

# COMMISSIONE

## DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 13 giugno 2003

**recante criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da attuare in caso di sospetto o conferma della presenza di anemia infettiva dei salmoni (ISA)**

[notificata con il numero C(2003) 1831]

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(2003/466/CE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 91/67/CEE del Consiglio, del 28 gennaio 1991, che stabilisce le norme di polizia sanitaria per la commercializzazione di animali e prodotti d'acquacoltura <sup>(1)</sup>, modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 806/2003 <sup>(2)</sup>, in particolare l'articolo 15,

vista la direttiva 93/53/CE del Consiglio, del 24 giugno 1993, recante misure comunitarie minime di lotta contro talune malattie dei pesci <sup>(3)</sup>, modificata da ultimo dalla decisione 2001/288/CE della Commissione <sup>(4)</sup>, in particolare l'articolo 5, paragrafo 2 e l'articolo 6,

considerando quanto segue:

- (1) A norma della direttiva 93/53/CEE, i prelievi e gli esami di laboratorio destinati ad individuare la presenza di malattie figuranti negli elenchi I e II, di cui all'allegato A della direttiva 91/67/CEE, si effettuano secondo i metodi definiti all'articolo 15 della direttiva 91/67/CEE.
- (2) Nell'allegato della decisione 2001/183/CE <sup>(5)</sup> sono stabiliti i piani di campionamento e i metodi diagnostici per individuare e confermare la setticemia emorragica virale (VHS) e la necrosi ematopoietica infettiva (IHN), malattie dei pesci figuranti nell'elenco II.
- (3) A norma dell'articolo 5, paragrafo 2 e dell'articolo 6 della direttiva 93/53/CEE, tutte le aziende situate nello stesso bacino imbrifero o nella stessa zona costiera di un'azienda di cui si sospetti o sia confermata l'infezione da virus dell'anemia infettiva dei salmoni (ISA) devono essere sottoposte a sorveglianza ufficiale. Occorre stabilire criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale.

- (4) Per definire i piani di campionamento e i metodi diagnostici da seguire per individuare e confermare la presenza dell'anemia infettiva dei salmoni (ISA), nonché per stabilire i criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da attuare in caso di sospetto o conferma della malattia, sono stati consultati esperti nel campo della salute dei pesci e delle analisi di laboratorio. Inoltre, è necessario tener conto delle direttive per la diagnosi dell'ISA stabilite nell'attuale edizione del Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases, (Manuale per la diagnosi delle malattie degli animali acquatici) edito dall'Ufficio internazionale delle epizootie (OIE).
- (5) Per l'attuazione delle nuove disposizioni è opportuno prevedere un congruo periodo di tempo.
- (6) Le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

### Articolo 1

I piani di campionamento ed i metodi diagnostici per individuare e confermare la presenza dell'anemia infettiva dei salmoni (ISA), nonché i criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da porre in essere in seguito al sospetto o alla conferma della malattia, sono stabiliti nell'allegato della presente decisione.

### Articolo 2

La presente decisione entrerà in vigore il 23 ottobre 2003.

<sup>(1)</sup> GU L 46 del 19.2.1991, pag. 1.

<sup>(2)</sup> GU L 122 del 16.5.2003, pag. 1.

<sup>(3)</sup> GU L 175 del 19.7.1993, pag. 23.

<sup>(4)</sup> GU L 99 del 10.4.2001, pag. 11.

<sup>(5)</sup> GU L 67 del 9.3.2001, pag. 65.

*Articolo 3*

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 13 giugno 2003.

*Per la Commissione*

David BYRNE

*Membro della Commissione*

---

## ALLEGATO

**programmi di campionamento e metodi diagnostici per individuare e confermare la presenza dell'anemia infettiva dei salmoni (ISA) e criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da porre in essere in seguito al sospetto o alla conferma della malattia**

## INTRODUZIONE E DEFINIZIONI

Il presente allegato:

- a) stabilisce gli orientamenti e i requisiti minimi relativi ai programmi di campionamento e ai metodi diagnostici per individuare e confermare la presenza dell'anemia infettiva dei salmoni;
- b) recepisce le disposizioni e le definizioni stabilite dalla direttiva 91/67/CEE e dalla direttiva 93/53/CEE;
- c) reca disposizioni intese a consentire una diagnosi corretta, il controllo e la sorveglianza dell'anemia infettiva dei salmoni in caso di sospetto o conferma della sua presenza;
- d) è destinato sia alle autorità competenti per la lotta contro la ISA che al personale di laboratorio incaricato dell'esecuzione dei test relativi a tale malattia. È riservata una particolare attenzione alle procedure di campionamento, ai principi e alle applicazioni dei test di laboratorio e alla valutazione dei relativi risultati, nonché alla descrizione particolareggiata delle tecniche di laboratorio. Tuttavia, ove ciò sia necessario, i laboratori possono modificare i test descritti nel presente allegato o applicare test diversi, a condizione che questi risultino avere sensibilità e specificità equivalenti. Inoltre sono stabiliti i criteri per la suddivisione in zone e per la sorveglianza ufficiale da porre in essere in caso di sospetto o conferma della presenza dell'ISA.

Ai fini del presente allegato si applicano le seguenti definizioni aggiuntive:

«bacino idrografico»: si intende l'intero bacino di raccolta, dalle sorgenti dei corsi d'acqua fino alle foci, oppure parte di un bacino, dalle sorgenti di un corso d'acqua fino ad una barriera naturale o artificiale che impedisce ai pesci di migrare al di là di detta barriera;

«zona costiera» è costituita da una parte della costa, o delle acque marine, o dell'estuario, rispondente a una precisa delimitazione geografica, che rappresenta un sistema idrodinamico omogeneo o una serie di sistemi idrodinamici omogenei.

La parte I stabilisce principi generali e criteri per la diagnosi e la conferma dell'ISA e i criteri per la suddivisione in zone e la sorveglianza ufficiale da porre in essere in caso di sospetto o conferma della presenza della malattia.

La parte II descrive le ispezioni e i prelievi da effettuare per individuare la presenza della malattia.

La parte III stabilisce i metodi da seguire per l'esame virologico.

La parte IV descrive le procedure per l'esame dei campioni con la tecnica della trascrittasi inversa — reazione a catena della polimerasi (RT-PCR) per la rilevazione dell'ISA.

La parte V descrive il protocollo da utilizzare per l'esame di impronte di rene mediante la prova di immunofluorescenza indiretta (IFAT) per la ricerca di anticorpi dell'ISA.

La parte VI contiene la metodologia dell'esame istologico.

La parte VII contiene l'elenco delle abbreviazioni e delle sigle.

**I. Criteri per la diagnosi dell'ISA, la suddivisione in zone e l'adozione di determinate misure di controllo e di sorveglianza ufficiale****I.1. Principi generali per la diagnosi dell'ISA**

Nella parte I.2 del presente allegato figura un elenco di motivi che inducono a sospettare che il pesce sia stato contagiato dal virus dell'ISA. Gli Stati membri garantiscono che, se in un'azienda si sospetta che il pesce sia contaminato dal virus dell'ISA, si proceda quanto prima ad un'indagine ufficiale per confermare od escludere la presenza della malattia, in base ad ispezioni ed esami clinici, al prelievo e alla selezione di campioni applicando i metodi descritti nelle parti III-VI del presente allegato per gli esami di laboratorio. La presenza dell'ISA è ufficialmente confermata se è soddisfatta una delle tre serie di condizioni di cui alle lettere a), b) o c), della parte I.3 del presente allegato.

**I.2. Sospetto di infezione da ISA**

I.2.1. Si deve sospettare l'infezione da ISA qualora sussista almeno una delle seguenti condizioni:

- a) la presenza di risultanze post mortem riferibili all'ISA, con o senza segni clinici della malattia. Le risultanze post mortem e i segni clinici della malattia devono corrispondere a quelli stabiliti nell'attuale edizione del Manuale di diagnostica per le malattie degli animali acquatici dell'OIE;
- b) il virus dell'ISA è isolato e identificato in una coltura cellulare prelevata da un campione di pesce dell'azienda, come descritto nella parte III;

- c) due prove di laboratorio indipendenti, eseguite avvalendosi delle metodiche RT-PCR (parte IV) e IFAT (parte V) forniscono una prova ragionevole della presenza del virus dell'ISA;
- d) trasferimento di pesce vivo in un'azienda nella quale ci siano ragionevoli motivi di sospettare che la malattia fosse presente al momento del trasferimento del pesce;
- e) qualora dalle indagini risultino altri collegamenti epidemiologici significativi con le aziende in cui la malattia sia sospettata o confermata.

I.2.2. Ogni sospetto della presenza dell'ISA può essere escluso se da indagini continue, compiute al ritmo di almeno un'ispezione clinica al mese per sei mesi consecutivi, non emergano altre prove significative della presenza dell'ISA.

### I.3. Conferma della presenza dell'ISA

Se sussiste una delle condizioni di cui alle lettere a), b) o c), la presenza dell'ISA si considera confermata:

- a) se si osservano risultanze post mortem e segni clinici riferibili all'ISA in base a quanto stabilito nell'attuale edizione del Manuale di diagnostica per le malattie degli animali acquatici dell'OIE, come pesce morto, indebolito o dal comportamento anormale, sintomi di anemia o altre risultanze e cambiamenti patologici post mortem e se viene individuato il virus dell'ISA mediante uno o più dei seguenti metodi:
  - i) isolamento e identificazione del virus dell'ISA in una coltura cellulare prelevata da almeno un campione di qualsiasi pesce allevato nell'azienda, come descritto nella parte III;
  - ii) identificazione del virus dell'ISA attraverso la metodica RT-PCR descritta nella parte IV;
  - iii) identificazione del virus dell'ISA in tessuti o preparati tissutali mediante specifici anticorpi al virus dell'ISA (ad esempio metodica IFAT o l'esame di impronte di rene come descritto nella parte V);
- b) in caso di isolamento e identificazione del virus dell'ISA in due campioni costituiti da uno o più pesci dell'azienda, analizzati in occasioni diverse avvalendosi del metodo descritto nella parte III;
- c) in caso di isolamento e identificazione del virus dell'ISA in almeno un campione di pesce dell'azienda, avvalendosi del metodo descritto nella parte III, con precisa conferma della presenza del virus in preparati tissutali prelevati da pesce allevato nell'azienda emersa dall'applicazione delle tecniche RT-PCR (parte IV) o IFAT (parte V).

### I.4. Criteri per la creazione e la revoca di zone da sottoporre a controllo e sorveglianza ufficiale in seguito a sospetto o conferma della presenza dell'ISA

I.4.1. Ai fini della definizione di un programma di sorveglianza ufficiale in base al rischio, gli Stati membri sono tenuti a istituire idonee zone di sorveglianza e di controllo nelle vicinanze di un'azienda in cui si sospetta o è stata ufficialmente confermata la contaminazione da ISA.

I.4.2. Le zone devono essere definite in base ad un'analisi del rischio di ulteriore propagazione della malattia, da effettuarsi caso per caso. In base alla situazione epizootologica, il bacino imbrifero o la relativa zona costiera:

- sono definiti zona di controllo, oppure
- i bacini imbriferi e le zone costiere di una certa estensione possono essere divisi in una zona di controllo e in una zona di sorveglianza, purché non risulti compromessa la prevenzione della propagazione dell'ISA.

Inoltre, se necessario possono essere definite zone supplementari di sorveglianza all'esterno del bacino imbrifero o della zona costiera.

I.4.3. I fattori principali da prendere in considerazione per la definizione delle zone di cui sopra sono quelli che incidono sul rischio di propagazione della malattia ai pesci di allevamento e selvatici, come ad es.: il numero, la percentuale e la distribuzione della mortalità del pesce nell'azienda in cui si sospetta o è stata confermata l'infezione dal virus dell'ISA, la causa della mortalità constatata nell'azienda, la distanza dalle aziende vicine e la loro densità, le aziende di contatto, le specie presenti in azienda, il tipo di gestione applicata nell'azienda infetta e nelle aziende limitrofe, le condizioni idrodinamiche ed altri fattori significativi dal punto di vista epidemiologico, individuati nel quadro dell'indagine epizootologica eseguita a norma dell'articolo 5, paragrafo 2 e dell'articolo 8 della direttiva 93/53/CEE.

I.4.4. Per la creazione delle zone si applicano i seguenti criteri minimi:

I.4.4.1. Lo Stato membro crea una «zona di controllo» nelle immediate vicinanze di un'azienda in cui sia stata confermata l'infezione da virus dell'ISA, secondo le seguenti modalità:

- nelle zone costiere: la zona compresa in raggio pari almeno ad un'escursione di marea oppure ad almeno 5 km, intorno all'azienda in cui è stata confermata l'infezione da ISAV, oppure un'area equivalente determinata in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica; oppure
- nelle zone interne: l'intero bacino idrografico dell'azienda in cui è stata confermata l'infezione da ISAV; nel caso di bacini idrografici di grandi dimensioni, lo Stato membro può limitare la zona a parti del bacino idrografico, purché non risulti compromessa la prevenzione della propagazione dell'ISA.

I.4.4.2. In caso di sospetto della presenza dell'ISA, viene creata una «zona di controllo temporaneo» in base agli stessi criteri descritti per la «zona di controllo».

I.4.4.3. Lo Stato membro crea una «zona di sorveglianza», se necessario, all'esterno della zona di controllo, nelle zone in cui si ritenga sufficiente una sorveglianza meno intensa, secondo le seguenti modalità:

- nelle zone costiere: una zona intorno alla zona di controllo che si sovrappone alle zone di escursione di marea; oppure una zona intorno alla zona di controllo compresa in un raggio di dieci chilometri dal centro della zona di controllo; oppure una zona equivalente stabilita in base a dati appropriati di natura idrodinamica o epidemiologica; oppure
- nelle zone interne: se necessario, una zona più ampia intorno alla zona di controllo.

I.5. *Vuoto sanitario e revoca delle zone di controllo e di sorveglianza*

I.5.1. Le autorità competenti dello Stato membro provvedono a che tutte le aziende situate all'interno della zona di controllo siano sottoposte ad un idoneo periodo di «vuoto sanitario» dopo la rimozione di tutto il pesce e la necessaria disinfezione. La durata del periodo di vuoto sanitario nelle aziende in cui è stata confermata l'infezione da virus dell'ISA non può essere inferiore a 6 mesi. Per le altre aziende situate nelle zone di controllo le autorità competenti stabiliscono la durata del periodo di vuoto sanitario in base ad un'analisi dei rischi, caso per caso. Una volta svuotate tutte le aziende all'interno della zona di controllo, si applica un periodo di vuoto sanitario sincronizzato di almeno sei settimane.

Inoltre, le autorità competenti possono decidere in merito all'applicazione di un vuoto sanitario nelle aziende situate nelle zone di sorveglianza.

I.5.2. Le zone di controllo istituite non possono essere revocate o ripopolate prima che tutte le aziende ivi situate siano state svuotate del pesce, opportunamente disinfettate e sottoposte a vuoto sanitario, secondo quanto descritto nel punto I.5.1. Durante il ripopolamento, le zone di controllo sono convertite in zone di sorveglianza ai sensi del punto I.4.4.3.

I.5.3. Le zone di controllo temporaneo istituite non possono essere revocate fino alla completa esclusione del sospetto di contaminazione da ISA conformemente alla parte I.2.2. In caso di conferma della contaminazione da ISA, conformemente alla parte 1.3, le zone di controllo temporaneo sono convertite in zone di controllo.

I.5.4. Le zone di sorveglianza istituite non possono essere revocate prima che siano trascorsi due anni dalla revoca della zona di controllo.

I.6. *Sorveglianza ufficiale in seguito a sospetto o conferma dell'ISA*

I.6.1. Con riferimento all'articolo 5, paragrafo 2 e all'articolo 6 della direttiva 93/53/CEE e per accertare la distribuzione e l'evoluzione della malattia in seguito a sospetto o conferma dell'ISA in un'azienda, le autorità competenti, oppure i servizi qualificati in materia di salute dei pesci, in consultazione e sotto controllo delle autorità competenti, applicano un programma di sorveglianza ufficiale in tutte le aziende situate nelle zone istituite.

I.6.2. Ai fini dell'applicazione di tale programma di sorveglianza ufficiale, le autorità competenti devono, se necessario attraverso indagini in loco, identificare tutte le aziende situate nelle zone istituite e procedere ad un censimento ufficiale delle specie, delle categorie e del numero di pesci presenti nelle aziende, compresi i tassi di mortalità.

- I.6.3. Dopo il primo censimento ufficiale, le aziende situate nelle zone di controllo temporaneo istituite che allevano salmone Atlantico (*Salmo salar*) — oppure qualsiasi altra specie repertoriata nel codice sanitario degli animali acquatici dell'OIE, nell'edizione più recente, come sensibile o portatore potenziale di ISA — sono tenute a riferire ogni due settimane alla competente autorità i casi di mortalità intervenuti. In caso di aumento della mortalità, le comunicazioni devono essere fatte per giorno e per gabbia. Le autorità competenti indagano in merito ai casi di incremento significativo della mortalità in un'azienda.

In caso di conferma dei sospetti, tutte le aziende situate nelle zone di controllo stabilite sono tenute a comunicare ogni settimana all'autorità competente i casi di mortalità osservati ogni giorno per gabbia.

Le aziende situate nelle zone di sorveglianza comunicano all'autorità competente ogni due settimane i casi di mortalità.

Inoltre, nelle zone istituite si effettuano ispezioni regolarmente nel corso dell'anno, con la frequenza indicata nella tabella 1. Tuttavia quando le condizioni climatiche rendano impossibili tali ispezioni per una parte dell'anno, gli Stati membri possono stabilire una frequenza di ispezione diversa nel relativo piano di intervento.

Tabella 1

Programma di sorveglianza ufficiale

| Ubicazione dell'azienda      | Numero minimo di ispezioni all'anno | Numero minimo di ispezione all'anno dopo la revoca della zona di controllo |
|------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Zona di controllo            | 12                                  |                                                                            |
| Zone di sorveglianza         | 6                                   | 6                                                                          |
| Zona di controllo temporaneo | 6                                   |                                                                            |

Il programma di sorveglianza si applica fino alla revoca delle zone.

- I.6.4. Le ispezioni, così come la selezione, il prelievo, la preparazione e la spedizione dei campioni hanno luogo secondo le disposizioni figuranti nella parte II, punti 1-4. L'esame dei campioni è effettuato secondo le modalità descritte nelle parti III-VI.

## II. Ispezione e prelievo di campioni

### II.1. Ispezione, selezione e prelievo di campioni in aziende in cui si sospetta la presenza di ISA

- II.1.1. Nel corso delle ispezioni regolari effettuate nell'ambito del programma ufficiale di sorveglianza descritto nella parte I.6 e nelle aziende in cui si sospetta il contagio dal virus dell'ISA, occorre ispezionare tutti gli impianti dell'azienda (gabbie, vasche e bacini) per verificare se siano presenti pesci morti, indeboliti o dal comportamento anormale. Se possibile, occorre esaminare i pesci morti da poco (non decomposti), deboli o dal comportamento anormale per la ricerca di segni clinici o risultanze post mortem connesse all'ISA, quali descritte nell'attuale edizione del manuale dell'OIE per la diagnosi delle malattie degli animali acquatici.
- II.1.2. Se si osservano segni clinici riferibili all'ISA o qualora un ispettore o un veterinario abbia motivo di sospettare che il pesce possa esserne contagiato, occorre prelevare un campione di almeno 10 pesci. Se possibile, il campione deve essere composto da pesci morti da poco, pesci indeboliti o dal comportamento anormale. Se il numero dei pesci che presentano segni clinici è insufficiente, occorre completare il campione con pesci sani prelevati dalle gabbie, vasche o bacini in cui sono stati constatati i tassi più elevati di mortalità o di pesci che presentano segni clinici della malattia.
- II.1.3. Qualora si riscontrino pesci morti da poco o indeboliti o dal comportamento anormale che non presentano segni clinici o risultanze post mortem riferibili all'ISA il campionamento non è obbligatorio, benché a discrezione dell'ispettore o del veterinario possano essere prelevati campioni per eseguire una diagnosi differenziale.

- II.1.4. Qualora si sospetti l'infezione da ISA nei salmoni selvatici, gli Stati membri provvedono al prelievo di campioni appropriati e li esaminano applicando i relativi metodi clinici o di laboratorio stabiliti nella parte II e nelle parti III-VI per escludere oppure confermare la presenza dell'ISA e per valutare se la presenza della malattia costituisca una minaccia significativa per i pesci di allevamento.

## II.2. Preparazione dei campioni

- II.2.1. I campioni per l'esame istologico devono essere prelevati esclusivamente da pesce appena soppresso, che presenta segni clinici o risultanze post mortem compatibili con la malattia. Occorre prelevare campioni di ogni lesione esterna o interna e in ogni caso da ciascun esemplare di pesce si asportano con un bisturi campioni di fegato, rene medio, cuore e milza, che vengono posti in una soluzione di formalina tamponata all'8-10 % (v/v). La proporzione di fissativo rispetto al tessuto deve essere di almeno 20:1 per garantire una conservazione soddisfacente dello stesso.
- II.2.2. Per l'esame virologico occorre prelevare tessuti da tutti i pesci del campione. A fini di verifica vengono prelevati campioni in doppio. Con uno strumento sterile si asportano dal pesce pezzi di fegato, di rene anteriore, di cuore e di milza che vengono posti in provette di plastica contenenti 9 ml di soluzione di trasporto, ossia un terreno di coltura cellulare con l'aggiunta di antibiotici. Si raccomanda un'associazione di 12, 5 µg ml<sup>-1</sup> fungizone, 200 UI ml<sup>-1</sup> polimixina B e 200 µg ml<sup>-1</sup> kanamicina, ma possono essere utilizzati anche altri antibiotici di provata efficacia. In una provetta contenente la soluzione di trasporto si possono raccogliere i tessuti prelevati da 5 pesci al massimo, che costituiscono un campione collettivo. In ogni campione il tessuto dovrebbe pesare  $1,0 \pm 0,5$  g.
- II.2.3. Per la prova IFAT occorre prelevare impronte di rene esclusivamente da pesce appena soppresso, ossia entro due ore al massimo dalla morte. Si asporta con uno strumento sterile un pezzo del rene medio del pesce; si asciuga il tessuto viene con carta assorbente per eliminare l'eccesso di sangue e si preme quindi ripetutamente su un vetrino ricoperto di polilisina, avendo cura che le diverse pressioni siano una accanto all'altra, senza sovrapposizioni, in modo da ottenere uno strato unico continuo di cellule. Per questa prova il sangue e i tessuti fluidi non sono materiale pertinente. Occorre evitare di lasciare che il campione di rene sgoccioli sulla carta assorbente perché si potrebbero formare coaguli che causerebbero il deposito di una grande quantità di proteine del siero sul vetrino. Se non sono fissate immediatamente, lasciare le impronte ad asciugare all'aria e quindi conservarle al freddo e al secco. Le impronte devono essere fissate entro 72 ore dal prelievo del campione dal pesce. In alternativa, dopo essere state fatte asciugare all'aria le impronte possono essere congelate e conservate per un mese al massimo alla temperatura di - 20 °C prima della fissazione.
- II.2.4. I pesci che presentano sintomi di anemia possono essere storditi e sottoposti immediatamente al prelievo di campioni di sangue con l'aggiunta di eparina da sottoporre ad esame ematologico, ad esempio per la misura dell'ematocrito.
- II.2.5. Per l'analisi con la tecnica RT-PCR occorre prelevare tessuti da tutti i pesci del campione. Con uno strumento sterile si asporta dal pesce un pezzo di rene anteriore o medio, che viene posto in una provetta da microcentrifuga contenente 1 ml di soluzione di conservazione dell'RNA di provata efficacia. In una provetta contenente la soluzione di conservazione si possono raccogliere i tessuti prelevati da 5 pesci al massimo, che costituiscono un campione collettivo. In ogni campione il tessuto dovrebbe pesare approssimativamente 0,5 grammi. Se i pesci sono troppo piccoli per ottenere un campione del peso richiesto, possono essere prelevati, nell'ordine, pezzi di rene, cuore, milza, fegato o cieco pilorico, per raggiungere il peso di 0,5 grammi.

## II.3. Spedizione dei campioni

- II.3.1. I campioni di sangue e le provette contenenti i tessuti di pesce per l'esame virologico o l'analisi RT-PCR sono posti in contenitori isolati (ad esempio scatole di polistirene con pareti spesse) con ghiaccio a sufficienza o blocchi di refrigerazione per mantenere al fresco i campioni durante il trasporto al laboratorio. Si deve evitare il congelamento e all'arrivo in laboratorio il contenitore deve contenere ancora del ghiaccio oppure uno o più dei blocchi di refrigerazione devono continuare ad essere del tutto o parzialmente congelati. In casi eccezionali i campioni destinati all'analisi RT-PCR e quelli destinati all'esame virologico possono essere surgelati e trasportati al laboratorio ad una temperatura di - 20 °C o inferiore.
- II.3.2. I vetrini destinati alla prova IFAT sono spediti in supporti contenenti una quantità di disidratante sufficiente a mantenere le impronte asciutte e fredde come sopra descritto.
- II.3.3. I tessuti di pesce trasportati in prodotto fissante per l'esame istologico devono essere contenuti in provette a tenuta stagna, collocate in contenitori resistenti agli urti, ad es. in scatole di polistirene a pareti spesse.

II.3.4. A meno che i campioni non siano stati congelati, l'esame virologico deve iniziare quanto prima, e comunque entro 72 ore dal prelievo dei campioni. Il secondo campione di verifica deve essere conservato ad una temperatura di - 20 °C o inferiore una volta arrivato in laboratorio.

II.3.5. Al laboratorio possono essere inviati anche pesci interi purché sia possibile rispettare i requisiti descritti nella parte II.3.1 per la temperatura durante il trasporto. I pesci interi devono essere avvolti in carta assorbente e quindi spediti in sacchetti di plastica, refrigerati come indicato sopra.

II.3.6. Si può anche inviare al laboratorio pesce vivo, ma solo sotto la supervisione del servizio ufficiale.

II.3.7. Per l'analisi RT-PCR di tessuti conservati in RNAlater, l'estrazione dell'RNA deve aver luogo entro un certo tempo che varia in funzione della temperatura di conservazione dei campioni. I tempi sono i seguenti:

|           |                  |
|-----------|------------------|
| — 37 °C   | un giorno        |
| — 25 °C   | una settimana    |
| — 4 °C    | un mese          |
| — - 20 °C | indefinitamente. |

II.3.8. L'imballaggio e l'etichettatura devono essere conformi alla normativa nazionale e internazionale in vigore in materia di trasporti.

#### II.4. Raccolta di ulteriore materiale diagnostico

Con l'accordo del laboratorio di diagnosi, possono essere prelevati e preparati altri tessuti dei pesci in vista di ulteriori esami.

### III. Esame virologico

#### III.1. Preparazione dei campioni

III.1.1. In caso di difficoltà pratiche che rendano impossibile inoculare le cellule entro 72 ore dalla raccolta dei campioni tissutali, è possibile congelare tali campioni alla temperatura di - 80 °C e conservarli al massimo per 28 giorni. Il tessuto può essere congelato e scongelato una sola volta prima dell'esame.

III.1.2. Ogni campione (campione tissutale collettivo nella soluzione di trasporto) viene completamente omogeneizzato con stomacher, miscelatore o mortaio e pestello e quindi centrifugato alla velocità di 2 000-4 000 x g per 15 minuti alla temperatura di 0-6 °C; il supernatante viene filtrato (0,45 µm) e incubato con pari volume di un gruppo di antisieri, opportunamente diluiti, dei sierotipi indigeni del virus dell'IPN. Il titolo dell'antisiero deve essere almeno di 1:2 000 in una prova di neutralizzazione delle placche al 50 %. La miscela è incubata per un'ora alla temperatura di 15 °C. Si ottiene così un inoculo.

Il trattamento di tutti gli inoculi con antisiero del virus dell'IPN (che in alcune parti d'Europa si manifesta nel 50 % dei campioni di pesce) serve a impedire che si sviluppino nelle colture cellulari inoculate effetti citopatogeni (CPE) provocati dal virus dell'IPN. Si riduce in tal modo la durata degli esami virologici, nonché il numero di casi in cui la comparsa di CPE dovrebbe essere considerata potenzialmente indicativa del virus dell'ISA.

Se i campioni provengono da unità di produzione considerate indenni da IPN, si può fare a meno di trattare gli inoculi con il relativo antisiero.

#### III.2. Inoculazione delle colture cellulari

III.2.1. Le cellule di rene anteriore di salmone (SHK-1) (con un numero di passaggi pari o inferiore ad 80) e le cellule TO sono coltivate in un medium L-15, con aggiunta di 5 % di siero bovino fetale, 2 % (v/v) 200 mM di L-glutamina e di 0,08 % (v/v) 50 mM di 2-mercaptoetanolo in piastre da 12 o da 24 pozzetti. Si possono usare altre linee cellulari di provata efficacia e sensibilità per l'isolamento del virus dell'ISA, tenendo conto della variabilità del ceppo e della capacità dei differenti ceppi a moltiplicarsi in diverse linee cellulari. La sospensione di organi trattata con antisiero è inoculata in colture cellulari giovani in rapido sviluppo, in modo da ottenere una diluizione finale del materiale tissutale nel terreno di coltura di 1:1 000. Per ogni sospensione di organi si aggiungono 40 µl di inoculo a ciascun pozzetto contenente 2 ml di terreno di coltura. Per ridurre al minimo i rischi di contaminazione incrociata si raccomanda di usare piastre separate da 12 o 24 pozzetti per i campioni di pesce provenienti da aziende diverse.

III.2.2. È opportuno lasciare una piastra di controllo negativo non inoculata. Si inocula quindi in una piastra separata un ceppo di riferimento del virus dell'ISA come controllo positivo, secondo le seguenti modalità. Nel primo pozzetto si inoculano 100 µl con la sospensione originale del ceppo di riferimento dell'ISA (titolo minimo 107 TCID<sub>50</sub> per ml) e si agita bene. Si trasferisce dal primo al secondo pozzetto un volume di questo materiale sufficiente per ottenere una diluizione di 1:10 e si mescola bene. Quest'operazione si ripete sulla piastra in modo da ottenere 6 diluizioni di 1:10. La sospensione originale del virus dell'ISA può essere conservata alla temperatura di -80 °C per almeno due anni, ma una volta scongelata deve essere usata entro tre giorni. Nota bene: occorre prendere ogni precauzione per evitare la contaminazione incrociata delle piastre di prova con materiale di controllo positivo. Per evitare tale rischio i controlli positivi devono essere allestiti e trattati separatamente dalle piastre di prova.

III.2.3. I campioni devono essere tenuti in incubazione per un periodo di quindici giorni al massimo alla temperatura di  $14 \pm 2$  °C.

### III.3. Microscopia

Esaminare le colture cellulari al microscopio per il controllo dell'effetto citopatico due volte: la prima 5-7 giorni e la seconda 12-14 giorni dopo l'inoculazione. Se si osserva un effetto citopatico in un campione, occorre iniziare immediatamente le procedure di identificazione del virus (III.6). Se non si osserva alcun effetto citopatico il 14° giorno, occorre procedere ad una prova di emoassorbimento (III.4).

### III.4. Emoassorbimento

Non sempre la moltiplicazione del virus dell'ISA nelle colture cellulari produce un effetto citopatico. Pertanto, occorre effettuare una prova di emoassorbimento in ciascun pozzetto, secondo le modalità sotto descritte, oppure, in alternativa, ogni pozzetto deve essere sottoposto ad un test di immunofluorescenza descritto nella parte III.6.1.

III.4.1. Da ciascun pozzetto, anche quelli riservati per i controlli positivo e negativo, si preleva un'aliquota di terreno di coltura cellulare e si mette in provette sterili etichettate. Ad ogni pozzetto si aggiungono 500 µl di una sospensione a 0,2 % (v/v) di globuli rossi di coniglio o cavallo lavati o di una sospensione a 0,05 % (v/v) di globuli rossi di salmone Atlantico o di trota arcobaleno lavati e si lascia in incubazione a temperatura ambiente per 45 minuti. Si rimuovono quindi i globuli rossi e si lava ogni pozzetto due volte con la soluzione L-15. Ogni pozzetto è esaminato al microscopio.

III.4.2. La presenza di gruppi di globuli rossi che aderiscono alla superficie delle cellule SHK-1 o alle cellule TO rivela una presunta infezione da orthomyxovirus. Se la prova di emoassorbimento è positiva occorre iniziare immediatamente la procedura di identificazione del virus (III.6).

### III.5. Subcoltura o passaggio

III.5.1. La subcoltura deve essere eseguita tra il tredicesimo e il quindicesimo giorno. Si aggiungono 225 µl di supernatante a pozzetti che contengono cellule SHK-1 fresche e in fase di rapido sviluppo in piastre da 12 pozzetti e si mettono ad incubare per diciotto giorni al massimo alla temperatura di  $14 \pm 2$  °C. Si esaminano le colture cellulari al microscopio per la ricerca dell'effetto citopatico due volte: la prima 5-7 giorni e la seconda 14-18 giorni dopo l'inoculazione. Se si osserva un effetto citopatico in un campione, occorre iniziare immediatamente la procedura di identificazione del virus (III.6). Se non si osserva alcun effetto citopatico tra il quattordicesimo e il diciottesimo giorno, occorre procedere ad una prova di emoassorbimento (III.4).

III.5.2. Se nei primi 7 giorni di incubazione si osserva un effetto citotossico, si esegue una subcoltura in questa fase, ma le cellule devono essere incubate per 14-18 giorni e nuovamente subcoltivate, con un'ulteriore incubazione per altri 14-18 giorni. Se l'effetto citotossico si presenta dopo 7 giorni si procede alla subcoltura una sola volta e le cellule sono incubate in modo da raggiungere in totale 28-36 giorni di incubazione dall'inoculazione iniziale.

III.5.3. Se nella coltura iniziale si verifica una contaminazione batterica occorre rifare la prova utilizzando il tessuto omogeneizzato conservato a -80 °C. Prima dell'inoculazione il tessuto omogeneizzato è centrifugato alla velocità di  $4\,000 \times g$  per 30 minuti ad una temperatura compresa tra 0 e 6 °C e il supernatante è filtrato a 0,22 µm. Se durante la subcoltura si verifica una contaminazione batterica, occorre filtrare il supernatante a 0,22 µm, inocularlo quindi in cellule fresche e lasciarlo incubare per un nuovo periodo di 14-18 giorni.

### III.6. Test di identificazione del virus

Se in qualsiasi fase si osserva un effetto citopatico o se la prova di emoassorbimento risulta positiva occorre procedere all'identificazione del virus. I metodi da applicare per l'identificazione del virus dell'ISA sono l'immunofluorescenza (IF) (descritta nella parte III.6.1.) e la trascrittasi inversa (RT-PCR) (descritta nella parte IV). Se si ritiene che siano presenti altri virus si raccomanda di procedere a prove supplementari di identificazione dei virus. Se i test non hanno permesso un'identificazione definitiva del virus entro una settimana, il supernatante dev'essere inviato, per l'identificazione immediata, ad un laboratorio nazionale di riferimento o al laboratorio comunitario di riferimento per le malattie dei pesci.

#### III.6.1. Immunofluorescenza (IF)

III.6.1.1. Le cellule SHK-1 (passaggio 80 o inferiore) o TO sono coltivate in un terreno L-15, con aggiunta di 5 % di siero bovino fetale, di 2 % (v/v) 200 mM di L-glutamina e di 0,08 % (v/v) 50 mM 2-mercaptoetanolo in piastre da 24 o da 96 pozzetti e usate ad una densità che conduca ad una confluenza del monostrato superiore al 50 %. Si possono usare anche altre linee cellulari o terreno di coltura di provata efficacia. Aggiungere 225 µl di supernatante della coltura che si presume infettata dal virus in due pozzetti, mescolare e trasferire altri 225 µl in altri due pozzetti in modo da ottenere una diluizione di 1:5. Lasciare altri due pozzetti senza inoculazione per controllo. I campioni provenienti da ciascuna azienda acquicola devono essere trattati in piastre separate, come pure il controllo del virus. Il controllo del virus si effettua rispetto a un isolato di riferimento del virus dell'ISA.

III.6.1.2. Le piastre devono essere tenute in incubazione per un periodo di 7 giorni al massimo alla temperatura di  $14 \pm 2$  °C ed osservate al microscopio. Qualora si osservi un effetto citopatico precoce oppure non si osservi alcun effetto citopatico entro sette giorni, occorre procedere alla fissazione. Dopo aver sciacquato i pozzetti con il tampone PBS fissare mediante incubazione con acetone all'80 % per 20 minuti a temperatura ambiente. Lasciare asciugare le piastre all'aria e colorarle immediatamente oppure conservarle alla temperatura di 0-6 °C per non più di 24 ore prima di aggiungere il colorante.

III.6.1.3. Colorare le coppie di pozzetti con anticorpo monoclonale del virus dell'ISA 3H6F8 o con un altro anticorpo monoclonale di provata efficacia e specificità, diluire in soluzione tampone PBS e incubare per 30 minuti alla temperatura di  $37 \pm 4$  °C. Rimuovere l'anticorpo monoclonale e sciacquare le piastre tre volte con aggiunta di Tween-20 a 0,05 % in tampone PBS. Aggiungere a ciascun pozzetto immunoglobuline antitopo coniugate con isotiocianato di fluoresceina (FITC), diluito in tampone PBS, e incubare per 30 minuti alla temperatura di  $37 \pm 4$  °C. Nota bene: ogni laboratorio deve ottimizzare le diluizioni delle varie partite di anticorpo monoclonale e di coniugato FITC. Rimuovere l'anticorpo e sciacquare le piastre tre volte con aggiunta di Tween-20 a 0,05 % in tampone PBS.

III.6.1.4. Esaminare immediatamente i pozzetti utilizzando un microscopio a fluorescenza rovesciato dotato di un filtro idoneo per l'eccitazione del FITC. Il test è considerato positivo se si osservano cellule fluorescenti. Perché il test sia valido, i controlli positivi devono dare risultato positivo e i controlli negativi risultato negativo.

### IV. Esame dei campioni mediante RT-PCR

IV.1. La presente sezione descrive le procedure richieste per l'amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi di parte del segmento 8 del genoma dell'ISAV che può essere effettuata su tessuto del pesce o in coltura del virus

#### IV.1.1. Estrazione dell'RNA

a) Rimuovere il reagente RNAlater da ogni campione. Aggiungere 1 ml di acqua distillata trattata con DEPC in ogni provetta e centrifugare le provette a 13 000 giri per 5 minuti alla temperatura di 0-6 °C.

b) Togliere il supernatante da ogni campione e aggiungere 800 µl di TRIzol (Invitrogen) — o un altro reagente di cui sia comprovata un'efficacia almeno equivalente o superiore — ad ogni campione e ad una provetta di controllo contenente idoneo materiale di controllo (400 µl dH<sub>2</sub>O o omogeneizzato di rene di pesce indenne dal patogeno specifico). Se necessario occorre smembrare i tessuti con ripetute pipettature. Incubare le provette a temperatura ambiente per 5 minuti. Aggiungere 160 µl di cloroformio in ogni provetta e scuotere vigorosamente le provette per tre minuti, quindi centrifugarle a 13 000 giri per 15 minuti alla temperatura di 0-6 °C.

c) Pipettare lo strato superiore acquoso in una provetta da microcentrifuga contenente 500 µl di isopropanolo e incubare le provette per dieci minuti a temperatura ambiente, quindi centrifugarle a 6 500 giri per 15 minuti alla temperatura di 0-6 °C.

- d) Rimuovere il supernatante e aggiungere 1 ml di etanolo a 75 % al pellet di RNA. Centrifugare quindi le provette a 6 500 giri per 5 minuti alla temperatura di 0-6 °C.
- e) Rimuovere il supernatante e lasciare le provette aperte per circa tre minuti in modo da lasciar evaporare l'etanolo residuo. Aggiungere 15 µl di acqua distillata trattata con DEPC in modo da risospendere il pellet agitando brevemente su vortex se necessario.
- f) Per calcolare la concentrazione dell'RNA e la purezza dei campioni usare uno spettrofotometro. Le densità ottiche sono misurate a 260 e 280 nm.
- g) L'RNA che deve essere usato immediatamente (lo stesso giorno) può essere temporaneamente conservato alla temperatura di 0-6 °C. L'RNA non utilizzato deve essere conservato a - 80 °C.

#### IV.1.2. Transcrittasi inversa (RT)

- a) Diluire 2 µg di RNA in acqua distillata con aggiunta di DEPC in provette da microcentrifuga da 1,5 ml. Se la concentrazione di RNA presente in un campione è troppo bassa per poter utilizzarne 2 µg nella reazione RT, occorre utilizzare l'aliquota più alta possibile di RNA. Incubare l'RNA diluito per 10 minuti alla temperatura di 55-60 °C.
- b) Mettere le provette contenenti RNA su un letto di ghiaccio e aggiungere i reagenti per la RT, in modo da ottenere concentrazioni finali di 1x tampone, 1mM di dNTP, 100 ng di esameri casuali, 20 U di inibitore della RNasi e 200 U MMLV-RT in un volume complessivo di 20 µl.
- c) Incubare le provette a 37 °C per un'ora.
- d) Conservare il cDNA alla temperatura di 0-6 °C per il tempo necessario e usarlo quanto prima per la PCR.

#### IV.1.3. REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI (PCR)

- a) Aggiungere 5 µl di cDNA a 45 µl di preparato per PCR per ottenere concentrazioni finali di 1x tampone, 1,5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM di ciascun dNTP, 25 pmol di ciascun primer e 1U di Taq polimerasi. I primer sono ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (primer senso) e ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (primer non senso). Occorre eseguire controlli negativi nelle fasi dell'estrazione, della RT e della PCR.
- b) Inserire le provette in un termociclatore programmato alla temperatura di 94 °C per 5 minuti, e compiere quindi 35 cicli di 1 minuto a 94 °C, a 55 °C per 1 minuto e a 72 °C per 1 minuto con un'incubazione finale a 72 °C per 5 minuti.
- c) I risultati della PCR si devono valutare dopo l'elettroforesi su gel di agarosio (2 %) colorato con bromuro di etidio e usando marcatori di riferimento a fianco dei campioni e i controlli negativi delle fasi della RT e della PCR. Un solo prodotto della PCR di 155 pb è considerato indicativo della presenza di RNA del virus dell'ISA. Anche i campioni contenenti un solo prodotto supplementare, di 310 pb, sono da considerarsi indicativi della presenza di RNA del virus dell'ISA. I campioni dai quali si ottengono molteplici prodotti PCR, compreso almeno uno di approssimativamente 155 pb, possono contenere RNA del virus dell'ISA. Si possono eseguire ulteriori indagini ricorrendo a sonde di DNA o al sequenziamento del nucleotide.

#### IV.1.4. Conferma dell'isolato del virus dell'ISA attraverso PCR in coltura tissutale

Se durante l'esame virologico si è verificato appieno l'effetto citopatico nei campioni tissutali di cellule SHK-1, occorre togliere dal pozzetto 400 µl di supernatante e trasferirlo in una provetta sterile da 1,5 ml. Estrarre l'RNA da questo campione come descritto nella parte III.1 ed eseguire la RT-PCR. Se si usano colture che non presentano un effetto citopatico completo, occorre rimuovere il supernatante, raschiare le cellule dalla superficie del pozzetto o bottiglia e trasferirle in una provetta sterile da 1,5 ml per l'estrazione dell'RNA e l'esecuzione della RT-PCR.

#### IV.1.5. Conferma dei prodotti della PCR con la sonda di DNA

- a) La specificità di un prodotto PCR di 155 pb può essere valutata attraverso una prova con un oligonucleotide che ibrida in una regione del prodotto PCR, all'interno dei primer. I prodotti della PCR devono essere sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio all'1 % con marcatori di dimensioni, nonché a un controllo positivo e ai controlli negativi a partire dalle fasi RT e PCR.

- b) Con la tecnica Southern blot si fa aderire del DNA su una membrana e, dopo idonee fasi di pre-bridazione, si mette ad incubare insieme alla membrana l'oligonucleotide etichettato (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3').
- c) Si sciacquano dalla membrana le sonde non coniugate o coniugate in modo non specifico e si visualizzano le sonde coniugate.
- d) L'accoppiamento della sonda a un frammento di 155 pb (e di 310 pb se presente) comprova la specificità della PCR che indica che nel campione era presente RNA del virus dell'ISA.

#### IV.1.6. Sequenziamento dei nucleotidi dei prodotti della PCR

La specificità della PCR può essere valutata esaminando la sequenza del nucleotide del prodotto della PCR di 155 pb.

- a) Il prodotto della PCR deve essere purificato dal gel di agarosio o dalla soluzione.
- b) Si procede al sequenziamento del frammento utilizzando gli stessi primer della PCR oppure primer vettori se sono stati clonati in un vettore prima del sequenziamento.
- c) La sequenza del nucleotide deve essere comparata con quelle del segmento 8 del virus dell'ISA disponibile nella banca dati delle sequenze dei nucleotidi EMBL (numeri di accesso Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) La presenza di una sequenza che corrisponde a quella del segmento 8 dell'ISAV costituisce la prova che il campione conteneva RNA del virus dell'ISA.

### V. Esame delle impronte di rene mediante IFAT

#### V.1. È stato stabilito il seguente protocollo per l'esame delle impronte di rene mediante IFAT

#### V.2. Preparazione e colorazione delle impronte

V.2.1. Fissare i vetrini in acetone o metanolo/acetone (1:1) per 3 minuti e asciugare all'aria. Prima di colorarlo, esaminare ogni vetrino e delimitare le relative regioni con una penna ImmEdge™ o simili e far asciugare all'aria. Porre quindi i vetrini in una soluzione bloccante (6 % di latte scremato in soluzione PBS contenente Tween 20 a 0,2 %) ed incubare agitando dolcemente per 30 minuti a temperatura ambiente. Far sgocciolare ciascun vetrino e collocarlo orizzontalmente in una scatola contenente carta sottile bagnata per mantenere un'atmosfera umida.

V.2.2. Coprire ciascuna impronta con una soluzione di anticorpo monoclonale del virus dell'ISA 3H6F8 (o con un altro anticorpo monoclonale di provata efficacia e specificità), chiudere la scatola dei vetrini e incubare agitando per 60 minuti a temperatura ambiente. Di norma l'anticorpo presenta una diluizione compresa tra 1:10 e 1:100 in 1 % di latte scremato ma è necessario determinare l'effettiva diluizione per ogni lotto. Lavare i vetrini tre volte per due minuti in PBS con l'aggiunta di Tween 20 a 0,1 %. Coprire ogni impronta con una soluzione contenente coniugato FITC prodotto su capra anti-topo, diluito in proporzione di 1:1 000 in 1 % di latte scremato e incubare in ambiente umido per 60 minuti a temperatura ambiente. Lavare i vetrini tre volte per due minuti in PBS con l'aggiunta di Tween 20 a 0,1 %. Coprire ciascuna impronta con una soluzione di Citifluor™ (500 µl Citifluor™ mescolata con 1,5 ml (v/v) Tween 20 a 0,1 % in PBS) o altra soluzione di montaggio adeguata per dieci minuti. Lavare i vetrini tre volte in PBS con l'aggiunta di Tween 20 a 0,1 %. Se è necessaria una colorazione di contrasto, coprire ogni impronta con ioduro di propidio (0,01 mg/ml) in soluzione di PBS contenente 0,1 % di Tween 20 e incubare 3 minuti a temperatura ambiente. Lavare i vetrini tre volte per due minuti in PBS con l'aggiunta di 0,1 % Tween 20. Far sgocciolare i vetrini e montarli in una soluzione Citifluor™ o altra soluzione di montaggio adeguata. Conservare i vetrini al buio alla temperatura di 4 °C di prima dell'esame al microscopio.

#### V.3. Esame con il microscopio a fluorescenza

Esaminare ogni vetrino in un microscopio a illuminazione epifluorescente utilizzando un filtro capace di stimolare il FITC causando la caratteristica emissione di verde fosforescente. È opportuno osservare tutti i campi racchiusi nelle regioni delimitate con la penna ImmEdge™ con obiettivi x10 e x20 ed esaminare ulteriormente le aree sospette (quelle che presentano la fluorescenza di color verde) con un obiettivo x40 e un'illuminazione a contrasto di fase/fluorescenza in modo da accertarsi che la colorazione fluorescente sia associata alla cellula. Registrare le coordinate delle regioni sospette per una conferma ulteriore della natura della fluorescenza da parte di un secondo analista. Dopo essere stati analizzati da un primo analista, i vetrini positivi o sospetti devono essere esaminati da un secondo analista che dovrà confermare i risultati.

**V.4. Controlli**

V.4.1. Ogni lotto di vetrini colorati per l'analisi IFAT deve essere sottoposto a tre tipi di controlli:

- impronta di rene di salmone atlantico non infetto (controllo negativo),
- coltura cellulare di SHK-1 non infette o altra coltura cellulare sensibile (controllo negativo),
- coltura cellulare di SHK-1 infettate dal virus dell'ISA o altra coltura cellulare sensibile (controllo positivo).

V.4.2. Se disponibile, si raccomanda un secondo controllo positivo con un'impronta di rene di salmone atlantico infettato dal virus dell'ISA.

V.4.3. Se un controllo negativo dà risultati positivi, la prova è invalidata per tutti i vetrini del lotto. Se tutti i vetrini di un dato lotto, compresi i controlli positivi, sono negativi, la prova è invalidata per tutti i vetrini del lotto. Nei casi in cui la mancata riuscita dei controlli invalida un intero lotto di vetrini, occorre distruggere tutti i vetrini ed effettuare una nuova prova utilizzando il duplicato delle impronte.

**V.5. Esame di altri tessuti**

Si applica questa tecnica ad altri tessuti dei pesci, come il fegato, la milza e il cuore, a condizione che possa essere depositata sul vetrino una quantità ragionevole di cellule endoteliali, di leucociti o linfociti. La procedura di colorazione rimane la stessa per ogni tessuto, benché per certi tessuti sia preferibile non ricorrere alla colorazione con ioduro di propidio, ma basarsi sull'illuminazione a contrasto di fase per identificare i tipi di cellule presenti nell'impronta.

**VI. Istologia**

Tagliare sezioni ricoperte di paraffina a 5 µm e colorarle con ematossilina e eosina. I cambiamenti istologici associati all'ISA sono descritti nell'ultima edizione del manuale di diagnosi delle malattie degli animali acquatici dell'OIE.

**VII. Acronimi e abbreviazioni**

|                    |                                                                |
|--------------------|----------------------------------------------------------------|
| cDNA               | Acido desossiribonucleico complementare                        |
| CPE                | Effetto citopatico                                             |
| DEPC               | Dietilpirocarbonato                                            |
| dNTP               | Deossinucleotide trifosfato                                    |
| FITC               | Isotiocianato di fluoresceina                                  |
| IF                 | Immunofluorescenza                                             |
| IFAT               | Test degli anticorpi a fluorescenza indiretta                  |
| IPN(V)             | Necrosi pancreatica infettiva (virus)                          |
| ISA(V)             | Anemia infettiva del salmone (virus)                           |
| OIE                | Ufficio internazionale delle epizootie                         |
| PBS                | Soluzione salina tamponata con fosfato                         |
| RNA                | Acido ribonucleico                                             |
| RT-PCR             | Reazione a catena della polimerasi- trascrittasi inversa       |
| SHK-1              | Rene anteriore di salmone (linea cellulare)                    |
| DICT <sub>50</sub> | Dose virale in grado di infettare 50 % delle colture tissutali |

---