

32003D0466

2003 6 25

EUROPOS SAJUNGOS OFICIALUSIS LEIDINYS

L 156/61

KOMISIJOS SPRENDIMAS

2003 m. rugpjūčio 28 d.

dėl zonavimo ir savanoriškos priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus infekcinės lašišų anemijos (ILA) buvimą, kriterijų nustatymo

(pranešta dokumentu Nr. C(2003) 1831)

(tekstas svarbus EEE)

(2003/466/EB)

EUROPOS BENDRIJŲ KOMISIJA,

atsižvelgdama į Europos bendrijos steigimo sutartį,

atsižvelgdama į 1991 m. sausio 28 d. Tarybos direktyvą 91/67/EEB dėl gyvūnų sveikatos reikalavimų, reglamentuojančių akvakultūros gyvūnų ir jų produktų teikimą į rinką ⁽¹⁾, su paskutiniaisiais pakeitimais, padarytais Reglamentu (EB) Nr. 806/2003 ⁽²⁾, ir ypač į jos 15 straipsnį,

atsižvelgdama į 1993 m. birželio 24 d. Tarybos direktyvą 93/53/EB dėl minimalių Bendrijos tam tikrų žuvų ligų kontrolės priemonių nustatymo ⁽³⁾ su paskutiniaisiais pakeitimais, padarytais Komisijos sprendimu 2001/288/EB ⁽⁴⁾, ir ypač į jos 5 straipsnio 2 dalį ir 6 straipsnį,

kadangi:

(1) Direktyva 93/53/EEB nustato, kad mėginių ėmimas ir I ir II sąrašo ligų (nurodytų Direktyvos 91/67/EEB A priede) laboratorinis tyrimas atliekamas, taikant metodus, patvirtintus pagal Direktyvos 91/67/EEB 15 straipsnį.

(2) Mėginių ėmimo planai ir II sąrašo žuvų ligų virusinės hemoraginės septicemijos (VHS) ir infekcinės hemapoeitinės nekrozės (IHN) aptikimo ir patvirtinimo diagnostiniai metodai yra nustatyti Komisijos sprendime 2001/183/EB ⁽⁵⁾.

(3) Kaip numatyta Direktyvos 93/53/EEB 5 straipsnio 2 dalyje ir 6 straipsnyje, to paties vandens nuotėkio baseino ploto arba pakrantės zonos visų ūkių atveju įtarus arba patvirtinus ūkio užkrėtimą infekcinės lašišų anemijos (ILA) virusu, vykdoma viešoji priežiūra. Reikėtų nustatyti zonavimo ir savanoriškos priežiūros kriterijus.

(4) Kai dėl mėginių ėmimo planų ir diagnostinių metodų, taikomų aptikti ir patvirtinti ILA, apibrėžimo ir zonavimo ir valstybinės priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus ILA, kriterijų nustatymo, buvo konsultuojamasi su žuvų sveikatos ir laboratorinės analizės ekspertais. Be to, būtina atsižvelgti į ILA diagnozės rekomendacijas, nustatytas Tarptautinio epizootijų biuro (OIE) *Vandens gyvūnų ligų diagnozės vadovo* dabartiniame leidime.

(5) Reikėtų numatyti pakankamą laiko periodą dėl šių naujų reikalavimų įgyvendinimo.

(6) Šiame sprendime numatytos priemonės atitinka Maisto grandinės ir gyvūnų sveikatos nuolatinio komiteto nuomonę,

PRIĖMĖ ŠĮ SPRENDIMĄ:

1 straipsnis

Mėginių ėmimo planai ir diagnostiniai metodai, taikomi aptikti ir patvirtinti infekcinę lašišų anemiją (ILA) ir zonavimo ir oficialios valstybinės priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus ILA, kriterijai yra nustatyti šio sprendimo priede.

2 straipsnis

⁽¹⁾ OL L 46, 1991 2 19, p. 1.

⁽²⁾ OL L 122, 2003 5 16, p. 1.

⁽³⁾ OL L 175, 1993 7 19, p. 23.

⁽⁴⁾ OL L 99, 2001 4 10, p. 11.

⁽⁵⁾ OL L 67, 2001 3 9, p. 65.

Šis sprendimas taikomas nuo 2003 m. spalio 23 d.

3 straipsnis

Šis sprendimas skirtas valstybėms narėms.

Priimta Briuselyje, 2003 m. birželio 13 d.

Komisijos vardu

David BYRNE

Komisijos narys

PRIEDAS

Mėginių ėmimo planai ir diagnostiniai metodai, taikomi aptikti ir patvirtinti infekcinę lašišų anemiją (ILA) ir zonavimo ir savanoriškos priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus ILA, kriterijai

IVADAS IR SĄVOKŲ APIBRĖŽIMAI

Šiame priede:

- a) numatytos mėginių ėmimo ir diagnostinių metodų, taikomų aptikti ir patvirtinti ILA buvimą, rekomendacijos ir minimalūs reikalavimai;
- b) sujungiamos Direktyvos 91/67/EEB ir Direktyvos 93/53/EEB nuostatos ir sąvokų apibrėžimai;
- c) išvardinamos nuostatos dėl atitinkamos ILA diagnozės, kontrolės ir priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus ILA;
- d) yra tiesiogiai skirtas valdžios institucijoms, atsakingoms už ILA kontrolę, taip pat laboratorijos personalui, atliekančiam su šia liga susijusius tyrimus. Todėl ypač pabrėžiama mėginių ėmimo tvarka, laboratorinių tyrimų principai ir jų taikymas, bei jų metu gautų rezultatų vertinimas ir laboratorinių metodų išsamus aprašymas. Tačiau tam tikrais atvejais laboratorija gali taikyti pakeistus, šiame priede apibūdintus tyrimus arba naudoti kitokius tyrimus, jeigu bus pasiektas lygiavertis jautrumas ir specifiškumas. Be to, yra nustatyti zonavimo ir savanoriškos priežiūros, įtarus arba patvirtinus ILA, kriterijai. Šiame priede taikomi šie papildomi sąvokų apibrėžimai:

„Vandens nuotėkio baseino plotas“ visas nuotėkio baseino plotas tarp vandentakio ištakų ir žiočių arba nuotėkio baseino dalis tarp vandentakio ištakų ir natūralių ar dirbtinių užtvartų, stabdančių žuvų migraciją.

„Kranto zona“ kranto arba jūros vandens ploto arba žiočių dalis, turinti aiškias geografines ribas ir sudaryta iš vienarūšės hidrodinaminės sistemos arba tokių pasikartojančių sistemų.

I dalis nustato ILA diagnozės ir patvirtinimo bendruosius principus ir kriterijus ir zonavimo ir savanoriškos priežiūros, vykdomos, įtarus arba patvirtinus ILA, kriterijus.

II dalis nurodo patikrinimus ir mėginių ėmimą, atliekamą, norint aptikti ILA buvimą.

III dalis nustato virusologinio tyrimo metodus.

IV dalis pateikia mėginių tyrimo RT-PCR metodu, taikomo ILA aptikimui, tvarką.

V dalyje aprašoma inkstų preparatų atspaudų tyrimo IFAT metodika ILA atveju.

VI dalyje pateikiama histologinio tyrimo metodologija.

VII dalyje nurodomi vartojami akronimai ir sutrumpinimai.

I. ILA diagnozės, zonavimo, tam tikrų kontrolės priemonių ir viešosios priežiūros kriterijai**I.1. ILA diagnozės bendrieji principai**

Įtarimo dėl žuvų užkrėtimo ILAV pagrindimas pateikiamas šio priedo I.2. dalyje. Valstybės narės užtikrina, kad įtarus ūkyje veisiamų žuvų užkrėtimą ILAV, ir siekiant patvirtinti arba paneigti ligos buvimą, nedelsiant pradedamas viešasis tyrimas, atliekant patikrinimus ir klinikinius tyrimus ir imant mėginius, juos atrenkant ir taikant laboratorinės analizės metodus, kaip nustatyta šio priedo III–VI dalyse. Kai dėl ILA buvimą viešo patvirtinimo, tai laikomasi vieno iš trijų kriterijų rinkinių, nustatytų šio priedo I.3. dalyje.

I.2. Infekcijos ILA įtarimas

I.2.1. ILA buvimas įtariamas, jei atitinkamas bent vienas iš šių kriterijų:

- a) pomirtinio tyrimo rezultatai įrodo ILA, esant arba nesant ligos klinikinių požymių. Pomirtinio tyrimo rezultatai ir ligos klinikiniai požymiai atitinka nustatytuosius, pateikiamus Tarptautinio epizootijų biuro (OIE) *Vandens gyvūnų ligų diagnozės vadovo* dabartiniame leidime;
- b) ILAV išskiriamas ir identifikuojamas ląstelių kultūroje, gautoje iš pavienio mėginio, paimto iš bet kurios ūkyje veisiamos žuvies, kaip aprašyta III dalyje;

- c) ILAV buvimas patvirtinamas, atliekant du nepriklausomus laboratorinius testus, tokius kaip RT-PCR (IV dalis) ir IFAT (V dalis);
- d) gyvos žuvys pergabenamos į ūkį, kuriame pagrįstai įtariamas ILA buvimas žuvų pergabenimo metu;
- e) tyrimo metu nustatoma kita glaudi epizootinė sąsaja su ūkiais, kuriuose įtariamas arba patvirtintas ILA buvimas.

1.2.2. ILA buvimas įtarimas paneigiamas, jei tęstinių tyrimų, trukusių šešis mėnesius, metu, atliekant bent vieną klinikinę apžiūrą kartą per mėnesį, negaunama esminių ILA buvimą įrodymų.

1.3. ILA patvirtinimas

ILA buvimas laikomas patvirtintu, jei atitinkami a, b ir c punktų kriterijai:

- a) klinikiniai požymiai ir pomirtinio tyrimo rezultatai atitinka nustatytuosius, pateikiamus Tarptautinio epizootijų biuro (OIE) *Vandens gyvūnų ligų diagnostikos vadovo* dabartiniame leidime, įskaitant negyvas, sergančias ar neįprastos elgsenos žuvis, anemijos požymius, kitus pomirtinio tyrimo rezultatus ir stebimus patologinius pokyčius ir ILAV yra aptinkamas, taikant vieną ar kelis šiuos metodus:
 - i) ILAV išskyrimas ir identifikavimas ląstelių kultūroje, gautoje iš pavienio mėginio, paimto iš bet kurios ūkyje veisiamos žuvies, kaip aprašyta III dalyje;
 - ii) ILAV aptikimas RT-PCR metodu, kaip aprašyta IV dalyje;
 - iii) ILAV aptikimas audiniuose arba audinių preparatuose, naudojant antikūnus, specifiskus ILAV (pvz., atliekant inkstų preparatų atspaudų IFAT, aprašytą V dalyje);
- b) ILAV išskyrimas ir identifikavimas dviejuose mėginiuose, paimtuose iš vienos ar daugiau ūkyje veisiamų žuvų, atskirais atvejais metodu, aprašytu III dalyje;
- c) ILAV išskyrimas ir identifikavimas mažiausiai viename mėginyje, paimtame iš bet kurios ūkyje veisiamos žuvies, taikant metodą, aprašytą III dalyje ir ILAV buvimą bet kurios ūkyje veisiamos žuvies audinių preparatuose įrodymas arba RT-PCR (IV dalis arba IFAT metodu (V dalis).

1.4. Kontroluojamųjų ir savanoriškos priežiūros zonų įsteigimo ir panaikinimo, įtarus ir patvirtinus ILA, kriterijai

1.4.1. Parengdamos riziką pagrįstą savanoriškos priežiūros programą, valstybės narės įsteigia atitinkamas kontroliuojamąsias ir priežiūros zonas netoli ūkio, viešai įtariamo arba pripažinto užkrėsto ILA.

1.4.2. Įsteigtos zonos apibrėžiamos pagal rizikos veiksnių kiekvienu atveju analizę dėl paskesnės ligos plitimo. Atsižvelgiant į epidemiologinę situaciją, vandens nuotėkio baseino plotas arba atitinkama pakrantės zona:

- nėra apibrėžiama kaip kontroliuojamoji zona arba
- didelis vandens nuotėkio baseino plotas ar pakrantės zonos gali būti skirstomos į kontroliuojamąją ir priežiūros zoną, jei nesusitariama dėl ILA plitimo prevencijos.

Be to, papildomos priežiūros zonos gali būti įsteigiamos už vandens nuotėkio baseino ar pakrantės zonos ribų.

1.4.3. Pagrindiniai veiksniai, kurie apsvarstomi, prieš įsteigiant pirmiau nurodytas zonas, yra veiksniai, darantys įtaką ligos plitimui ūkiuose veisiamų ir laukinių žuvų tarpe rizikos veiksniams, tokiems kaip: žuvų, veisiamų ūkyje, kuriame įtariama arba patvirtinta ILA infekcija, mirčių skaičius, laipsnis ir paplitimas; mirtingumo nurodytame ūkyje priežastis; atstumas tarp ūkių ir kaimynystėje esančių ūkių išsidėstymo tankis; ūkiai, su kuriais palaikomi ryšiai; ūkyje veisiamų žuvų rūšys; užkrėsto ir kaimyninių ūkių valdymas; hidrodinaminės sąlygos ir kiti epizootinės reikšmės veiksniai, identifikuojami, atliekant epizootinį tyrimą pagal Direktyvos 93/53/EEB 5 straipsnio 2 dalį ir 8 straipsnį.

I.4.4. Zonų įsteigimui taikomi šie mažiausi kriterijai.

I.4.4.1. „Kontroliuojamąją zoną“ įsteigia valstybė narė ūkio, įtariamo užkrėsto ILAV, kaimynystėje:

- pakrantės zonoje: plote, kurio apskritimo spindulys siekia mažiausiai vieną potvynio zoną arba 5 km, esančiame ūkyje, patvirtintame pagal užkrėtimą ILAV arba lygiaverčiame plote, nustatyta pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epizootinius duomenis,
- vidaus zonoje: ūkio, patvirtinto pagal užkrėtimą ILAV, viso vandens nuotėkio baseino plote; didelio vandens nuotėkio baseino ploto atveju valstybė narė gali apriboti zonos skirstymą į dalis, jei nesutariama dėl ILA plitimo prevencijos.

I.4.4.2. „Laikinoji kontroliuojamoji zona“ įsteigiama, įtarus ILA buvimą, pagal tuos pačius kriterijus, kuriais buvo vadovaujama, įsteigiant kontroliuojamąją zoną.

I.4.4.3. „Priežiūros zoną“ valstybė narė įsteigia, jei būtina, už kontroliuojamosios zonos ribų ten, kur nereikia atlikti intensyvią priežiūrą ir ši zona atitinka:

- pakrantės zonoje: plotą, apsupantį kontroliuojamąją zoną, sudarytą iš potvynio zonų, plotą, apsupantį kontroliuojamąją zoną, kurios spindulys nuo kontroliuojamosios zonos arba lygiaverčio ploto, nustatyto pagal atitinkamus hidrodinaminius ar epidemiologinius duomenis, centro siekia 10 km, arba
- vidaus zonoje: jei būtina, didelį plotą, esantį už įsteigtos kontroliuojamosios zonos ribų.

I.5. Žuvivaisos veiklos sustabdymas ir įsteigtų zonų panaikinimas

I.5.1. Valstybės narės kompetentinga institucija užtikrina, kad visuose ūkiuose, esančiuose kontroliuojamoje zonoje, žuvivaisos veikla sustabdoma atitinkamą laikotarpį, pašalinus visus žuvų išteklius ir atlikus dezinfekavimą, jei būtina. Žuvivaisos laikotarpio trukmę kituose ūkiuose, esančiuose kontroliuojamoje zonoje, nustato kompetentinga institucija, atlikusi įvertinimą kiekvienu atveju. Pašalinus visus žuvų išteklius iš ūkių, taikomas šešių savaičių trukmės žuvivaisos sustabdymo laikotarpis.

Be to, kompetentinga institucija gali priimti sprendimą dėl žuvivaisos veiklos sustabdymo ūkiuose, esančiuose priežiūros zonoje.

I.5.2. Įsteigtos kontroliuojamosios zonos gali būti nepanaikinamos ir žuvų ištekliai gali būti neatnaujinami iki tol, kol iš visų ūkių, esančių zonoje, nebus pašalinti žuvų ištekliai, ūkiai nebus dezinfekuojami, jei būtina, ir žuvivaisos veikla nebus sustabdyta pagal I.5.1 punktą. Kai žuvų ištekliai atnaujinami zonoje, kontroliuojamoms zonoms galima suteikti priežiūros zonų statusą, kaip nustatyta I.4.4.3 punkte.

I.5.3. Įsteigtos laikinosios kontroliuojamosios zonos gali būti nepanaikinamos, kol neatmetamas ILA įtarimas pagal I.2.2 dalį. Patvirtinus ILA pagal I.3 dalį, laikinosios kontroliuojamosios zonos statusas gali būti pakeičiamas kontroliuojamosios zonos statusu.

I.5.4. Įsteigtos priežiūros zonos gali būti nepanaikinamos dvejus metus po kontroliuojamosios zonos panaikinimo.

I.6. Savanoriška priežiūra, atliekama, įtarus arba patvirtinus ILA

I.6.1. Darant nuorodą į Direktyvos 93/53/EEB 5 straipsnio 2 dalį ir 6 straipsnį ir siekiant nustatyti ligos paplitimą ir atsiradimą, įtarus arba patvirtinus ILA ūkyje, kompetentinga institucija arba konsultacijas teikiančios kvalifikuotos žuvų sveikatos tarnybos privalo vykdyti rizikos veiksnių savanorišką priežiūros programą visuose ūkiuose, esančiuose įkurtose zonoje.

I.6.2. Vykdydama tokią savanoriškos priežiūros programą, kompetentinga institucija, atlikdama patikrinimą vietoje, privalo identifikuoti įsteigtos zonos visus ūkius ir atlikti visų žuvų, veisiamų ūkyje, rūšių, kategorijų ir kiekio, įskaitant mirtingumo laipsnį, viešąjį surašymą.

- 1.6.3. Atlikus pradinį viešąjį surašymą, laikinosiose kontroliuojamosiose zonose esantys ūkiai, kuriuose veisiamos Atlanto lašišos (*Salmo salar*) arba kitų rūšių žuvis, nurodytos Tarptautinio epizootijų biuro *Vandens gyvūnų sveikatos kodekso* naujausiame leidime, kurios yra imlios ILA arba kurias galima laikyti galimais ILA pernešėjais, kas 14 dienų praneša kompetentingai institucijai apie mirtingumą. Apie padidėjusį mirtingumą pranešama kasdien, nurodant mirtingumą kiekvienoje žuvidėje. Kompetentinga institucija atlieka padidėjusio mirtingumo ūkyje tyrimą.

Jei įtarimas patvirtinamas, visi ūkiai, esantys įsteigtoje kontroliuojamoje zonoje, kas savaitę praneša kompetentingai institucijai apie mirtingumą kiekvienoje žuvidėje kiekvieną dieną.

Priežiūros zonose esantys ūkiai praneša kompetentingai institucijai apie mirtingumą kas 14 dienų.

Be to, įsteigtose zonose ištisus metus reguliariai atliekami patikrinimai 1 lentelėje nurodytu dažniu. Tačiau, jei dėl klimato sąlygų tokių patikrinimų neįmanoma atlikti tam tikru metų laikotarpiu, valstybės narės gali nustatyti kitą patikrinimų dažnį, pateikiamą nenumatytų atvejų plane.

1 lentelė

Savanoriškos priežiūros programa

Ūkio buvimo vieta	Mažiausias patikrinimų skaičius per metus	Mažiausias patikrinimų skaičius per metus panaikinus kontroliuojamąją zoną
Kontroliuojamoji zona	12	
Priežiūros zona	6	6
Laikinoji kontroliuojamoji zona	6	

Priežiūros programa vykdoma iki zonų panaikinimo momento.

- 1.6.4. Patikrinimai, mėginių atranka, ėmimas, paruošimas ir išgabenimas atliekamas taip, kaip aprašyta II.111.4 dalyse. Mėginiai tiriami taip, kaip aprašyta IIIIV dalyse

II. Patikrinimas ir mėginių ėmimas

II.1. II.1 Mėginių patikrinimas, atranka ir ėmimas ūkyje, kuriame įtariamas ILA buvimas

- II.1.1. Atliekant reguliarius patikrinimus pagal viešosios priežiūros programą, pateikiamą I.6 dalyje ir ūkiuose, kurie įtariami užkrėsti ILA, patikrinami visi ūkio vandens telkiniai (žuvidės, rezervuarai, ir tvenkiniai) ar juose nėra negyvų, sergančių arba neišgydžiusių elgsenos žuvų. Jei įmanoma, atliekami neseniai nugaišusių (nesuirusių) ir sergančių arba neišgydžiusių elgsenos žuvų klinikinių požymių arba pomirtinių tyrimai dėl ILA, kaip aprašyta Tarptautinio epizootijų biuro *Vandens gyvūnų ligų diagnostikos vadovo* naujausiame leidime.
- II.1.2. Jei pastebėti klinikiniai požymiai įrodo ILA buvimą arba inspektorius arba veterinarijos gydytojas įtaria, kad žuvis gali būti užkrėsta, paimami mažiausiai 10 žuvų mėginiai. Jei įmanoma, paimamai neseniai nugaišusių, sergančių ar neišgydžiusių elgsenos žuvų mėginiai. Jei sergančių žuvų skaičius nepakankamas, paimami sveikų žuvų, atrinktų iš žuvidžių, rezervuarų arba tvenkinių, kuriuose užregistruotas aukščiausias mirtingumo laipsnis arba žuvų, turinčių klinikinius ligos požymius, mėginiai.
- II.1.3. Jei buvo atliekami neseniai nugaišusių arba sergančių arba neišgydžiusių elgsenos žuvų tyrimai, tačiau klinikiniai požymiai ir pomirtinio tyrimo rezultatai neįrodo ILA buvimo, mėginių ėmimas nėra privalomas, nors gali būti reikalaujama, kad inspektorius arba veterinarijos gydytojas savo nuožiūra paimtų šiuos mėginius atlikti diferencinę diagnozę.

- II.1.4. Jei laukinės žuvis yra įtariamos užsikrėtus ILA, valstybės narės užtikrina, kad imamai atitinkami mėginiai ir tiriami atitinkamais klinikiniais ir laboratoriniais metodais, nustatytais IIVI dalyse, siekiant atmesti arba patvirtinti įtarimą dėl ILA buvimo ir įvertinti ligos keliamą grėsmę ūkyje veisiamoms žuvis.

II.2. Žuvų mėginių paruošimas

- II.2.1. Histologinės analizės metu tiriami mėginiai paimami tik iš neseniai užmuštų žuvų, turinčių klinikinius požymius arba žuvų, kurių pomirtinio tyrimo rezultatai patvirtina ligos buvimą. Mėginiai imami bet kokių išorinių ar vidinių pažeidimų atveju ir bet kuriuo atveju kiekvienos žuvies kepenys, vidurinė inkstų dalis, širdis ir blužnis pašalinama skalpeliu ir perkeliama į 810 % (tūris/tūris) buferinį formolio druskos tirpalą. Fiksuojančios medžiagos ir audinio mažiausias santykis turi būti 20:1, kad būtų užtikrintas patenkinamas audinių konservavimas.
- II.2.2. Virusologinio tyrimo metu tiriami audiniai paimami iš visų tiriamųjų žuvų. Kartotiniai ėminiai imami, siekiant atlikti patvirtinimą. Kepenų, priešakinės inkstų dalies, širdies ir blužnies dalys išimamos iš žuvies steriliu instrumentu ir perkeliama į plastikinius mėgintuvėlius, į kuriuos įpilta 9 ml gabenimo tirpalo (t. y. ląstelių kultūros terpės, turinčios antibiotikų) Rekomenduojama į vieną mililitrą ląstelių terpės įdėti 12,5 µg fungizono, 200 TV polimiksino B ir 200 µg kanamicino, bet galima naudoti ir kitus patvirtinto veiksmingumo antibiotikus. Į vieną mėgintuvėlį, į kurį įpilta gabenimo tirpalo, galima perkelti daugiausiai penkių žuvų audinių mėginių, sudarysiančių vieną bendrąjį mėginį. Audinio svoris viename mėginyje siekia $1,0 \pm 0,5$ gr.
- II.2.3. Inkstų preparatų atspaudai, tiriami, taikant IFAT, paimami tik iš neseniai užmuštų žuvų (per 2 valandas po užmušimo). Inkstų vidurinė dalis išimama iš žuvies steriliais instrumentais. Audinys prispaudžiamas prie sugeriamojo popieriaus pašalinti kraujo perteklių, o paskiau pakartotinai prispaudžiamas prie preparato stiklo, padengto poli-L-lizinu. Atskiri atspaudai padaromi šalia vieni kitų taip, kad nepersidengtų ir būtų sudaromas vientisas ląstelių sluoksnis. Kraujas ir audinių skystis nėra tiriamas šio testo metu. Negalima palikti inkstų mėginį „džiūti“ ant sugeriamojo popieriaus, nes krešant kraujui, susidaręs didelis serumo baltymų kiekis iškris į nuosėdas preparato paviršiuje. Atspaudai džiovinami ore, paskiau laikomi vėsioje aplinkoje ir džiovinami, jei fiksavimas nebuvo atliktas iškart. Atspaudai fiksuojami per 72 valandas nuo žuvų mėginių paėmimo. Be to, atspaudus galima užšaldyti po džiovinimo ore ir laikyti ilgiausiai 1 mėnesį 20 °C temperatūroje prieš fiksavimą.
- II.2.4. Žuvis, turinčios anemijos požymių, gali būti apsvaiginamos ir nedelsiant paimami kraujo mėginiai, sumaišant juos su heparinu ir atliekama hematologinė analizė, pvz., hematokrito kiekio nustatymas.
- II.2.5. Audinys, tiriamas, taikant RT-PCR, paimamas iš visų tiriamųjų žuvų. Priekinė ir vidurinė inkstų dalis išimama iš žuvies steriliu instrumentu ir perkeliama į mikrocentrifuginį mėgintuvėlį, į kurį įpilta 1 ml patvirtinto veikimo efektyvumo RNR konservuojančiojo tirpalo. Į vieną mėgintuvėlį, į kurį įpilta konservuojančiojo tirpalo, galima perkelti daugiausiai penkių žuvų audinių mėginių, sudarysiančių vieną bendrąjį mėginį. Audinio svoris viename mėginyje apytiksliai siekia 0,5 gr. Jei žuvis yra pernelyg mažos, kad būtų galima paimti reikalaujamo svorio mėginį, tai galima pasirinktinai paimti inkstų, širdies, blužnies, kepenų arba aklosios žarnos prievartio dalių, kad būtų pasiekiamas 0,5 gr. svoris.

II.3. Žuvų mėginių išgabenimas

- II.3.1. Kraujo mėginiai ir mėgintuvėliai, į kuriuos perkeliama žuvų audiniai, tiriami virusologinio tyrimo metu arba taikant RT-PCR, patalpunami į izoliuotas talpyklas (pvz., į polistirolo dėžes storomis sienelėmis), kuriose būtų pakankamai ledo ir „šaldymo blokų“ būtinų užtikrinti mėginių atšaldymą, gabenant juos į laboratoriją. Mėginių negalima užšaldyti, o gavus gabenimo dėžę, joje turėtų būti ledo arba vienas ar keli iš dalies arba visiškai užšalę „šaldymo blokai“. Išimtiniais atvejais mėginiai, tiriami virusologinio tyrimo metu arba taikant RT-PCR, gali būti staigiai užšaldomi ir gabenami į laboratoriją 20 °C temperatūroje.
- II.3.2. Mikroskopiniai preparatai, tiriami, taikant IFAT, gabenami tam tikslui skirtose dėžutėse, į kurias pridėta desikanto, kad atspaudai išliktų sausi ir šalti, kaip nurodyta pirmiau.
- II.3.3. Jei žuvų audiniai pamerkami juos į fiksuojančiosios medžiagos, naudojamos, atliekant histologinę analizę, tirpalą, jie gabenami sandariuose mėgintuvėliuose, sudėtuose į aplinkos poveikiui atsparias talpyklas, tokias, kaip polistirolo dėžės storomis sienelėmis.

- II.3.4. Neatsižvelgiant į tai, kad mėginiai užšaldyti, virusologinis tyrimas pradamas nedelsiant ir ne vėliau kaip per 72 valandas nuo mėginių paėmimo. Prieš atgabenant į laboratoriją mėginį, skirtą patvirtinimo analizei, jis yra saugomas 20 °C ir žemesnėje temperatūroje.
- II.3.5. Į laboratoriją galima siųsti visą žuvį, jei laikomasi reikalavimų, keliamų temperatūrai gabenimo metu, kaip nurodyta II.3.1. Visa žuvis suvyniojama į sugeriamąjį popierių ir gabenama plastikinėje dėžėje, atšaldomoje taip, kaip nurodyta pirmiau.
- II.3.6. Galima gabenti ir gyvas žuvis, tačiau tik kompetentingai tarnybai prižiūrint.
- II.3.7. Iš audinių, tiriamų, taikant RT-PCR ir saugomų *RNAlater* konservuojančios medžiagos tirpale, RNR turi būti išskiriama per tam tikrą laiką, mėginius saugant skirtingoje temperatūroje. RNR išskyrimo laikas pateikiamas paskiau:
- 37 °C temperatūroje per dieną
 - 25 °C temperatūroje per savaitę
 - 4 °C temperatūroje per mėnesį
 - 20 °C temperatūroje nenurodyta
- II.3.8. Visų rūšių pakavimas ir ženklimas etiketėmis turi būti atliekamas atitinkamai pagal esamus nacionalinius ir tarptautinius transporto reglamentus.

II.4. Papildomos diagnostinės medžiagos ėmimas

Pasirašius susitarimą su diagnostine laboratorija, galima paimti kitus žuvų audinius ir paruošti juos papildomam tyrimui.

III. Virusologinis tyrimas

III.1. Mėginių paruošimas

- III.1.1. Jeigu kyla praktinių sunkumų, dėl kurių neįmanoma užkrėsti ląstelių per 72 valandas nuo audinių mėginių paėmimo, leidžiama užšaldyti audinį – 80 °C temperatūroje 28 dienoms. Audinys turi būti užšaldomas ir atšildomas tik vieną kartą prieš tyrimą.
- III.1.2. Kiekvienas mėginys (visas audinys, esantis gabenimo tirpale) visiškai homogenizuojamas smulkintuvu, maišytuvu arba grūstuvu ir piesta, centrifuguodamas 2 000 × 4 000 g greičiu 15 min. 06 °C temperatūroje ir susidaręs viršnuosėdinis skystis filtruojamas per 0,45 μm skersmens filtrą ir inkubuojamas su tokio pat tūrio atitinkamai praskiestų antikūnų, specifinių ILAV vietiniams serotipams, tirpalų rinkiniu. Antikūnų mažiausias titras turi būti 1:2 000, kai atliekamas 50 % visų lizės zonų neutralizacijos testas. Mišinys inkubuojamas 1 valandą 15 °C temperatūroje ir gaunamas užkratas.

Visi užkratai sumaišomi su antikūnais, specifiniais IPN (V) (tam tikrose Europos dalyse šis virusas aptinkamas 50 % visų žuvų mėginių), kad ląstelės būtų apsaugotos nuo IPN (V) sukeliama citopatinio poveikio, virusui dauginantis užkrėstų ląstelių kultūrose. Virusologinis tyrimas sutrumpėja ir sumažėja klaidingų rezultatų, gaunamų virusologinio tyrimo metu dėl IPN (V) sukeliama citopatinio poveikio, skaičius.

Tais atvejais, kai mėginiai pristatomi iš ūkių, kurie laikomi neužkrėsti IPN, nebūtina sumaišyti viršnuosėdinį skystį su antikūnais, specifiniais IPN (V).

III.2. Ląstelių kultūrų užkrėtimas

- III.2.1. SHK-1 ląstelės (atlikus 80 arba mažiau persėjimų) arba TO ląstelės auginamos L-15 terpėje, turinčioje 5 % galvijų vaisiaus serumo, 2 % (tūris/tūris) 200 mM L-glutamino, ir 0,08 % 50 mM 2 – merkaptotetanolio 12 arba 24 duobučių plokštelėse. Galima vartoti ir kitas patvirtinto efektyvumo ir jautrumo, išskiriant ILAV, ląstelių linijas, atsižvelgiant į viruso kamieno kintamumą ir skirtingų kamienų sugebėjimą daugintis skirtingose ląstelių linijose. Jaunų, aktyviai besidalijančių ląstelių kultūros užkrečiamos antikūnais paveikta organo suspensija, kai audinio mėginio ląstelių kultūros galutinis praskiedimas 1:1 000. Kiekvieno organo suspensijos atveju į kiekvieną plokštelės duobutę įpilama po 2 ml ląstelių auginimui skirtos terpės ir 40 μl užkrato. Siekiant sumažinti kryžminės taršos riziką, tiriant mėginius, paimtus skirtingose žuvivaisos ūkio vietose, rekomenduojama naudoti atskiras 12 arba 24 duobučių plokšteles.

III.2.2. Į vienos plokštelės duobutes įpilama neužkrėstos ląstelių kultūros suspensijos ir ši plokštelė naudojama kaip neigiama kontrolė. Į kitos plokštelės duobutes įpilama ląstelių kultūros, užkrečiamos ILAV etaloniniu izoliatu (teigiamu kontroliniu mėginiu), suspensijos, kaip nurodoma paskiau. Užkrėtimas atliekamas, 100 μ l pradinio ILAV preparato (mažiausias titras 1 ml 10^7 TCID₅₀), įpilant į pirmąją plokštelės duobutę ir gerai sumaišant. Perpilant šios medžiagos tūrį iš pirmosios duobutės į antrąją duobutę, atliekamas praskiedimas santykiu 1:10 ir turinį gerai sumaišant. Ši operacija kartojama visoje plokštelėje vertikalia kryptimi, atliekant šešis praskiedimus santykiu 1:10. Pradinis ILAV preparatas saugomas – 80 °C temperatūroje mažiausiai dvejus metus, tačiau vieną kartą atšildžius preparatą, jį būtina panaudoti per tris dienas. Pastaba: reikia stengtis išvengti tyrimui skirtų plokštelių ir teigiamos kontrolinės medžiagos kryžminės taršos. To išvengti, naudojamos atskiros teigiamos rizikos kontrolės plokštelės ir tiriamosios plokštelės.

III.2.3. Mėginiai inkubuojami 14 ± 2 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 15 dienų.

III.3. Mikroskopija

CPE ląstelių kultūrose stebimas mikroskopu du kartus, praėjus 57 dienoms ir 1214 dienų po užkrėtimo. Jei CPE stebimas ląstelių kultūroje, nedelsiant pradedamas viruso identifikavimas. Jei CPE nėra stebimas 14 dieną po užkrėtimo, atliekamas hemadsorbcijos testas (III.4).

III.4. Hemadsorbcija

ILAV dauginantis ląstelių kultūroje, CPE pasireiškia ne visada. Todėl kiekvienoje plokštelės duobutėje atliekamas hemadsorbcijos testas, kaip nurodyta paskiau arba IF, kaip nurodyta III.6.1.

III.4.1. Ląstelių kultūros terpė, teigiami kontroliniai mėginiai ir neigiami kontroliniai mėginiai iš kiekvienos duobutės perpilami į sterilius mėgintuvėlius, ženklintus etiketėmis. Į kiekvieną plokštelės duobutę įpilama 500 μ l 0,2 % (tūris/tūris) triušio arba arklio perplautų eritrocitų suspensijos arba 0,05 % (tūris/tūris) vaivorykštinio upėtakio arba Atlanto laišos plautų eritrocitų suspensijos ir inkubuojama kambario temperatūroje 45 minutes. Eritrocitų suspensija išpilama iš kiekvienos duobutės ir plauinama du kartus L-15 terpe. Kiekviena duobutė stebima mikroskopu.

III.4.2. Eritrocitų sankaupos SHK-1 arba TO ląstelių paviršiuje įrodo ortomiksoviruso sukeltos infekcijos buvimą. Jei hemadsorbcijos testo rezultatas yra teigiamas, nedelsiant atliekamas viruso identifikavimas (III.6).

III.5. Subkultūravimas arba persėjimas

III.5.1. Persėjimas atliekamas 1315 dieną. Į 12 duobučių plokštelės kiekvieną duobutę, į kurią jau pripilta jaunų, aktyviai besidalijančių SHK-1 ląstelių suspensijos, įpilama 225 μ l ląstelių kultūros viršnuosėdinio skysčio ir inkubuojama 14 ± 2 °C temperatūroje 18 dienų. CPE ląstelių kultūrose stebimas mikroskopu du kartus, praėjus 57 dienoms ir 1418 dienų po užkrėtimo. Jei CPE stebimas bet kurioje ląstelių suspensijoje, viruso identifikavimas pradedamas nedelsiant (III.6). Jei CPE nėra stebimas 1418 dieną po užkrėtimo, atliekamas hemadsorbcijos testas (III.4).

III.5.2. Jei per pirmąsias septynias inkubavimo dienas įvyksta citotoksiškumo reakcija, atliekamas persėjimas ir ląstelės reikia inkubuoti 1418 dienų, paskiau atliekama pakartotinė persėjimą ir paskesnę 1418 dienų inkubavimą. Jei po septynių dienų citotoksiškumo reakcija neįvyksta, ląstelės persėjamos vieną kartą ir inkubuojamos, kad nuo pradinio inkubavimo praeitų ne mažiau kaip 2836 dienos.

III.5.3. Jei pradinė ląstelių kultūra užteršiama bakterijomis, testą reikia pakartoti, naudojant – 80 °C temperatūroje saugomą audinio homogenatą. Prieš užkrėtimą audinio homogenatas centrifuguojamas $4\ 000 \times g$ 30 minučių 06 °C temperatūroje ir viršnuosėdinis skystis filtruojamas per 0,22 μ m skersmens filtrą. Jei persėjant ląstelių kultūrą, ši užteršiama bakterijomis, viršnuosėdinis skystis filtruojamas per 0,22 μ m skersmens filtrą, juo užkrečiamos jaunos ląstelės ir inkubuojamos paskiau 1418 dienų.

III.6. Viruso identifikavimo testai

Jei CPE stebimas bet kurio etapo metu arba gaunamas teigiamas hemadsorbcijos testo rezultatas, atliekamas viruso identifikavimas. ILAV identifikavimas atliekamas, taikant IF (III.6.1) ir RT-PCR (IV). Jei manoma, kad šio viruso identifikavimo metu bus identifikuoti ir kiti virusai, rekomenduojama atlikti papildomus viruso identifikavimo testus. Jei, taikant šiuos testus, virusas neidentifikuojamas per savaitę, viršnuosėdinis skystis turi būti siunčiamas į nacionalinę etaloninę laboratoriją arba į ES žuvų ligų etaloninę laboratoriją atlikti neatidėliotiną identifikavimą.

III.6.1. IF

III.6.1.1. SHK-1 ląstelės (atlikus 80 arba mažiau persėjimų) arba TO ląstelės auginamos L-15 terpėje, turinčioje 5 % galvijų vaisiaus serumo, 2 % (tūris/tūris) 200 mM L-glutamino, ir 0,08 % 50 mM 2 – merkaptioetanolio 24 arba 96 duobučių plokštelėse, ląstelėms ištaisai padengiant daugiau negu 50 % viso ploto. Galima vartoti ir kitas patvirtinto efektyvumo ląstelių linijas arba terpes, skirtas ląstelėms auginti. Į dvi duobutes įpilama po 225 µl ląstelių kultūros, įtariamos užkrėstos virusu, viršnuosėdinio skysčio, sumaišoma ir perpilama į kitas dvi duobutes, atliekant praskiedimą santykiu 1:5. Į dvi papildomas kontrolines duobutes neįpilama ląstelių kultūros viršnuosėdinio skysčio. Į atskirų plokštelių duobutes įpilama mėginių, paimtų žuvivaisos ūkio skirtingose vietose ir viruso kontrolinio mėginio. Viruso kontrolinis mėginys paruošiamas, naudojant ILAV izoliato etaloną.

III.6.1.2. Plokštelės inkubuojamos 14 ± 2 °C temperatūroje ir stebimos mikroskopu ne ilgiau kaip septynias dienas. Kai stebimas CPE arba jei jis nepastebimas per septynias dienas, atliekamas paskesnis fiksavimas. Duobutės plaunamos PBS tirpalu ir fiksuojamos, įpilant 80 % acetono ir inkubuojant 20 minučių kambario temperatūroje. Plokštelės džiovinamos ore ir nedelsiant dažomos arba saugomos 06 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 24 valandas prieš dažymą.

III.6.1.3. Į kartotines duobutes įpilama monokloninio antikūno 3H6F8, specifiško ILAV arba kito patvirtinto veikimo efektyvumo ir specifškumo monokloninio antikūno, praskiesto PBS, tirpalo ir inkubuojama 37 ± 4 °C temperatūroje 30 minučių. Monokloninio antikūno tirpalas išpilamas ir plokštelės plaunamos tris kartus, į duobutes įpilant 0,05 % Tween -20 PBS tirpalo. Į kiekvieną duobutę įpilama antikūnų, specifškų pelės IgG ir FITC junginio, praskiesto PBS tirpalu ir inkubuojama 37 ± 4 °C temperatūroje 30 minučių. Pastaba: kiekviena laboratorija privalo optimizuoti skirtingų partijų monokloninio antikūno ir FITC junginio praskiedimus. Monokloninio antikūno tirpalas išpilamas ir plokštelės plaunamos tris kartus, į duobutes įpilant 0,05 % Tween -20 PBS tirpalo.

III.6.1.4. Duobutės nedelsiant stebimos fluorescencinei mikroskopijai pritaikytu inversiniu mikroskopu, turinčiu atitinkamą FITC sužadavimo filtrą. Testas laikomas teigiamu, jei stebima ląstelių fluorescencija. Testas yra patikimas, jei teigiami rezultatai įvertinami pagal teigiamus kontrolinius mėginius, o neigiami rezultatai pagal neigiamus kontrolinius mėginius.

IV. Mėginių analizė RT-PCR metodu

IV.1. Šiame skyriuje aprašoma ILAV genomo 8 segmento genetinės medžiagos padauginimas PCR metodu, atliekamu, naudojant žuvies audinį arba ląstelių kultūrą, užkrėtą ILAV

IV.1.1. RNR išskyrimas

- Iš kiekvieno mėginio pašalinamas RNA later konservuojanti medžiaga. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 1 ml dietilpirokarbonatu (DEPC) apdoroto distiliuoto H₂O ir visi mėgintuvėliai centrifuguojami 13 000 rpm greičiu 5 minutes 06 °C temperatūroje.
- Kiekvieno mėginio viršnuosėdinis skystis išpilamas ir į kiekvieną mėginio mėgintuvėlį bei kontrolinį mėgintuvėlį, į kurį įpilta atitinkamos kontrolinės medžiagos (400 µl H₂O arba žuvies, neužkrėstos nurodytu patogenu, inkstų homogenato) įpilama 800 µl TRIzol (Invitrogen) arba kito patvirtinto tokio paties ar didesnio veikimo efektyvumo reagento. Jei reikia, audiniai suardomi, automatinė pipete įsiurbiant ir išsiurbiant mėgintuvėlio turinį kelis kartus. Mėgintuvėliai inkubuojami penkias minutes kambario temperatūroje. Į kiekvieną mėgintuvėlį pripilama 160 µl chloroformo ir mėgintuvėliai purtomi kratytuvu 3 minutes, o paskiau centrifuguojami 13000 rpm greičiu 15 minučių 06 °C temperatūroje.
- Susidaręs viršutinis vandeninis sluoksnis perpilamas į etikete paženklintą 1,5 ml tūrio mikrocentrifuginį mėgintuvėlį, į kurį įpilta 500 µl izopropanolio ir mėgintuvėliai inkubuojami 10 minučių kambario temperatūroje, o paskiau centrifuguojami 6 500 rpm greičiu 15 minučių 06 °C temperatūroje.

- d) Viršnuosėdinis skystis išpilamas ir į mėgintuvėlį, kuriame yra RNR nuosėdų, susidariusių centrifuguojant, įpilama 1 ml 75 % etanolio. Paskiau mėgintuvėliai centrifuguojami 6 500 rpm greičiu 15 minučių 06 °C temperatūroje.
- e) Viršnuosėdinis skystis išpilamas ir mėgintuvėliai paliekami atviri apie 3 minutes, kad etanolio likutis išgaruotų. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 15 µl dietilpirokarbonatu (DEPC) apdoroto distiliuoto H₂O ir, jeigu reikia, pakratoma RNR nuosėdas suspenduoti dar kartą.
- f) RNR koncentracija apskaičiuojama ir mėginių grynumas įvertinamas, atliekant matavimą spektrofotometru. Optiniai tankiai matuojami, bangos ilgiui siekiant 260 nm ir 280 nm.
- g) RNR mėginį, kuris bus naudojamas nedelsiant (tą pačią dieną), galima laikinai saugoti 06 °C temperatūroje. RNR, kuri nėra naudojama nedelsiant, saugoma – 80 °C temperatūroje.

IV.1.2. RT

- a) 2 µg RNR praskiedžiama dietilpirokarbonatu (DEPC) apdorotu distiliuotu H₂O 1,5 ml tūrio mikrocentrifuginiuose mėgintuvėliuose. Kai RNR koncentracija yra pernelyg maža, kad, atliekant RT reakciją, būtų galima naudoti 2 µg, naudojamas didžiausias galimas RNR kiekis. Praskiesta RNR inkubuojama 10 minučių 55-60 °C temperatūroje.
- b) Mėgintuvėliai, kuriuose yra RNR, padedami ant ledo ir įpilama RT reakcijos reagentų, kad būtų pasiekta 1 kartą koncentruoto buferinio tirpalo, 1 mM dNTP, 100 ng atsitiktinai pasirinktų heksamerų, 20 V RNRazės inhibitoriaus ir 200 V Moloney pelių leukemijos viruso (MMLV) RT, esančios bendrame 20 µl tūryje, galutinė koncentracija.
- c) Mėgintuvėliai inkubuojami vieną valandą 37 °C temperatūroje.
- d) cDNR saugoma 06 °C temperatūroje iki tol, kol jos prireiks ir naudojama PCR nedelsiant.

IV.1.3. PCR

- a) Į 45 µl PCR mišinio pripilama 5 µl cDNR, kad būtų pasiektos 1 kartą koncentruoto buferio 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM kiekvieno dNTP, 25 pmol kiekvieno pradmenų ir 1V Taq polimerazės galutinė koncentracija. Pradmenys: ILA+(5-GCC-AAG-TGT-AAG-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3) (tiesioginis pradmuo) ir ILA- (5-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3) (atvirkštinis pradmuo). Atliekant RNR išskyrimą, RT ir PCR reakcijas, naudojami neigiami kontroliniai mėginiai.
- b) Mėgintuvėliai įdedami į automatinį termostatą ir parengiama ši programa: kaitinimas 94 °C temperatūroje 5 minutes, kaitinimas 55 °C temperatūroje 1 minutę, kaitinimas 72 °C temperatūroje 1 min ir galutinis inkubavimas 72 °C temperatūroje 5 minutes.
- c) PCR reakcijos produktai analizuojami, atliekant elektroforezę 2 % agarozės gelyje, nudažytame etidumbromidu, į gelio duobutes įnešant molekulinio svorio standartus, tiriamuosius mėginius ir RT bei PCR reakcijų neigiamus kontrolinius mėginius. 15 bp ilgio PCR produktas įrodo ILAV RNR buvimą. Mėginiai, kuriuose aptinkamas papildomas 310 bp ilgio PCR produktas, laikomi turintys ILAV RNR. Mėginiai, kuriuose padauginama daug PCR produktų, kurių vieno mažiausias ilgis siekia 155 bp, laikomi mėginiais, galinčiais turėti ILAV RNR. Juos galima paskiau analizuoti DNR zondų arba nukleotidų sekos nustatymo metodu.

IV.1.4. ILAV išskyrimo audinių kultūroje patvirtinimas PCR

Jeigu audinių mėginių virusologinio tyrimo metu CPE buvo stebimas SHK-1 ląstelėse, tai 400 µl viršnuosėdinio skysčio perpilama iš duobutės į 1,5 ml tūrio sterilų mėgintuvėlį. Iš šio mėginio išskiriama RNR, kaip nurodyta III.1 ir atliekama RT-PCR. Jei naudojamos ląstelių kultūros, kuriose nestebimas visiškas CPE, ląstelės nuplaunamos nuo duobutės ar laboratorinio flakono paviršiaus ir perkeliamos į 1,5 ml tūrio sterilų mėgintuvėlį, kuriame išskiriama RNR ir atliekama RT-PCR.

IV.1.5. PCR produktų DNR mėginyje patvirtinimas

- a) 155 bp dydžio PCR produkto specifiškumas gali būti įvertinamas, inkubuojant jį ir oligonukleotidą, prisijungiantį prie pradmenų nepasiekiamo PCR produkto regiono. PCR reakcijos produktai analizuojami, atliekant elektroforezę 1 % agarozės gelyje, į gelio duobutes įnešant molekulinio svorio standartus, ir RT bei PCR reakcijų teigiamus kontrolinius mėginius ir neigiamus kontrolinius mėginius.

- b) DNR perkeliama ant membranos, taikant Southern blotingo metodą ir, atitinkamai pasiruošus hibridizacijos reakcijai žymėtas oligonukleotidas (5-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3) inkubuojamas kartu su membrana.
- c) Neprisijungę arba nespecifiškai prisijungę zondai nuplaunami nuo membranos ir išryškinami prisijungę zondai.
- d) Zondai, prisijungiantys prie 155 bp ilgio fragmento (ir prie 310 bp ilgio fragmento, jei šis yra) įrodo PCR specifiškumą ir ILAV RNR buvimą mėginyje.

IV.1.6. PCR produktų nukleotidų sekos nustatymas

PCR specifiškumas gali būti vertinamas, nustatant 155 bp ilgio PCR produkto nukleotidų seką.

- a) Atliekamas PCR produktų, išskirtų iš agarozės gelio ar tirpalo, gryninimas.
- b) Fragmento nukleotidų seka nustatoma, naudojant tuos pačius, kaip ir atliekant PCR reakciją, pradmenis arba vektoriaus pradmenis, jei šie įterpiami į vektorių prieš sekos nustatymą.
- c) Nukleotido seka palyginama su ILAV 8 segmento, esančio Europos molekulinės biologijos laboratorijos (EMBL) duomenų bazėje, nukleotidų seka (prieigos numeriai Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) Sekos, atitinkančios ILAV 8 segmento seką, buvimas įrodo ILAV RNR buvimą mėginyje.

V. Inkstų preparatų atspaudų tyrimas IFAT

V.1. Ši metodika buvo parengta inkstų preparatų atspaudų tyrimui IFAT

V.2. Inkstų preparatų atspaudų paruošimas ir dažymas

V.2.1. Preparatai fiksuojami acetone arba metanolio/acetono mišinyje (1:1) tris minutes ir džiovinami ore. Prieš dažymą kiekvienas preparatas stebimas ir preparato atitinkami regionai apibrėžiami ImmEdge™ žymekliu ir džiovinami ore. Paskiau preparatai pamerkiami į blokavimo tirpalą (6 % nugriebto pieno ir PBS mišinį, turintį 0,2 % Tween 20) ir inkubuojami 30 minučių kambario temperatūroje, švelniai kratant. Kiekvienas preparatas džiovinamas ir įdedamas į dėžutę preparatams laikyti, išklotą drėgnu popieriumi palaikyti drėgmę dėžutės viduje.

V.2.2. Kiekvienas atspaudas pamerkiamas į monokloninio antikūno 3H6F8 (arba kitų patvirtinto specifiškumo ir veikimo efektyvumo antikūnų), specifiško ILAV, tirpalą, dėžutė preparatams laikyti uždaroma ir inkubuojama 60 minučių kambario temperatūroje, kratant. Paprastai antikūno tirpalas praskiedžiamas 1 % nugriebto pieno tirpalu santykiu nuo 1:10 iki 1:100, tačiau kiekvienos partijos atveju reikia nustatyti faktinį praskiedimą. Preparatai plaunami 3 kartus 2 minutes PBS tirpalu, turinčiu 0,1 % Tween 20. Kiekvienas atspaudas padengiamas tirpalu, turinčiu FITC ir ožkos antikūnų, specifiskų pelės imunoglobulinams, junginio, praskiesto 1 % nugriebto pieno tirpalu santykiu 1:1000 ir inkubuojamas drėgnoje aplinkoje 60 minučių kambario temperatūroje. Preparatai plaunami 3 kartus 2 minutes PBS tirpalu, turinčiu 0,1 % Tween 20. Kiekvienas preparatas pamerkiamas į CITI-FLUOR™ tirpalą (CITI-FLUOR™ ir 1,5 ml PBS, turinčio 0,1 % Tween 20, mišinys (tūris/tūris) arba kitą atitinkamą histologinio preparato pjūvio paruošimo terpę ir laikomas 10 minučių. Preparatai plaunami 3 kartus 2 minutes PBS tirpalu, turinčiu 0,1 % Tween 20. Jeigu reikia nustatyti nusidažiusių zonų skaičių, kiekvienas atspaudas gali būti pamerkiamas į propidium jodido (0,01mg/ml) ir PBS, turinčio 0,1 % Tween 20, mišinį ir inkubuojamas tris minutes kambario temperatūroje. Preparatai plaunami 3 kartus 2 minutes PBS tirpalu, turinčiu 0,1 % Tween 20. Preparatai džiovinami ir jų pjūviai ruošiami CITI-FLUOR™ tirpale arba kitoje atitinkamoje histologinio preparato pjūvio paruošimo terpėje. Preparatai saugomi 4 °C temperatūroje, tamsoje prieš stebėjimą mikroskopu.

V.3. Tyrimas fluorescencine mikroskopija

Kiekvienas preparatas stebimas mikroskopu, turinčiu epi-fluorescencijos apšvietimo įrangą, naudojant atitinkamus filtrus FITC sužadininui ir būdingos žalios spalvos fluorescencijos spinduliuotei. Visi stebėjimo laukečiai, esantys regionuose, apibrėžtuose ImmEdge™ žymekliu, stebimi dešimt kartų ir dvidešimt kartų didinančiais objektyvais ir įtariamos zonos (ten, kurs stebima žalios spalvos fluorescencija) paskiau stebimos keturiasdešimt kartų didinančiu objektyvu, esant faziniam/fluorescenciniam apšvietimui įsitikinti, kad ląstelėje vyksta fluorescencija. Įtariamų regionų koordinatės registruojamos, o paskiau antras tyrėjas patvirtina fluorescencijos pobūdį. Atlikus pirminį stebėjimą, teigiami arba įtariami preparatai pakartotinai stebimi ir patvirtinami rezultatai.

V.4. Kontroliniai mėginiai

V.4.1. IFAT tiriant nudažytų mikroskopinių preparatų kiekvieną partiją, naudojami trijų tipų kontroliniai mėginiai:

- neužkrėstos Atlanto lašišos inksto preparato atspaudas (neigiamas kontrolinis mėginys),
- neužkrėstų SHK-1 ląstelių kultūra arba bet kuri kita imli ląstelių kultūra (neigiamas kontrolinis mėginys),
- ILAV užkrėstų SHK-1 ląstelių kultūra arba bet kuri kita imli ląstelių kultūra (teigiamas kontrolinis mėginys).

V.4.2. Jei įmanoma, rekomenduojama naudoti ILAV užkrėstos Atlanto lašišos inkstų preparato atspaudą kaip papildomą teigiamą kontrolinį mėginį.

V.4.3. Jei naudojant bet kurį neigiamą kontrolinį mėginį, gaunamas teigiamas rezultatas, tai vienos partijos mikroskopinių preparatų testas laikomas nepavykusiu. Jei tiriant vienos partijos visus mikroskopinius preparatus, įkaitant ir teigiamus kontrolinius mėginius, gaunami neigiami rezultatai, tai vienos partijos mikroskopinių preparatų testas laikomas nepavykusiu. Tais atvejais, kai dėl kontrolinių mėginių klaidų mikroskopinių preparatų partijos testas nepavyksta, šie preparatai yra sunaikinami ir atliekamas atspaudai tiriami dar kartą.

V.5. Kitų audinių tyrimas

Ši metodika gali būti taikoma, tiriant kitus žuvų audinius, tokius kaip kepenis, blužnį ir širdį, kuriuose yra pakankamai daug endotelio ląstelių, leukocitų ar limfocitų, kuriuos galima sukaupti mikroskopiniame preparate. Kiekvieno audinio dažymo tvarka yra ta pati, nors kai kuriuos audinius rekomenduojama nedažyti propidium jodidu, nes stebint atspaudą fazinio kontrasto mikroskopu, identifikuojami atspaudė esančių ląstelių tipai.

VI. HISTOLOGINĖ ANALIZĖ

Parafine esantys pjūviai supjaustomi 5 µm storio gabaliukais ir dažomi hematoksilinu ir eozinu. Histologiniai pokyčiai, atsiradę dėl ILA, pateikiami Tarptautinio epizootijų biuro *andens gy vūnų ligų diagnostikos vadovo* dabartiniame leidime.

VII. Akronimai ir sutrumpinimai

cDNA	Komplementarioji dezoksiribonukleininė rūgštis
CPE	Citopatinis efektas
DEPC	Dietilpirokarbonatas
dNTP	Dezoksinukleotidiltrifosfatas
FITC	Fluoresceinizotiocianatas
IF	Imunofluorescencija
IFAT	Netiesioginis fluorescencinių antikūnų testas
OIE	Office international des epizooties (Tarptautinis epizootijų biuras)
IPN(V)	Infekcinės kasos nekrozės (virusas)
ISA(V)	Infekcinės lašišų anemijos (virusas)
PBS	Fosfatinis buferinis tirpalas
RNA	Ribonukleininė rūgštis
RT-(PCR)	Atvirkštinės transkriptazės (Polimerazės grandininė reakcija)
SHK-1	Lašišų inkstų ląstelės
TCID ₅₀	Audinių kultūros vidutinė (50 %) infekcinė dozė