

# COMMISSIE

## BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE

van 13 juni 2003

### tot vaststelling van de criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht naar aanleiding van de vermoedelijke of de bevestigde aanwezigheid van infectieuze zalmanemie (ISA)

(kennisgeving geschied onder nummer C(2003) 1831)

(Voor de EER relevante tekst)

(2003/466/EG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 91/67/EEG van de Raad van 28 januari 1991 inzake veterinaire rechtelijke voorschriften voor het in de handel brengen van aquicultuurdieren en aquicultuurproducten<sup>(1)</sup>, laatstelijk gewijzigd bij Verordening (EG) nr. 806/2003<sup>(2)</sup>, en met name op artikel 15,

Gelet op Richtlijn 93/53/EEG van de Raad van 24 juni 1993 tot vaststelling van minimale communautaire maatregelen voor de bestrijding van bepaalde visziekten<sup>(3)</sup>, laatstelijk gewijzigd bij Beschikking 2001/288/EG van de Commissie<sup>(4)</sup>, en met name op artikel 5, lid 2, en artikel 6,

Overwegende hetgeen volgt:

- (1) Bij Richtlijn 93/53/EEG is bepaald dat bemonstering en laboratoriumtests met betrekking tot de aanwezigheid van ziekten van lijst I en lijst II — die zijn opgenomen in bijlage A bij Richtlijn 91/67/EEG — moeten worden uitgevoerd met gebruikmaking van de methoden die zijn vastgesteld overeenkomstig artikel 15 van Richtlijn 91/67/EEG.
- (2) De bemonsteringsschema's en de diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van virale hemorrhagische septikemie (VHS) en infectieuze hematopoëtische necrose (IHN), ziekten die zijn opgenomen in lijst II, zijn vastgesteld bij Beschikking 2001/183/EG van de Commissie<sup>(5)</sup>.
- (3) Overeenkomstig artikel 5, lid 2, en artikel 6 van Richtlijn 93/53/EEG moeten alle bedrijven die gelegen zijn in hetzelfde stroomgebied of hetzelfde kustgebied als het bedrijf waar besmetting met infectieuze zalmanemie (ISA) wordt vermoed of is bevestigd, onder officieel toezicht worden geplaatst. De criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht moeten worden vastgesteld.

- (4) Voor de vaststelling van de bemonsteringsschema's en de diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van ISA, alsmede voor de vaststelling van de criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht naar aanleiding van de vermoedelijke of de bevestigde aanwezigheid van ISA, zijn deskundigen op het gebied van de gezondheid van vis, alsmede laboratoriumdeskundigen geraadpleegd. Voorts moet rekening worden gehouden met de richtsnoeren voor de diagnose van ISA die zijn vastgesteld in de huidige editie van het „Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases” (Diagnostische handleiding voor ziekten van waterdieren) van het OIE.
- (5) Er moet voldoende tijd worden gelaten voor de tenuitvoerlegging van deze nieuwe eisen.
- (6) De in deze beschikking vervatte maatregelen zijn in overeenstemming met het advies van het Permanent Comité voor de voedselketen en de diergezondheid,

HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING GEGEVEN:

#### Artikel 1

De bemonsteringsschema's en de diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van infectieuze zalmanemie (ISA), alsmede de criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht naar aanleiding van de vermoedelijke of de bevestigde aanwezigheid van ISA worden vastgesteld in de bijlage bij deze beschikking.

#### Artikel 2

Deze beschikking wordt van toepassing op 23 oktober 2003.

<sup>(1)</sup> PB L 46 van 19.2.1991, blz. 1.

<sup>(2)</sup> PB L 122 van 16.5.2003, blz. 1.

<sup>(3)</sup> PB L 175 van 19.7.1993, blz. 23.

<sup>(4)</sup> PB L 99 van 10.4.2001, blz. 11.

<sup>(5)</sup> PB L 67 van 9.3.2001, blz. 65.

*Artikel 3*

Deze beschikking is gericht tot de lidstaten.

Gedaan te Brussel, 13 juni 2003.

*Voor de Commissie*  
David BYRNE  
*Lid van de Commissie*

---

## BIJLAGE

**Bemonsteringsschema's en diagnostische methoden voor de opsporing en bevestiging van infectieuze zalm-anemie (ISA) en criteria voor de indeling in gebieden en het officiële toezicht naar aanleiding van de vermoedelijke of de bevestigde aanwezigheid van ISA**

## INLEIDING EN DEFINITIES

Deze bijlage:

- a) voorziet in richtsnoeren en minimumvereisten voor bemonsteringsschema's en diagnostische methoden voor het opsporen en bevestigen van de aanwezigheid van ISA;
- b) integreert de bepalingen en definities die zijn vastgelegd in Richtlijn 91/67/EEG en Richtlijn 93/53/EEG;
- c) schrijft bepalingen voor ten behoeve van een juiste diagnose en bestrijding van en een adequaat toezicht op ISA, wanneer de aanwezigheid van ISA wordt vermoed of is bevestigd;
- d) is bedoeld voor zowel de instanties die verantwoordelijk zijn voor de bestrijding van ISA als het laboratoriumpersoneel dat de tests met betrekking tot deze ziekte uitvoert. De nadruk ligt op de bemonsteringsprocedures, de beginselen en toepassingen van laboratoriumtests en de evaluatie van de resultaten daarvan, alsmede op de gedetailleerde beschrijving van de laboratoriumtechnieken. Waar dat aan de orde is, mogen laboratoria echter wijzigingen aanbrengen in de in deze bijlage beschreven tests of andere tests gebruiken, op voorwaarde dat kan worden aangetoond dat die tests even gevoelig en specifiek zijn. Verder worden de criteria voor het instellen van gebieden en voor het officiële toezicht naar aanleiding van een vermoedelijk uitbraak of de bevestiging van ISA vastgelegd.

Voor de toepassing van deze bijlage gelden de volgende aanvullende definities:

„Stroomgebied”: het gehele stroomgebied, van de bron van een waterloop tot de monding, of een deel van het stroomgebied, van de bron van een waterloop tot aan een natuurlijke of kunstmatige barrière die een beletsel vormt voor de migratie van de vis die zich stroomafwaarts van deze barrière bevindt;

„Kustgebied”: een deel van de kust of het zeewater of een riviermonding met precies aangegeven geografische grenzen, dat bestaat uit een homogeen hydrodynamisch systeem of een aantal van dergelijke systemen.

In deel I worden de algemene principes en de criteria vastgelegd voor de diagnose en bevestiging van ISA, evenals de criteria voor de indeling in gebieden en voor het officiële toezicht dat moet worden gehouden naar aanleiding van een vermoedelijke uitbraak of de bevestiging van ISA.

In deel II wordt voorgeschreven welke inspecties en bemonsteringen moeten worden uitgevoerd teneinde de aanwezigheid van ISA op te sporen.

In deel III worden de methoden voorgeschreven die moeten worden gebruikt voor virologisch onderzoek.

In deel IV worden de hoofdlijnen beschreven van de procedure voor het onderzoeken van monsters met behulp van RT-PCR voor het opsporen van ISA.

In deel V wordt het protocol beschreven dat moet worden gebruikt voor het onderzoeken van nierafdrukken op ISA met behulp van IIFT.

Deel VI omvat de histologische methodologie.

In deel VII worden de gebruikte acroniemen en afkortingen verklaard.

**I. Criteria voor de diagnose van ISA en voor het instellen van gebieden, bepaalde bestrijdingsmaatregelen en het officiële toezicht****I.1. Algemene principes voor de diagnose van ISA**

Punt I.2 van deze bijlage bevat een beschrijving van de redelijke gronden op basis waarvan kan worden vermoed dat vis besmet is met het ISA-virus. De lidstaten zien erop toe dat, indien vis in een kwekerij ervan wordt verdacht met het ISA-virus te zijn besmet, zo snel mogelijk een officieel onderzoek wordt ingesteld om de aanwezigheid van de ziekte te bevestigen of uit te sluiten, waarbij de inspecties en klinische onderzoeken evenals het verzamelen en selecteren van monsters en de methoden voor laboratoriumonderzoek worden uitgevoerd zoals voorgeschreven in de delen III en VI van deze bijlage. Teneinde de aanwezigheid van ISA officieel te bevestigen, moet zijn voldaan aan één van de drie groepen van criteria als vastgelegd in punt I.3 van deze bijlage.

**I.2. Vermoeden van besmetting met ISA**

I.2.1. Besmetting met ISA wordt vermoed indien aan ten minste één van de volgende criteria wordt voldaan:

- a) de autopsieresultaten wijzen op de aanwezigheid van ISA, met of zonder klinische tekenen van de ziekte. De autopsieresultaten en klinische symptomen van de ziekte moeten overeenkomen met die welke zijn vastgelegd in de huidige editie van het „Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases” (Diagnostische Handleiding voor Ziekten van Waterdieren) van het OIE;
- b) het ISA-virus is geïsoleerd en geïdentificeerd in een celweek van een enkel monster van een willekeurige vis in de kwekerij zoals beschreven in deel III;

- c) er bestaat redelijk bewijs voor de aanwezigheid van het ISA-virus, afkomstig van twee onafhankelijke laboratoriumtests, zoals RT-PCR (deel IV) of IIFT (deel V);
- d) levende vissen zijn overgebracht naar een kwekerij, ten aanzien waarvan op basis van redelijke gronden het vermoeden bestaat dat deze besmet was met ISA op het moment van overbrengen;
- e) een onderzoek heeft andere significante epidemiologische banden aan het licht gebracht met kwekerijen waar besmetting met ISA wordt vermoed of is bevestigd.

I.2.2. De aanwezigheid van ISA kan worden uitgesloten als vervolgonderzoek in de vorm van ten minste één klinische inspectie per maand gedurende een periode van zes maanden geen verdere significante aanwijzingen voor de aanwezigheid van ISA oplevert.

### I.3. *Bevestiging van ISA*

De aanwezigheid van ISA wordt als bevestigd beschouwd indien aan de criteria volgens a), b) of c) is voldaan:

- a) klinische symptomen en autopsieresultaten worden waargenomen die wijzen op ISA volgens de meest recente uitgave van het „Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases” van het OIE, met inbegrip van dode, verzwakte of zich abnormaal gedragende vissen, symptomen van anemie en andere autopsieresultaten en pathologische veranderingen, waarna het ISA-virus wordt opgespoord door middel van een van de volgende methoden:
  - i) het isoleren en identificeren van het ISA-virus in een celkweek van ten minste één monster van een willekeurige vis uit de kwekerij zoals beschreven in deel III,
  - ii) het opsporen van het ISA-virus door middel van RT-PCR volgens de methoden beschreven in deel IV,
  - iii) het opsporen van het ISA-virus in weefsels of weefselpreparaten door middel van specifieke antilichamen tegen het ISA-virus (bijvoorbeeld IIFT op nierafdrukken, zoals beschreven in deel V);
- b) het isoleren en identificeren van het ISA-virus in twee monsters van een of meer vissen van de kwekerij, onderzocht bij verschillende gelegenheden volgens de methode beschreven in deel III;
- c) het isoleren en identificeren van het ISA-virus uit ten minste een monster van een willekeurige vis van de kwekerij volgens de methode beschreven in deel III, aangevuld met ondersteunend bewijsmateriaal voor de aanwezigheid van het ISA-virus in weefselpreparaten van iedere willekeurige vis van de kwekerij, verkregen door middel van RT-PCR (deel IV) of IIFT (deel V).

### I.4. *Criteria voor het instellen en opheffen van bestrijdingsgebieden en officiële toezichtsgebieden naar aanleiding van een vermoedelijke uitbraak of de bevestiging van ISA*

I.4.1. Om een op risico-evaluaties gebaseerd officieel toezichtsprogramma op te zetten, moeten de lidstaten in de omgeving van een kwekerij waar besmetting met ISA officieel wordt vermoed of is bevestigd, adequate bestrijdings- en toezichtsgebieden instellen.

I.4.2. De in te stellen gebieden moeten worden gedefinieerd op basis van een voor elk individueel geval gemaakte analyse van het risico van verdere verspreiding van de ziekte. In overeenstemming met de epizoötiologische situatie wordt het betreffende stroomgebied of kustgebied:

- aangemerkt als bestrijdingsgebied; of
- kan het, in het geval van zeer grote stroomgebieden of kustgebieden, worden verdeeld in een bestrijdingsgebied en een toezichtsgebied als de preventie van de verspreiding van ISA daardoor niet in gevaar wordt gebracht.

Verder kunnen, naar behoefte, buiten het stroomgebied of kustgebied extra toezichtsgebieden worden ingesteld.

I.4.3. De belangrijkste factoren waarmee rekening moet worden gehouden bij het instellen van de bovengenoemde gebieden, zijn de factoren die van invloed zijn op het risico dat de ziekte zich verspreidt naar gekweekte en wilde vissen, zoals: het aantal, het percentage en de verdeling van de sterfgevallen van vissen in de kwekerij waar de aanwezigheid van het ISA-virus wordt vermoed of is bevestigd; de oorzaak van de sterfgevallen in de betreffende kwekerij; de afstand tot andere kwekerijen en de dichtheid van de kwekerijen in de omgeving; de kwekerijen waarmee de betreffende kwekerij contacten had of heeft; de soorten die in de kwekerij worden gehouden; het beheer van de getroffen en naburige kwekerijen; de hydrodynamische omstandigheden en andere factoren van epidemiologisch belang, geïnventariseerd in het kader van het epizoölogisch onderzoek dat is uitgevoerd in overeenstemming met het bepaalde in artikel 5, lid 2, en artikel 8 van Richtlijn 93/53/EEG.

I.4.4. Voor het instellen van gebieden gelden de volgende minimumcriteria

I.4.4.1. Een „bestrijdingsgebied” moet door de lidstaat in de onmiddellijke nabijheid van een kwekerij waar de aanwezigheid van het ISA-virus is bevestigd, als volgt worden ingesteld:

- in kustgebieden: het gebied dat zich bevindt in een cirkel met een straal van ten minste één getijdenuitstroom of ten minste 5 km, in het midden waarvan zich de kwekerij bevindt waar de aanwezigheid van het ISA-virus is bevestigd, of een equivalent gebied bepaald op grond van de juiste hydrodynamische of epidemiologische gegevens; of
- in gebieden in het binnenland: het gehele stroomgebied van de kwekerij waar de aanwezigheid van het ISA-virus is bevestigd; de lidstaat mag, in grote stroomgebieden, de omvang van het gebied beperken tot delen van het stroomgebied, mits de preventie van de verspreiding van ISA niet in gevaar wordt gebracht.

I.4.4.2. Een „tijdelijk bestrijdingsgebied” moet worden ingesteld indien er een vermoeden bestaat van de aanwezigheid van ISA, op basis van dezelfde criteria als omschreven voor een „bestrijdingsgebied”.

I.4.4.3. Een „toezichtsgebied” moet door de lidstaat, indien nodig, buiten het bestrijdingsgebied worden ingesteld in gebieden waar een minder intensief toezicht voldoende wordt geacht; dit gebied komt overeen met:

- in kustgebieden: een gebied van overlappende getijdenuitstroomgebieden rond het bestrijdingsgebied; of een gebied rond het bestrijdingsgebied, dat zich bevindt in een cirkel met een straal van 10 km rond het midden van het bestrijdingsgebied; of een equivalent gebied bepaald op basis van de juiste hydrodynamische of epidemiologische gegevens; of
- in gebieden in het binnenland: indien nodig, een uitgebreid gebied buiten het ingestelde bestrijdingsgebied.

I.5. *Stilleggen van kwekerijen en weer opheffen van ingestelde gebieden*

I.5.1. De bevoegde instanties van de lidstaat zien erop toe dat alle kwekerijen in het bestrijdingsgebied, nadat alle vis is verwijderd en ze indien nodig zijn gedesinfecteerd, gedurende een adequate periode worden stilgelegd. De duur van deze periode van stillegging bedraagt bij kwekerijen waar de aanwezigheid van ISA is bevestigd, ten minste zes maanden. De duur van de periode van stillegging wordt voor andere kwekerijen in de bestrijdingsgebieden bepaald door de bevoegde instanties, op basis van een per geval bepaalde risicoanalyse. Als alle vis is verwijderd uit alle kwekerijen in het bestrijdingsgebied, worden alle kwekerijen gelijktijdig minimaal zes weken stilgelegd.

Verder kunnen de bevoegde instanties besluiten ook in de ingestelde toezichtsgebieden kwekerijen stil te leggen.

I.5.2. Bestrijdingsgebieden mogen, wanneer zij eenmaal zijn ingesteld, niet worden opgeheven en de kwekerijen daarin mogen niet opnieuw van vis worden voorzien tot alle vis uit alle kwekerijen in de gebieden is verwijderd, de kwekerijen indien nodig zijn gedesinfecteerd en de kwekerijen volgens punt I.5.1 gedurende een bepaalde periode zijn stilgelegd. Als de kwekerijen in de gebieden opnieuw van vis worden voorzien, worden de bestrijdingsgebieden omgezet in toezichtsgebieden zoals vastgelegd in punt I.4.4.3.

I.5.3. Tijdelijke bestrijdingsgebieden mogen wanneer ze eenmaal zijn ingesteld, niet worden opgeheven tot het vermoeden van ISA is uitgesloten in overeenstemming met het bepaalde in punt I.2.2. Indien de aanwezigheid van ISA wordt bevestigd volgens het bepaalde in punt I.3 wordt het tijdelijke bestrijdingsgebied omgezet in een bestrijdingsgebied.

I.5.4. Toezichtsgebieden mogen, wanneer zij eenmaal zijn ingesteld, niet worden opgeheven tot twee jaar na het opheffen van het bestrijdingsgebied.

I.6. *Officieel toezicht naar aanleiding van een vermoedelijke uitbraak of de bevestiging van ISA*

I.6.1. Onder verwijzing naar artikel 5, lid 2, en artikel 6 van Richtlijn 93/53/EEG en met het doel zicht te krijgen op de verspreiding en ontwikkeling van de ziekte naar aanleiding van een vermoedelijke uitbraak of de bevestiging van ISA in een kwekerij, moet door de bevoegde instanties of door een gekwalificeerde gezondheidsdienst voor de visserij in samenwerking met en onder auspiciën van de bevoegde instanties een op een risicoanalyse gebaseerd officieel toezichtsprogramma worden uitgevoerd bij alle kwekerijen in de ingestelde gebieden.

I.6.2. Om een dergelijk officieel toezichtsprogramma te kunnen uitvoeren moeten de bevoegde instanties, indien nodig aan de hand van een controle ter plaatse, alle kwekerijen in de ingestelde gebieden identificeren en een officiële inventarisatie maken van de soorten, categorieën en aantallen vissen in de kwekerijen, met inbegrip van de sterftecijfers.

- I.6.3. Na de eerste officiële inventarisatie moeten de kwekerijen in de ingestelde tijdelijke bestrijdingsgebieden die Atlantische zalm (*salmo salar*) houden — of enige andere soort die in de meest recente uitgave van de „Aquatic Animal Health Code” (Kwaliteitscode voor Waterdieren) van het OIE wordt genoemd als gevoelig voor of mogelijk drager van ISA — om de 14 dagen aan de bevoegde instanties verslag uitbrengen over de sterftecijfers. Verhoogde sterftecijfers moeten per dag en per kweekbassin worden gerapporteerd. De bevoegde instanties onderzoeken dan elk geval van significant toegenomen sterfte bij een kwekerij.

Als het vermoeden wordt bevestigd, moeten alle kwekerijen in het ingestelde bestrijdingsgebied wekelijks aan de bevoegde instanties verslag uitbrengen over de sterftecijfers, per dag en per kweekbassin.

De kwekerijen in de toezichtsgebieden moeten om de 14 dagen aan de bevoegde instanties verslag uitbrengen over de sterftecijfers.

Verder worden het hele jaar door regelmatig controles uitgevoerd in de ingestelde gebieden, met de frequentie zoals aangegeven in tabel 1. Als klimatologische omstandigheden dit gedurende een deel van het jaar onmogelijk maken, kunnen de lidstaten in een noodplan andere controlefrequenties vastleggen.

Tabel 1

Officieel toezichtsprogramma

Ligging van de kwekerij	Minimumaantal controles per jaar	Minimumaantal controles per jaar nadat het bestrijdingsgebied is opgeheven
Bestrijdingsgebied	12	
Toezichtsgebied	6	6
Tijdelijk bestrijdingsgebied	6	

Dit toezichtsprogramma wordt uitgevoerd totdat de gebieden worden opgeheven.

- I.6.4. De controles, evenals het selecteren, verzamelen, voorbereiden en verzenden van monsters, moeten worden uitgevoerd conform het bepaalde in de punten II.1 t/m II.4. Het onderzoek van de monsters wordt uitgevoerd conform het bepaalde in de delen III en VI.

## II. Controle en bemonstering

### II.1. Het controleren, selecteren en verzamelen van monsters bij een kwekerij waar de aanwezigheid van ISA wordt vermoed

II.1.1. Bij de regelmatige controles in het kader van het officiële toezichtsprogramma als omschreven in punt I.6, bij kwekerijen waarvan wordt vermoed dat ze met ISA zijn besmet, worden alle kwekerij-installaties (bassins, tanks en vijvers) gecontroleerd op de aanwezigheid van dode, verzwakte of zich abnormaal gedragende vissen. Indien mogelijk worden recente sterfgevallen (dieren die nog niet in staat van ontbinding verkeren) evenals verzwakte en zich abnormaal gedragende vissen onderzocht op klinische symptomen of autopsieresultaten die wijzen op ISA, zoals omschreven in de meest recente editie van het „Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases” van het OIE.

II.1.2. Indien recente klinische symptomen die wijzen op ISA worden waargenomen, of indien een inspecteur of dierenarts enige andere reden heeft om te vermoeden dat de vis kan zijn besmet, worden monsters van minimaal tien vissen genomen. Daarbij worden indien mogelijk zowel recente sterfgevallen, verzwakte vissen als zich abnormaal gedragende vissen bemonsterd. Als er onvoldoende vissen met klinische symptomen van de ziekte zijn, wordt het aantal volgemaakt met gezonde vissen uit de bassins, tanks en vijvers met de grootste aantallen sterfgevallen of vissen met klinische symptomen van de ziekte.

II.1.3. Indien recente sterfgevallen of verzwakte of zich abnormaal gedragende vissen worden waargenomen, maar de klinische symptomen en autopsieresultaten niet wijzen op ISA, hoeven geen monsters te worden genomen; het staat de inspecteur of dierenarts echter wel vrij om te bepalen hoeveel monsters nodig zijn om een differentiële diagnose te stellen.

II.1.4. Indien vis in de vrije natuur ervan worden verdacht besmet te zijn met ISA, zullen de lidstaten erop toezien dat geschikte monsters worden genomen en dat deze volgens de juiste klinische en laboratoriumtechnische methoden worden onderzocht, zoals vastgelegd in de delen II, III en VI, teneinde de aanwezigheid van ISA te bevestigen of uit te sluiten en te beoordelen of de aanwezigheid van de ziekte een significante bedreiging vormt voor de vis in de kwekerijen.

## II.2. *Het voorbereiden van de vismonsters*

II.2.1. Monsters voor histologisch onderzoek worden alleen genomen van vers gedode vissen die klinische symptomen of autopsieresultaten vertonen die wijzen op de aanwezigheid van de ziekte. Van alle eventuele externe en interne laesies worden monsters genomen, evenals in elk geval van de lever, het middendeel van de nier, het hart en de milt van individuele vissen. Daarbij wordt gebruikgemaakt van een scalpel. De monsters worden overgebracht in een 8-10 % (v/v) gebufferde formaldehydeoplossing. De verhouding fixeermiddel-weefsel moet ten minste 20:1 zijn, om van een goede preservering van de weefsels verzekerd te zijn.

II.2.2. Van alle bemonsterde vissen moeten weefselmonsters bestemd voor virologisch onderzoek worden genomen. Duplicaatmonsters worden genomen om de analyseresultaten eventueel te kunnen bevestigen. Van de lever, de voornier, het hart en de milt van de vis worden met een steriel instrument delen verwijderd en overgebracht in kunststoffen buisjes met 9 mm transportoplossing, dat wil zeggen een medium voor celkweek met antibiotica. Een mengsel van 12,5 µg ml<sup>-1</sup> fungizone, 200 IU ml<sup>-1</sup> polymixine B en 200 µg ml<sup>-1</sup> kanamycine is daarvoor geschikt, maar andere combinaties die doeltreffend zijn gebleken, mogen eveneens worden gebruikt. De weefsels van maximaal vijf vissen mogen in een enkel buisje met transportoplossing worden verzameld en gelden dan als een mengmonster. Het gewicht van de weefsels in een enkel monster moet 1,0 ± 0,5 g bedragen.

II.2.3. Nierafdrukken (kidney imprints) voor IIFT-onderzoek mogen alleen worden genomen van verse vis, d.i. binnen twee uren na de dood. Daarbij wordt een stuk van het middendeel van de nier genomen met behulp van steriele instrumenten. Het weefsel wordt op absorberend papier afgedept om overtollig bloed te verwijderen, en wordt dan herhaaldelijk tegen een met poly-L-lysine gecoat glasplaatje gedrukt. De afzonderlijke afdrukken moeten zich naast elkaar bevinden en mogen elkaar niet overlappen, zodanig dat een continue enkele laag cellen ontstaat. Bloed en weefselvocht zijn voor deze test niet relevant. Het niermonster mag niet op het absorberende papier blijven liggen zodat het „leegloopt”, omdat dit kan leiden tot bloedstolling, waarbij grote hoeveelheden eiwitten uit het serum op het testglasje terecht kunnen komen. De imprints worden aan de lucht gedroogd en vervolgens koel en droog bewaard als ze niet onmiddellijk worden gefixeerd. Het fixeren van de imprints moet echter binnen 72 uur na het bemonsteren van de vis worden uitgevoerd. Als alternatief mogen de imprints na het drogen aan de lucht worden bevroren en zo gedurende maximaal één maand bij -20 °C worden bewaard alvorens te worden gefixeerd.

II.2.4. Vissen die symptomen van anemie vertonen, kunnen worden verdoofd, waarna direct gehepariniseerde bloedmonsters kunnen worden genomen voor hematologisch onderzoek, zoals het bepalen van het hematocrietgehalte.

II.2.5. Van alle bemonsterde vis wordt weefsel genomen voor analyse met behulp van RT-PCR. Daarbij wordt met behulp van een steriel instrument een stukje van het voorste deel of van het middendeel van de nier van de vis verwijderd en overgebracht in een microfugebuisje dat 1 ml bevat van een RNA-preserverende oplossing waarvan de werking is aangetoond. In een enkel buisje met preserverende oplossing mag weefsel van maximaal vijf vissen worden verzameld; dit geldt dan als een mengmonster. Het gewicht van de weefsels in een buisje moet ongeveer 0,5 g bedragen. Als de vissen te klein zijn om monsters met het benodigde gewicht te verkrijgen, kunnen extra delen van de nieren, het hart, de milt, de lever of de pylorische caeca worden genomen (in deze voorkeursvolgorde) om tot een totaal van 0,5 g te komen.

## II.3. *Het vervoeren van de vismonsters*

II.3.1. Bloedmonsters en buisjes met visweefsel voor virologisch onderzoek of RT-PCR-analyse moeten in geïsoleerde containers (bijvoorbeeld dikwandige dozen van polystyreenschuim) worden vervoerd, met voldoende ijs of koelementen om de koeling van de monsters gedurende het vervoer naar het laboratorium te garanderen. Voorkomen moet worden dat de monsters bevriezen, maar wanneer de monsters in het laboratorium aankomen, moet nog wat ijs aanwezig zijn of moeten een of meer van de koelementen nog deels bevroren zijn. In uitzonderlijke omstandigheden mogen monsters voor RT-PCR-analyse en monsters voor virologisch onderzoek momentaan worden ingevroren en bij -20 °C of een lagere temperatuur naar het laboratorium worden vervoerd.

II.3.2. De glasplaatjes voor IIFT-onderzoek moeten in daartoe geëigende houders worden vervoerd met voldoende droogmiddel om de imprints droog en gekoeld te houden, zoals hierboven is omschreven.

II.3.3. Als vismonsters voor histologisch onderzoek in fixeermiddel worden vervoerd, moeten ze worden vervoerd in niet-lekkende buisjes in stootbestendige containers, zoals dikwandige dozen van polystyreenschuim.



- II.3.4. Tenzij de monsters zijn ingevroren, moet het virologisch onderzoek zo snel mogelijk beginnen, en in elk geval niet later dan 72 uur nadat de monsters zijn genomen. De voor controletests bestemde monsters worden bij aankomst in het laboratorium opgeslagen bij - 20 °C of lager.
- II.3.5. Hele vissen kunnen eveneens naar het laboratorium worden vervoerd, vooropgesteld dat aan de temperatuurvereisten van punt II.3.1 voor het transport kan worden voldaan. Hele vissen worden daartoe in absorberend papier gewikkeld en in plastic zakken vervoerd, gekoeld zoals hierboven vermeld.
- II.3.6. Ook levende vissen kunnen worden vervoerd, maar dan alleen onder toezicht van de officiële dienst.
- II.3.7. Bij de RT-PCR-analyse van weefsels die zijn bewaard in RNAlater, moet het RNA worden geëxtraheerd binnen een bepaalde tijd die afhankelijk is van de temperatuur waarbij de monsters worden opgeslagen. Deze tijden zijn:
- bij 37 °C één dag,
  - bij 25 °C één week,
  - bij 4 °C één maand,
  - bij - 20 °C oneindig.
- II.3.8. Alle verpakkings- en etiketteringshandelingen moeten worden uitgevoerd in overeenstemming met de terzake geldende nationale en internationale vervoersregelgeving.

II.4. *Het verzamelen van aanvullend diagnosemateriaal*

Als het diagnostisch laboratorium daarmee akkoord gaat, kunnen andere vismonsters worden genomen en voorbereid voor aanvullend onderzoek.

### III. **Virologisch onderzoek**

III.1. *Het voorbereiden van de monsters*

III.1.1. Als zich praktische moeilijkheden voordoen die het onmogelijk maken cellen binnen 72 uur na het nemen van de monsters te enten, is het toegestaan de weefsels bij - 80 °C gedurende maximaal 28 dagen ingevroren te bewaren. Voorafgaand aan het onderzoek mogen de weefsels slechts eenmaal worden bevroren en ontdooid.

III.1.2. Elk monster (bestaande uit weefsels in een transportoplossing) moet met behulp van een stomacher, een mixer of in een vijzel met stamper volledig worden gehomogeniseerd en daarna bij 2 000-4 000 g gedurende 15 minuten worden gecentrifugeerd bij 0-6 °C, waarna het supernatant wordt gefiltreerd (0,45 µm) en wordt geïncubeerd met een gelijk volume van een passend verdund mengsel van antisera tegen de inheemse serotypen van het IPN-virus. De titer van het antiserum moet ten minste 1:2 000 bedragen in een 50-procentige plaqueneutralisatietest. Het mengsel moet vervolgens gedurende 1 uur bij 15 °C worden geïncubeerd. Dit is het inoculum.

Het doel van het behandelen van alle inocula met antiserum tegen het IPN-virus (een virus dat in sommige delen van Europa in 50 % van alle vismonsters voorkomt) is te voorkomen dat CPE in geënte celkweken optreedt als gevolg van de aanwezigheid van het IPN-virus. Daardoor wordt de duur van het virologisch onderzoek bekort en het aantal gevallen verkleind waarbij CPE moet worden beschouwd als mogelijke aanwijzing dat het ISA-virus aanwezig is.

Als de monsters afkomstig zijn van productiebedrijven die als vrij van het IPN-virus worden beschouwd, kan het behandelen van de inocula met antisera tegen het IPN-virus achterwege blijven.

III.2. *Het enten van de celkweken*

III.2.1. SHK-1-cellen (aantal overentingen 80 of kleiner) of TO-cellen moeten worden gecultiveerd in een L-15-medium dat 5 % serum van runderfoetussen bevat, 2 vol-% 200 mM L-glutamine en 0,08 vol-% 50 mM 2-mercapto-ethanol in platen met twaalf of 24 putjes. Andere cellijnen kunnen ook worden gebruikt als de effectiviteit en gevoeligheid voor het isoleren van het ISA-virus daarvan is aangetoond, waarbij de stamvariabiliteit in acht moet worden genomen, evenals het vermogen van verschillende stammen zich in verschillende cellijnen te vermenigvuldigen. Een orgaansuspensie die met antiserum is behandeld, moet door enten worden ingebracht in jonge, actief groeiende celkweken teneinde een eindoplossing van weefselmateriaal in het kweekmedium te geven van 1:1 000. Voor elke orgaansuspensie moet 40 µl inoculum worden toegevoegd aan een putje dat 2 ml kweekmedium bevat. Om de kans op kruisbesmetting zo klein mogelijk te houden, wordt aanbevolen gescheiden platen met twaalf of 24 putjes te gebruiken voor monsters afkomstig van verschillende kwekerijen.



III.2.2. Eén plaat moet ongeënt blijven om als negatieve controle te dienen. Een andere plaat moet worden geënt met een referentie-isolaat van het ISA-virus om als positieve controle te dienen. Dit gebeurt als volgt: 100 µl van een moederstampreparaat van het ISA-virus (minimale titer  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) wordt in het eerste putje geënt, waarna goed wordt gemengd. Een deel hiervan wordt uit het eerste putje overgebracht naar het tweede putje om een verdunning van 1:10 te bereiden, waarna weer goed wordt gemengd. Dat wordt voor een aantal putjes op de plaat herhaald, zodat er zes decimale verdunningen zijn. Moederstam-ISA-virus mag bij - 80 °C gedurende ten minste twee jaar worden bewaard, maar als het eenmaal is ontdooid moet het binnen drie dagen worden gebruikt. Opmerking: draag er zorg voor dat kruisbesmetting van de testplaten met het referentiemateriaal wordt voorkomen. Daartoe moeten de positieve controles gescheiden worden gehouden van de testplaten.

III.2.3. De monsters moeten bij  $14 \pm 2$  °C gedurende maximaal 15 dagen worden geïncubeerd.

### III.3. *Microscopische waarnemingen*

Met behulp van een microscoop worden de celkweken tweemaal op CPE onderzocht, vijf tot zeven dagen na het enten en twaalf tot 14 dagen na het enten. Als een van de kweken CPE vertoont, moet onmiddellijk worden begonnen met het identificeren van het virus (III.6). Als op dag 14 nog geen CPE wordt waargenomen, moet een hemadsorptieproef (III.4) worden uitgevoerd.

### III.4. *Hemadsorptie*

De vermeerdering van het ISA-virus in celkweken leidt niet altijd tot CPE. Derhalve moet elk putje worden onderworpen aan een hemadsorptieproef zoals hierna beschreven; als alternatief kan ook met elk putje een IF-test worden uitgevoerd zoals beschreven in punt III.6.1.

III.4.1. Het celkweekmedium wordt uit elk putje verwijderd, ook uit die met de positieve en de negatieve controles, en in geëtiketteerde steriele reageerbuisjes gedaan. Aan elk putje wordt 500 µl van een 0,2 % (v/v) suspensie van gewassen rode bloedlichaampjes van konijn of paard toegevoegd, of een 0,05 % (v/v) suspensie van gewassen rode bloedlichaampjes van regenboogforel of Atlantische zalm, waarna gedurende 45 minuten bij kamertemperatuur wordt geïncubeerd. De rode bloedlichaampjes worden dan verwijderd en elk putje wordt tweemaal gewassen met L-15-medium. Elk putje wordt vervolgens onderzocht met een microscoop.

III.4.2. De aanwezigheid van rode bloedlichaampjes, gehecht aan het oppervlak van de SHK-1- of TO-cellen, is een aanwijzing dat mogelijk een besmetting met een orthomyxovirus is opgetreden. Als de hemadsorptieproef positief uitvalt, moet onmiddellijk een virusidentificatietest worden uitgevoerd (III.6).

### III.5. *Doorkweek en overentingen*

III.5.1. Doorkweek moet tussen dag 13 en dag 15 worden uitgevoerd. Daarbij wordt 225 µl van het supernatant van de kweek toegevoegd aan de putjes van platen met twaalf putjes waarin zich verse, actief groeiende SHK-1-cellen bevinden, waarna gedurende maximaal 18 dagen bij  $14 \pm 2$  °C wordt geïncubeerd. Met behulp van een microscoop worden de celkweken dan tweemaal op CPE onderzocht, eenmaal vijf tot zeven dagen na het enten en eenmaal na 14 tot 18 dagen. Als in een kweek CPE wordt aangetroffen, moet onmiddellijk worden begonnen met virusidentificatietests (III.6). Als ook na 14 tot 18 dagen geen CPE wordt gevonden, moet een hemadsorptieproef worden uitgevoerd (III.4).

III.5.2. Als zich in de eerste zeven dagen na het enten cytotoxiciteit voordoet, moet in dat stadium een doorkweek worden uitgevoerd, en de cellen moeten dan gedurende 14 tot 18 dagen worden geïncubeerd en opnieuw doorgeweekt in een tweede 14- tot 18-daagse incubatieperiode. Als zich pas na zeven dagen cytotoxiciteit voordoet, moet eenmaal een doorkweek worden uitgevoerd; de cellen worden dan geïncubeerd tot het totaal van 28 tot 36 dagen incubatie is bereikt sedert het eerste enten.

III.5.3. Als zich in de primaire kweek een bacteriële verontreiniging voordoet, moet de test worden overgedaan met het weefselhomogenaat dat bij - 80 °C is bewaard. Voorafgaand aan het enten wordt het weefselhomogenaat bij 4 000 g gedurende 30 minuten bij 0-6 °C gecentrifugeerd, waarna het supernatant bij 0,22 µm wordt gefiltreerd. Als de bacteriële verontreiniging zich gedurende de doorkweekstap voordoet, moet het supernatant bij 0,22 µm worden gefiltreerd, op verse cellen worden geënt en gedurende een extra 14 tot 18 dagen worden geïncubeerd.

### III.6. Virusidentificatietests

Als zich op enig moment CPE voordoet, of als een hemadsorptieproef positief uitvalt, moet een virusidentificatietest worden uitgevoerd. Voor het identificeren van ISA-virus verdienen IF (III.6.1) en RT-PCR (deel IV) de voorkeur. Als wordt vermoed dat andere virussen aanwezig kunnen zijn, wordt aanbevolen extra virusidentificatietests uit te voeren. Als het met behulp van deze tests niet mogelijk is binnen een week tot een definitieve identificatie van het virus te komen, moet het supernatant worden doorgestuurd naar een nationaal referentielaboratorium of naar het EU-referentielaboratorium voor visziekten voor onmiddellijke identificatie.

#### III.6.1. IF

III.6.1.1. SHK-1-cellen (80 overentingen of minder) of TO-cellen moeten worden gecultiveerd in een L-15-medium dat 5 % serum van runderfoetussen bevat, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamine en 0,08 % (v/v) 50 mM 2-mercapto-ethanol, in platen met 24 of 96 putjes, en worden gebruikt met een confluïentie van meer dan 50 %. Andere cellijnen of kweekmedia mogen worden gebruikt als de effectiviteit daarvan is aangetoond. 225 µl supernatant van een kweek die vermoedelijk met het virus is geïnfecteerd, wordt toegevoegd aan telkens twee putjes, waarna wordt gemengd en 225 µl wordt overgebracht naar nog eens twee putjes om verdunningen van 1:5 te bereiden. Twee extra putjes blijven ongeënt om te dienen als controle. De monsters van verschillende kwekerijen moeten op aparte platen worden onderzocht, evenals het controlemateriaal. Als controle wordt een referentiestam van het ISA-virus gebruikt.

III.6.1.2. De platen worden bij  $14 \pm 2$  °C geïncubeerd en gedurende maximaal zeven dagen met behulp van een microscoop onderzocht. Daarna worden ze gefixeerd. Daartoe worden de putjes gewassen met PBS en gefixeerd door incuberen met 80 % aceton, gedurende 20 minuten bij kamertemperatuur. De platen worden dan aan de lucht gedroogd en ofwel onmiddellijk gekleurd ofwel bij 0-6 °C gedurende niet meer dan 24 uur bewaard alvorens te worden gekleurd.

III.6.1.3. Duplo-putjes worden gekleurd met het monoklonale antilichaam 3H6F8 tegen ISA-virus, of met een ander monoklonaal antilichaam waarvan de effectiviteit en specificiteit zijn aangetoond, en vervolgens verdund in PBS en bij  $37 \pm 4$  °C gedurende 30 minuten geïncubeerd. De monoklonale antilichamen worden dan verwijderd en de platen worden driemaal met 0,05 % Tween-20 in PBS gewassen. Dan wordt een anti-muis IgG-FITC-conjugaat, verdund in PBS, aan elk putje toegevoegd, waarna bij  $37 \pm 4$  °C gedurende 30 minuten wordt geïncubeerd. Opmerking: de verdunningen van de verschillende batches monoklonaal antilichaam en FITC-conjugaat moeten in elk laboratorium worden geoptimaliseerd. Antilichamen moeten worden verwijderd en de platen moeten driemaal worden gewassen met 0,05 % Tween-20 in PBS.

III.6.1.4. De putjes worden onmiddellijk onderzocht met behulp van een omgekeerde microscoop voor fluorescentiemicroscopie en voorziet van een geschikt filter voor de excitatie van FITC. Het resultaat is positief als fluorescerende cellen worden waargenomen. Een test is slechts geldig als de positieve controles ook positief zijn en de negatieve negatief.

### IV. Monsters onderzoeken met behulp van RT-PCR

IV.1. *In dit punt worden de procedures beschreven die moeten worden gevolgd om een deel van segment 8 van het ISA-virus-genoom te versterken door middel van een PCR die kan worden uitgevoerd op visweefsel of het ISA-virus in een kweek*

#### IV.1.1. RNA-extractie

- a) RNAlater wordt uit elk monster verwijderd. Dan wordt 1 ml met DEPC behandeld dH<sub>2</sub>O aan elke buis toegevoegd, waarna de buisjes bij 13 000 rpm en 0-6 °C gedurende vijf minuten worden gecentrifugeerd.
- b) Het supernatant wordt van elk monster verwijderd, waarna 800 µl TRIzol (Invitrogen), of een alternatief reagens waarvan is aangetoond dat de werkzaamheid even groot of groter is, aan elk monster wordt toegevoegd, evenals aan een controlebuisje dat een geschikt controlemateriaal bevat (400 µl dH<sub>2</sub>O of een nierhomogenaat van een SPF-vis). Indien nodig worden de weefsels opengebrouwen door herhaald pipetteren. De buisjes worden dan bij kamertemperatuur gedurende vijf minuten geïncubeerd. Vervolgens wordt aan elk buisje 160 µl chloroform toegevoegd, waarna de buisjes gedurende drie minuten stevig worden geschud en dan bij 13 000 rpm en 0-6 °C gedurende 15 minuten gecentrifugeerd.
- c) De waterige bovenste laag wordt overgebracht in een geëtiketteerd microfugebuisje van 1,5 ml waarin zich 500 µl isopropanol bevindt, waarna de buisjes gedurende tien minuten bij kamertemperatuur worden geïncubeerd en dan bij 6 500 rpm en 0-6 °C gedurende 15 minuten gecentrifugeerd.

- d) Het supernatant wordt verwijderd en 1 ml 75 % ethanol wordt toegevoegd aan het RNA-neerslag (pellet). De buisjes worden dan bij 6 500 rpm en 0-6 °C gedurende vijf minuten gecentrifugeerd.
- e) Het supernatant wordt verwijderd en de buisjes blijven gedurende ongeveer drie minuten open staan zodat de achterblijvende alcohol kan verdampen. Dan wordt 15 µl met DEPC behandelde dH<sub>2</sub>O toegevoegd om het pellet opnieuw in suspensie te brengen, waarbij indien nodig kort wordt rondgeschud.
- f) Een spectrofotometer wordt gebruikt om de RNA-concentratie en de zuiverheid van de monsters te bepalen. De optische dichtheden worden bij 260 en 280 nm gemeten.
- g) RNA dat onmiddellijk (dezelfde dag nog) zal worden gebruikt, kan tijdelijk bij 0-6 °C worden opgeslagen. RNA dat niet meteen wordt gebruikt, moet bij - 80 °C worden bewaard.

#### IV.1.2. RT

- a) In met DEPC behandeld dH<sub>2</sub>O in een microfugebuisje van 1,5 ml wordt 2 µg RNA opgelost. Als de RNA-concentratie in het monster te laag is om 2 µg voor de RT-reactie te gebruiken, wordt de maximale hoeveelheid RNA gebruikt. Het verdunde RNA wordt gedurende tien minuten bij 55-60 °C geïncubeerd.
- b) De buisjes die RNA bevatten, worden dan in ijs geplaatst, waarna RT-reagentia worden toegevoegd tot eindconcentraties van 1 × buffer, 1 mM dNTPs, 100 ng willekeurige hexameren, 20 U RNase-inhibitor en 200 U MMLV-RT in een totaal volume van 20 µl.
- c) De buisjes worden gedurende een uur bij 37 °C geïncubeerd.
- d) Het cDNA wordt bij 0-6 °C opgeslagen tot het nodig is voor gebruik, en wordt dan zo snel mogelijk voor PCR gebruikt.

#### IV.1.3. PCR

- a) Aan 45 µl PCR-mengsel wordt 5 µl cDNA toegevoegd zodat een totale concentratie van 1 × buffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM van elke dNTP, 25 pmol van elke primer en 1 U Taq-polymerase wordt bereikt. De primers zijn ISA + (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (forward primer) en ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverse primer). Voor de extractie-, RT- en PCR-stappen moeten ook negatieve controles worden uitgevoerd.
- b) De buizen worden in een temperatuuroscylusapparaat geplaatst dat is geprogrammeerd op 94 °C gedurende vijf minuten, gevolgd door 35 cycli van 94 °C gedurende één minuut, 55 °C gedurende één minuut en 72 °C gedurende één minuut, en met een laatste incubatiestap van vijf minuten bij 72 °C.
- c) De resultaten van de PCR-stap moeten worden beoordeeld na elektroforese met een 2-procentige agarosegel die is gemerkt met ethidiumbromide en die naast de monsters en de negatieve controles van de RT- en PCR-stappen is voorzien van afstandsmarkeringen. Een enkel PCR-product van 155 bp wordt geacht de aanwezigheid van RNA van het ISA-virus aan te geven. Monsters die daarnaast één ander product bevatten, van 310 bp, worden ook geacht ISA-virus-RNA te bevatten. Monsters waaruit meer PCR-producten voortkomen, inclusief ten minste één van ongeveer 155 bp, kunnen RNA van het ISA-virus bevatten. Deze kunnen nader worden onderzocht met behulp van DNA-probes of nucleotide-sequencing.

#### IV.1.4. Bevestigen, met PCR, van isolatie van het ISA-virus in weefselkweken

Als een volledige CPE is opgetreden gedurende het virologisch onderzoek van weefselmonsters in SHK-1-cellen, wordt 400 µl supernatant uit het putje verwijderd en in een steriele buis van 1,5 ml overgebracht. Uit dit monster wordt dan RNA geëxtraheerd zoals beschreven in punt III.1, waarna een RT-PCR-proef wordt uitgevoerd. Als kweken zonder volledige CPE worden gebruikt, wordt het supernatant verwijderd, waarna de cellen van de wand van het putje of de kolf worden geschraapt en in een steriele buis van 1,5 ml worden gebracht voor RNA-extractie en een RT-PCR-proef.

#### IV.1.5. Bevestigen van PCR-producten met behulp van DNA-probes

- a) De specificiteit van een PCR-product van 155 bp kan worden beoordeeld door vergelijking met een probe van een oligonucleotide dat hybridiseert aan een deel van het PCR-product dat zich binnen de primers bevindt. De PCR-producten worden daartoe, met een positieve en de negatieve controles uit de RT- en PCR-stappen, onderworpen aan elektroforese in een 1-procentige agarosegel die is voorzien van afstandsmarkeringen.

- b) Het DNA wordt met behulp van Southern blotting op een membraan aangebracht en het gelabelde oligonucleotide (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') wordt dan met het membraan geïncubeerd na de juiste prehybriseringsstappen.
- c) Niet-gebonden en niet-specifiek gebonden probes worden dan van het membraan gewassen, waarna de gebonden probes zichtbaar worden.
- d) De probe die zich bindt aan een fragment van 155 bp (en van 310 bp indien aanwezig) geldt als aanwijzing dat de PCR-stap specifiek was en geeft aan dat RNA van het ISA-virus in het monster aanwezig was.

#### IV.1.6. Nucleotide-sequencing op PCR-producten

De specificiteit van de PCR-stap kan worden beoordeeld door de nucleotidevolgorde van het PCR-product van 155 bp te onderzoeken.

- a) Het PCR-product wordt gezuiverd, dat wil zeggen ontdaan van de agarosegel of -oplossing.
- b) Van het fragment wordt de nucleotidevolgorde bepaald met behulp van dezelfde primers als bij de PCR-reactie werden gebruikt, of met vectorprimers indien die voorafgaand aan de sequencing tot een vector zijn gekloond.
- c) De nucleotidevolgorde wordt vergeleken met die van segment 8 van het ISA-virus zoals deze is vastgelegd in de EMBL-nucleotidevolgorde-database (toegangsnummers Y10404, AJ012285 en AJ242016).
- d) De aanwezigheid van een volgorde die overeenkomt met die van segment 8 van het ISA-virus geeft aan dat het monster RNA van het ISA-virus bevatte.

### V. IIFT-onderzoek van kidney imprints (nierafdrukken)

V.1. *Het volgende protocol is vastgesteld voor IIFT-onderzoek van nierafdrukken*

V.2. *Het voorbereiden en kleuren van de imprints*

V.2.1. De glasplaatjes worden gedurende drie minuten in aceton of methanol/aceton (1:1) gefixeerd en dan aan de lucht gedroogd. Voordat een plaatje wordt gekleurd, wordt het onderzocht en worden de geschikte gebieden op het plaatje omcirkeld met een ImmEdge™-pen of een vergelijkbare marker, waarna ze aan de lucht worden gedroogd. De plaatjes worden vervolgens in een blokkeeroplossing (6 % afgeroomde melk in PBS met 0,2 % Tween-20) geplaatst en onder zacht schudden gedurende 30 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd. Dan laat men elk plaatje afdruipe, waarna het horizontaal wordt neergezet in een houder voor plaatjes die nat vloeipapier bevat, zodat een vochtige atmosfeer wordt gehandhaafd.

V.2.2. Elke imprint wordt vervolgens ondergedompeld in een oplossing van monoklonale antilichamen 3H6F8 tegen het ISA-virus (of een ander antilichaam waarvan de specificiteit en effectiviteit zijn aangetoond), waarna de plaatjeshouder wordt gesloten en onder schudden gedurende 60 minuten bij kamertemperatuur wordt geïncubeerd. De antilichamen moeten normaal gesproken tot 1:10 à 1:100 worden verdund in 1 % afgeroomde melk, maar de precieze verdunning moet voor elke batch afzonderlijk worden bepaald. De plaatjes worden dan driemaal gedurende twee minuten gewassen in PBS met 0,1 % Tween-20. Elke imprint wordt vervolgens ondergedompeld in een oplossing van FITC-geitanti-muis-conjugaat in een verdunning van 1:1 000 in 1 % afgeroomde melk, waarna in een vochtige omgeving gedurende 60 minuten bij kamertemperatuur wordt geïncubeerd. Daarna worden de plaatjes driemaal gedurende twee minuten gewassen met PBS met 0,1 % Tween-20. Dan worden de plaatjes gedurende tien minuten ondergedompeld in een Citifluor™-oplossing (500 µl Citifluor™ gemengd met 1,5 ml PBS met 0,1 volume-% Tween-20) of een ander geschikt fixeermiddel. De plaatjes worden driemaal gewassen in PBS met 0,1 % Tween-20. Als een contrakleuring nodig is, kan elke imprint worden ondergedompeld in propidiumjodide (0,01 mg/ml) in PBS met 0,1 % Tween-20 en vervolgens gedurende drie minuten bij kamertemperatuur wordt geïncubeerd. De plaatjes worden driemaal gedurende twee minuten gewassen in PBS met 0,1 % Tween-20. Dan laat men de plaatjes afdruipe en worden ze gefixeerd in Citifluor™ of een ander geschikt fixeermiddel. De plaatjes worden voorafgaand aan het microscopisch onderzoek in het donker bij 4 °C opgeslagen.

V.3. *Onderzoek met behulp van fluorescentiemicroscopie*

Elk plaatje wordt onderzocht onder een microscoop die geschikt is voor epifluorescerende verlichting, gebruikmakend van een geschikt filter dat FITC exciteert zodat het de karakteristieke groene fluorescerende kleur uitstraalt. Alle gebieden die met de ImmEdge™-pen zijn aangegeven, moeten met  $\times 10$ - en  $\times 20$ -objectieven worden onderzocht, en verdachte gebieden (waar een groene fluorescentie te zien is) moeten nader worden onderzocht onder een  $\times 40$ -objectief met fase/fluorescentieverlichting om vast te stellen of de fluorescentie afkomstig is van de cellen. De coördinaten van de verdachte gebieden worden genoteerd zodat later de aard van de fluorescentie door een tweede onderzoeker kan worden bevestigd. Na het onderzoek door de eerste laborant worden de plaatjes waarop zich verdachte gebieden bevinden, opnieuw onderzocht door een tweede laborant om de resultaten te verifiëren en eventueel te bevestigen.

#### V.4. Referentiematerialen

V.4.1. Bij elke batch plaatjes met IIFT-kleuring moeten drie soorten referentiemateriaal worden meegenomen:

- kidney imprints van niet-besmette Atlantische zalm (negatieve controle);
- een niet-besmette SHK-1-celkweek of een kweek van andere gevoelige cellen (negatieve controle);
- een met het ISA-virus besmette SHK-1-celkweek of een besmette kweek van andere gevoelige cellen (positieve controle).

V.4.2. Indien deze beschikbaar is, wordt aanbevolen ook een kidney imprint in de tests mee te nemen van een met het ISA-virus besmette Atlantische zalm, als extra positieve controle.

V.4.3. Als een positief resultaat wordt verkregen voor een van de negatieve controles, moet het onderzoek voor alle plaatjes als mislukt worden beschouwd. Als alle plaatjes, inclusief de positieve controles, negatieve resultaten te zien geven, moet het onderzoek eveneens voor alle plaatjes als mislukt worden beschouwd. Als mislukte controles het onderzoek hebben doen mislukken, moeten alle betrokken plaatjes worden vernietigd en moet een nieuw onderzoek worden uitgevoerd met de duplo-imprints.

#### V.5. Het onderzoeken van andere weefsels

Deze technieken kunnen ook op andere weefsels van vis worden toegepast, zoals van de lever, de milt en het hart, vooropgesteld dat een redelijke hoeveelheid endotheliale cellen, leukocyten en lymfocyten op het plaatje kan worden gebracht. De werkwijze voor het kleuren blijft voor alle weefsels dezelfde, hoewel het bij sommige weefsels de voorkeur kan verdienen het kleuren met propidiumjodide achterwege te laten en te vertrouwen op de faseverlichting om de celsoorten in de imprint te identificeren.

### VI. Histologie

In paraffine ingebedde doorsneden worden in plakjes van 5 µm gesneden en gekleurd met hematoxyline en eosine. De histologische veranderingen die samenhangen met ISA worden beschreven in de huidige editie van het „Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases” van het OIE.

### VII. Acroniemen en afkortingen

cDNA	complementair deoxyribonucleïnezuur
CPE	cytopathologisch effect
DEPC	diëthylpyrocarbonaat
dNTP	deoxynucleotidtrifosfaat
FITC	fluoresceïne-isothiocyanaat
IF	immunofluorescentie
IIFT	indirecte immunofluorescentietest
OIE	Internationaal Bureau voor Besmettelijke Veeziekten
IPN(V)	infectieuze pancreatische necrose (virus)
ISA(V)	infectieuze zalmanemie (virus)
PBS	phosphate buffered saline (met fosfaat gebufferde zoutoplossing)
RNA	ribonucleïnezuur
RT-(PCR)	reverse transcriptase (polymerase chain reaction)
SHK-1	salmon head kidney cells
TCID <sub>50</sub>	tissue culture infective dose at the 50 % end point (weefselkweek-infectiedosis op het 50-procentpunt)