testu. Mješavina se inkubira kroz jedan sat na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. To predstavlja inokulat.

Tretiranje svih inokulata antiserumom za virus ZNG-a (virus koji se u nekim dijelovima Europe pojavljuje u 50 % uzoraka riba) ima za cilj sprečavanje razvoja CPU zbog razvoja virusa ZNG-a u inokuliranim staničnim kulturama. Time se smanjuje trajanje virološkog pretraživanja kao i broj slučajeva u kojima bi se pojava CPU morala smatrati kao mogući pokazatelj virusa ZAL-a.

Kada uzorci dolaze iz proizvodnih jedinica koje se smatraju slobodne od ZNG-a, može se izostaviti tretiranje inokulata antiserumom za virus ZAL-a.

III.2. Inokulacija staničnih kultura

III.2.1. Stanice SHK-1 (pasaža 80 ili niža) ili stanice TO uzgajaju se u mediju L-15 koji sadrži 5 % fetalnoga goveđeg seruma, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamina i 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptetanola, u pliticama s 12 ili 24 jažice. Mogu se upotrijebiti i druge stanične linije s dokazanom djelotvornošću i osjetljivošću za izolaciju virusa ZAL-a, uvažavajući varijabilnost sojeva i sposobnost različitih sojeva da se umnožavaju u različitim staničnim linijama. Suspenzija organa tretirana antiserumom inokulira se u mlade aktivno rastuće stanične kulture kako bi se dobio konačno razrijeđeni tkivni materijal u hranjivoj podlozi u omjeru od 1: 1 000. Za svaku suspenziju organa dodaje se 40 μl inokulata u jednu jažicu koja sadrži 2 ml hranjive podloge. Kako bi se smanjio rizik unakrsne kontaminacije, preporučuje se da se za uzorke iz različitih ribljih uzgajališta, upotrebljavaju posebne plitice s 12 ili 24 jažice.

III.2.2. Jedna plitica se ostavlja neinokulirana da bi služila kao negativna kontrola. Odvojena plitica se inokulira referentnim izolatom virusa ZAL-a kao pozitivna kontrola, na sljedeći način. Sto μl standardnog pripravka virusa ZAL-a (minimalni titar 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹) inokulira se u prvu jažicu i dobro promiješa. Volumen tog materijala iz prve jažice prenosi se u drugu jažicu da bi se dobila otopina s omjerom 1:10 i dobro se promiješa. Ovaj se postupak ponavlja kroz cijelu pliticu da bi se dobilo šest deseterostrukih razrjeđenja. Standardni virus ZAL se može pohraniti na -80°C najmanje dvije godine, ali kada se jednom odmrzne mora se upotrijebiti u roku od tri dana. Napomena: treba paziti da se spriječi unakrsna kontaminacija testne plitice s materijalom pozitivne kontrole. Kako bi se izbjegao ovaj rizik, pozitivne kontrole se pripremaju i njima se rukuje odvojeno od testne plitice.

III.2.3. Uzorci se inkubiraju pri $14 \pm 2^\circ\text{C}$ kroz razdoblje do 15 dana.

III.3. Mikroskopiranje

Stanične kulture se dva puta mikroskopski pregledavaju na pojavu CPU-a, između petog i sedmog i između 12. i 14. dana nakon inokulacije. Ako bilo koji skupni uzorak pokaže CPU, mora se odmah započeti s postupcima identifikacije virusa (III.6.). Ako se do 14. dana ne uoči CPU, izvodi se test hemadsorpcije (III.4.).

III.4. Hemadsorpcija

Umnožavanje virusa ZAL-a u staničnim kulturama ne rezultira uvijek CPU-om. Stoga se svaka jažica podvrgava testu hemadsorpcije, kako je dolje opisano, ili alternativno, svaka se jažica podvrgava IF testu, kako je opisano u III.6.1.

III.4.1. Hranljiva podloga stanične kulture uklanja se iz svake jažice, uključujući one koje se koriste za pozitivnu i negativnu kontrolu, te se stavljaju u obilježene sterilne epruvete. Petsto μl 0,2 % (v/v) suspenzije ispranih crvenih krvnih zrnaca kunića ili konja, ili 0,05 % (v/v) suspenzije ispranih crvenih krvnih zrnaca kalifornijske pastrve ili atlantskog lososa dodaje se u svaku jažicu i inkubira 45 minuta na sobnoj temperaturi. Crvena krvna zrnca se odstranjuju i svaka se jažica dva puta ispire medijem L-15. Svaka se jažica mikroskopski pregledava.

III.4.2. Postojanje nakupina stanica crvenih krvnih zrnaca pričvršćenih uz površinu SHK-1 ili TO stanica ukazuje na vjerojatnu zarazu ortomiksovirusom. Ako je test hemadsorpcije pozitivan, treba odmah provesti test identifikacije virusa (III.6.).

III.5. Subkultivacija ili pasaža

III.5.1. Subkultivacija se izvodi između 13. i 15. dana. Dvjesto dvadeset pet μl supernatanta kulture dodaje se u jažice koje sadrže aktivno rastuće svježe stanice SHK-1, na plitici s 12 jažica, te se do 18 dana inkubira na temperaturi od $14 \pm 2^\circ\text{C}$. Stanična kultura se dva puta mikroskopski pregledava na pojavu CPU-a, i to između petog i sedmog i između 14. i 18. dana nakon inokulacije. Ako bilo koji skupni uzorak pokaže CPU, treba odmah započeti postupak identifikacije virusa (III.6.). Ako se do 14. i 18. dana ne zapazi CPU, provodi se test hemadsorpcije (III.4.).

III.5.2. Ako se tijekom prvih sedam dana inkubacije pojavi citotoksičnost, u toj fazi treba provesti subkultivaciju i stanice treba inkubirati 14 do 18 dana, te ponovno subkultivirati s daljnjih 14 do 18 dana inkubacije. Ako se citotoksičnost pojavi nakon sedam dana, subkultivacija se obavlja jedanput, a stanice se inkubiraju tako da se postigne ukupno 28 do 36 dana inkubacije od primarne inokulacije.

III.5.3. Ako se u primarnoj kulturi pojavi bakterijska kontaminacija, treba ponovno pripremiti test upotrebom homogenata tkiva pohranjenog na -80°C . Prije inokulacije, homogenat tkiva se centrifugira pri $4\,000 \times g$ kroz 30 minuta na temperaturi od 0 do 6°C , a supernatant se filtrira kroz $0,22\ \mu\text{m}$. Ako se bakterijska kontaminacija pojavi tijekom faze subkultivacije, supernatant se filtrira kroz $0,22\ \mu\text{m}$, inokulira u svježe stanice i inkubira daljnjih 14 do 18 dana.

III.6. Testovi identifikacije virusa

Ako se u bilo kojoj fazi uoči dokaz CPU-a, ili ako je test hemadsorpcije pozitivan, provodi se identifikacija virusa. Metode izbora za identifikaciju virusa ZAL-a su IF (III.6.1.) i RT-PCR (Dio IV.). Ako se smatra da mogu biti prisutni i drugi virusi, preporučuje se provođenje dodatnih testova identifikacije virusa. Ako ti testovi ne omoguće konačnu identifikaciju virusa u roku od tjedan dana, supernatant se mora dalje proslijediti nacionalnom referentnom laboratoriju ili referentnom laboratoriju EU za bolesti riba radi trenutne identifikacije.

III.6.1. IF

III.6.1.1. Stanice SHK-1 (pasaža 80 ili niža) ili stanice TO uzgajaju se u mediju L-15 koji sadrži 5 % fetalnoga goveđeg seruma, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamina i 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptoetanola, u pliticama s 24 ili 96 jažica, i upotrebljavaju se pri konfluenciji većoj od 50 %. Mogu se upotrijebiti i druge stanične linije i hranjive podloge s dokazanom djelotvornošću. Dvjesto dvadeset pet μ l supernatanta kulture, za koju se smatra da je zaražena virusom, dodaje se u svaku od dviju jažica, pomiješa se i 225 μ l prenosi u dvije sljedeće jažice, pri razrjeđenju 1:5. Dvije dodatne jažice ostavljaju se neinokulirane i služe kao kontrola. Za uzorke iz različitih ribljih uzgajališta koriste se posebne plitice kao i kontrole virusa. Kontrola virusa uspostavlja se korištenjem referentnog izolata virusa ZAL.

III.6.1.2. Plitice se inkubiraju na 14 ± 2 °C i mikroskopski pregledavaju tijekom sedam dana. Kada se zapazi rani CPU ili se u roku od sedam dana uopće ne zapazi CPU, sljedeći korak je fiksiranje. U ovoj se fazi jažice ispiru PBS-om i fiksiraju inkubiranjem s 80 % acetonom na sobnoj temperaturi tijekom 20 minuta. Plitice se suše na zraku i odmah boje, ili se pohranjuju na temperaturi od 0 do 6 °C ne više od 24 sata prije bojenja.

III.6.1.3. Umnožene jažice se boje monoklonskim protutijelom 3H6F8 za virus ZAL-a ili nekim drugim monoklonskim protutijelom koje ima dokazanu učinkovitost i specifičnost, razrjeđuju u PBS-u i inkubiraju 30 minuta pri temperaturi od 37 ± 4 °C. Monoklonsko protutijelo se odstranjuje, a plitice se ispiru tri puta 0,05 % otopinom Tween 20 u PBS-u. U svaku jažicu se dodaje protu-mišji IgG FITC konjugat razrijeđen u PBS-u, te se inkubira 30 minuta pri temperaturi od 37 ± 4 °C. Napomena: Svaki laboratorij optimizira razrjeđenja različitih serija monoklonskog protutijela i FITC-a konjugata. Protutijelo se odstranjuje a plitice se tri puta ispiru 0,05 % otopinom Tween 20 u PBS-u.

III.6.1.4. Jažice treba odmah pregledati upotrebom invertiranog mikroskopa podešenog za fluorescentnu mikroskopiju s prikladnim filterom za ekscitaciju FITC-a. Test se smatra pozitivnim ako se uoče fluorescentne stanice. Da bi test bio valjan, rezultati pozitivne kontrole moraju biti pozitivni, a rezultati negativne kontrole negativni.

IV. Pretraživanje uzoraka sa RT-PCR

IV.1. U ovom su odjeljku opisani postupci koji su potrebni za PCR amplifikaciju dijela segmenta 8 genoma virusa ZAL-a, koji se mogu izvoditi na tkivu ribe ili na virusu ZAL-a u kulturi.

IV.1.1. Ekstrakcija RNA

- (a) Iz svakog uzorka se odstranjuje RNAlater. U svaku epruvetu se dodaje 1 ml dH₂O tretirane DEPC-om, te se epruvete centrifugiraju pet minuta pri 13 000 rpm na 0 do 6 °C.
- (b) Iz svakog uzorka se uklanja supernatant te se svakom uzorku i kontrolnoj epruveti koja sadrži prikladan kontrolni materijal (400 μ l dH₂O ili bubrežni homogenat riba slobodnih od specifičnog uzročnika bolesti (SPF)) dodaje 800 μ l TRIZola (Invitrogen), ili alternativnog reagensa za koji je dokazano da ima jednaku ili veću učinkovitost. Ako je potrebno, tkivo se kida ponovljenim pipetiranjem. Epruvete se inkubiraju pet minuta na sobnoj temperaturi. Svakoj epruveti se doda 160 μ l kloroforma te se epruvete tri minute snažno tresu, a zatim petnaest minuta centrifugiraju pri 13 000 rpm na 0 do 6 °C.
- (c) Gornji vodeni sloj se uklanja i stavlja u označenu epruvetu mikrocentrifuge zapremine 1,5 ml koja sadrži 500 μ l izopropanola te se zatim epruvete 10 minuta inkubiraju na sobnoj temperaturi, nakon čega se 15 minuta centrifugiraju pri 6 500 rpm na 0 do 6 °C.

- (d) Supernatant se odstranjuje te se talogu RNA doda 1 ml 75 % etanola. Epruvete se zatim pet minuta centrifugiraju pri 6 500 rpm na 0 do 6 °C.
- (e) Supernatant se odstranjuje i epruvete se oko tri minute ostavljaju otvorene kako bi ishlapio preostali etanol. Dodaje se 15 µl dH₂O tretirane DEPC-om kako bi se talog ponovno suspendirao te se prema potrebi kratko vrtložno protrese.
- (f) Za izračunavanje koncentracije RNA i čistoće uzorka koristi se spektrofotometar. Optička gustoća se mjeri pri 260 i 280 nm.
- (g) RNA koja će se koristiti odmah (isti dan), može se privremeno pohraniti na 0 do 6 °C. RNA koja se neće odmah koristiti pohranjuje se na – 80 °C.

IV.1.2. RT

- (a) Dva µg RNA se razrjeđuju u dH₂O tretirane DEPC-om u epruveti mikrocentrifuge od 1,5 ml. Ako je koncentracija RNA uzorka preniska da bi se u RT reakciji omogućilo korištenje 2 µg, koristi se maksimalna moguća količina RNA. Razrijeđena RNA se inkubira 10 minuta na 55 do 60 °C.
- (b) Zatim se epruvete koje sadrže RNA stavljaju na led, te se dodaju RT reagensi da bi se dobile konačne sljedeće koncentracije: 1 × pufer, 1 mM dNTPs, 100 ng nasumičnih heksamera, 20 U RNase inhibitora i 200 U MMLV-RT u ukupnom volumenu od 20 µl.
- (c) Epruvete se jedan sat inkubiraju na 37 °C.
- (d) cDNA se pohranjuje pri temperaturi od 0 do 6 °C dok je potrebno te se što je prije moguće koristi u PCR-u.

IV.1.3. PCR

- (a) Pet µl cDNA se dodaje u 45 µl PCR mješavine da bi se dobile konačne koncentracije: 1 × pufer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM svakog dNTP, 25 pmol svakog primera i 1U Taq polimeraze. Primeri su ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (početni primer) i ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverzni primer). Negativne kontrole za ekstrakciju, RT i PCR koraci, trebaju biti uključeni.
- (b) Epruvete se stavljaju na pet minuta u termocikler programiran na 94 °C, nakon čega slijedi 35 ciklusa na 94 °C jednu minutu, na 55 °C jednu minutu i na 72 °C jednu minutu, s konačnom inkubacijom na 72 °C kroz pet minuta.
- (c) Rezultati PCR-a se procjenjuju nakon elektroforeze upotrebom 2 % agarozna gela obojenog etidijum bromidom, uključujući markere veličine duž uzoraka i negativne kontrole iz faza RT-a i PCR-a. Smatra se da je jedan produkt PCR-a od 15 5bp indikativan za prisutnost RNA virusa ZAL-a. Za uzorke koji sadrže jedan dodatni produkt od 310 bp, također se smatra da sadrže RNA virusa ZAL-a. Uzorci koji daju višestruke produkte PCR-a, uključujući najmanje jedan od približno 155 bp, mogu sadržavati RNA virusa ZAL-a. Oni se mogu dalje pretraživati upotrebom DNA probe ili sekvencioniranjem nukleotide.

IV.1.4. PCR potvrda izolacije virusa ZAL u kulturi tkiva

Ako se u SHK-1 stanicama tijekom virološkog pretraživanja uzoraka tkiva pojavi potpuni CPU, iz jažice treba odstraniti 400 µl supernatanta i staviti ga u sterilnu epruvetu veličine 1,5 ml. Iz ovog se uzorka ekstrahira RNA, kako je utvrđeno u dijelu III.1., te se izvodi RT-PCR. Ako se upotrebljavaju kulture bez potpunog CPU-a, uklanja se supernatant, stanice se sastružu s površine jažice ili bočice i stave se u sterilnu epruvetu od 1,5 ml za RNA ekstrakciju i RT-PCR.

IV.1.5. Potvrda PCR produkata DNA probe

- (a) Specifičnost produkta PCR-a od 155 bp procjenjuje se sondiranjem pomoću oligonukleotida koji se hibridizira na području PCR produkta unutar primera. PCR produkti podvrgavaju se elektroforezi u 1 % agarozna gelu uzduž markera veličine i pozitivne kontrole i negativne kontrole iz RT i PCR faza.

- (b) DNA se podvrgava Southern blot-u na membrani, te se označeni oligonukleotid (5'-CGGGAGTT-GATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') inkubira s membranom nakon odgovarajućih pred-hibridizacijskih postupaka.
- (c) Nepovezane i nespecifično povezane probe ispiru se s membrane, te se povezane probe vizualiziraju.
- (d) Probe povezane s fragmentom od 155 bp (i 310 bp, ako je prisutan) predstavljaju dokaz za specifičnost PCR-a i ukazuju da je u uzorku prisutna RNA virusa ZAL.

IV.1.6. Sekvencioniranje nukleotide PCR produkata

Specifičnost PCR-a se može procijeniti pretragom sekvence nukleotide PCR produkta od 155 bp.

- (a) PCR produkt se očisti od agarozna gela ili otopine.
- (b) Fragment se sekvencionira upotrebom istih primera koji su upotrijebljeni u PCR-u ili vektorskih primera ako su bili klonirani u vektor prije sekvencioniranja.
- (c) Sekvenca nukleotide se uspoređuje s onom za segment 8 virusa ZAL-a koji je dostupan u EMBL bazi podataka sekvenci nukleotida (pristupni brojevi su Y10404, AJ012285, AJ242016).
- (d) Prisutnost sekvence koja odgovara onoj za segment 8 virusa ZAL-a je dokaz da uzorak sadrži RNA virusa ZAL-a.

V. Pretraživanje bubrežnih otisaka IFAT-om

V.1. Za pretraživanje bubrežnih otisaka IFAT-om uspostavljen je sljedeći protokol

V.2. Priprema i bojenje otisaka

- V.2.1. Predmetna stakalca se tri minute fiksiraju u acetonu ili metanolu/acetonu (1:1) i zatim osuše na zraku. Prije bojenja pregleda se svako predmetno stakalce i odgovarajuća područja se zaokruže pomoću olovke ImmEdge™ ili na sličan način, te se ostavi da se osuše na zraku. Predmetna stakalca se zatim stave u otopinu za blokiranje (6 % obrano mlijeko u PBS-u koji sadrži 0.2 % Tween 20), te se 30 minuta inkubiraju na sobnoj temperaturi uz nježno protresanje. Svako takvo stakalce se osuši i spremi vodoravno u kutiju za predmetna stakalca koja sadrži vlažnu maramicu za održavanje vlažne atmosfere.
- V.2.2. Svaki se otisak mora prekriti otopinom monoklonskog protutijela 3H6F8 za virus ZAL-a (ili nekog drugog protutijela dokazane specifičnosti i učinkovitosti), nakon čega se kutija s predmetnim stakalcima zatvori i 60 minuta inkubira na sobnoj temperaturi uz protresanje. Protutijelo se obično razrjeđuje u omjeru 1:10 do 1:100 u 1 % obranom mlijeku, ali se stvarni omjer razrjeđenja mora odrediti za svaku pojedinačnu seriju. Stakalca se ispiru tri puta po dvije minute u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Svaki se otisak prekriva otopinom koja sadrži FITC kozji protu-mišji konjugat razrijeđen u omjeru 1:1 000 u 1 % obranom mlijeku i 60 minuta inkubiraju u vlažnom okolišu na sobnoj temperaturi. Stakalca se ispiru tri puta po dvije minute u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Svako stakalce se prekriva otopinom CITIFLUOR™ (500 µl CITIFLUOR™ pomiješano s 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 u PBS-u) ili drugim prikladnim zaštitnim medijem tijekom 10 minuta. Stakalca se ispiru tri puta u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Ako je potrebno dvostruko bojenje, svaki se otisak može prekriti propijedijevim jodidom (0.01 mg/ml) u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20 i inkubirati tri minute na sobnoj temperaturi. Stakalca se ispiru tri puta po dvije minute u PBS-u koji sadrži 0,1 % Tween 20. Stakalca se osuše i stave u CITIFLUOR™ ili neki drugi odgovarajući zaštitni medij. Prije mikroskopske pretrage, stakalca se pohrane na tamno mjesto pri temperaturi od 4 °C.

V.3. Pretraživanje upotrebom fluorescentne mikroskopije

Svako se stakalce pretraži mikroskopom prikladnim za epi-fluorescentno osvjetljenje, upotrebom odgovarajućeg filtra koji pobuđuje FITC na emitiranje karakteristične zelene fluorescencije. Sva polja unutar područja označenog pomoću olovke ImmEdge™ pretražuju se pod objektivima $\times 10$ i $\times 20$, a sumnjiva područja (ona koja pokazuju zelenu fluorescenciju) dalje se pretražuju pod objektivom $\times 40$ i fazno/fluorescentnim osvjetljenjem kako bi bili sigurni da je fluorescentna obojenost povezana sa stanicama. Fazne koordinate sumnjivih područja treba zabilježiti radi kasnije potvrde prirode fluorescencije koje obavlja drugi ispitivač. Nakon pregleda koji obavi primarni čitač, stakalca koja su pozitivna ili sumnjiva ponovno pregledava drugi čitač i potvrđuje rezultate.

V.4. Kontrole

- V.4.1. Za svaku seriju stakalaca obojenih za IFAT, moraju biti uključena tri tipa kontrole:
- bubrežni otisak od nezaraženog atlantskog lososa (negativna kontrola),
 - nezaražena stanična kultura SHK-1 ili druga prijemljiva stanična kultura (negativna kontrola),
 - stanična kultura SHK-1 ili druga prijemljiva stanična kultura zaražena virusom ZAL-a (pozitivna kontrola).
- V.4.2. Ako je dostupan, kao dodatna pozitivna kontrola preporučuje se bubrežni otisak atlantskog lososa zaraženog virusom ZAL-a.
- V.4.3. Ako se s bilo kojom od negativnih kontrola dobije pozitivan rezultat, test se smatra nevaljalim za sva stakalca u toj seriji. Ako se za sva stakalca u seriji, uključujući pozitivne kontrole, dobije negativan rezultat, test se smatra nevaljalim za sva stakalca u toj seriji. U slučaju kada nevaljale kontrole obezvrijede cijelu seriju stakalaca, ta se stakalca moraju uništiti, te se mora provesti ponovno testiranje upotrebom dupliciranih otisaka.

V.5. Pretraživanje drugih tkiva

Ova se tehnika može primijeniti na druga tkiva ribe, kao što su jetra, slezena i srce, pod uvjetom da se na stakalce može prenijeti dovoljna količina endotelnih stanica, leukocita ili limfocita. Postupak bojenja ostaje isti za sva tkiva, iako je kod nekih tkiva bolje izostaviti bojenje propidijevim jodidom, očekujući da će se tipovi stanica prisutni u otisku identificirati faznim osvjetljenjem.

VI. HISTOLOGIJA

Djelici preparirani parafinom režu se na veličinu od 5 µm i boje upotrebom hematoksilina i eozina. Histološke promjene povezane s ZAL-om opisane su u važećem izdanju Dijagnostičkog priručnika za bolesti akvatičnih životinja OIE-a.

VII. Akronimi i kratice

| | |
|--------------------|--|
| cDNA | Komplementarna deoksiribonukleinska kiselina |
| CPU | Citopatogeni učinak |
| DEPC | Dietilpirokarbonat |
| dNTP | Deoksinukleotid trifosfat |
| FITC | Fluorescin izotiocianat |
| IF | Imunofluorescencija |
| IFAT | Test indirektno imunofluorescencije |
| OIE | <i>Svjetska organizacija za zdravlje životinja</i> |
| ZNG(V) | Zarazna nekroza gušterače (virus) |
| ZAL(V) | Zarazna anemija lososa (virus) |
| PBS | Solna otopina s fosfatnim puferom |
| RNA | Ribonukleinska kiselina |
| RT-(PCR) | Reverzna transkriptaza (lančana reakcija polimeraze) |
| SHK-1 | Stanice iz prednjeg bubrega lososa |
| TCID ₅₀ | Infektivna doza tkivne kulture pri 50 % ciljnog učinka |