

32003D0466

25.6.2003

URADNI LIST EVROPSKE UNIJE

L 156/61

**ODLOČBA KOMISIJE****z dne 13. junija 2003****o merilih za določanje območij in ukrepov uradnega nadzora potem, ko se pojavi sum ali potrdi prisotnost infekciозна anemije lososa (ISA)***(notificirano pod dokumentarno številko K(2003) 1831)***(Besedilo velja za EGP)**

(2003/466/ES)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

virusom infekciозна anemije lososa (ISA), pod uradnim nadzorom. Treba je določiti merila za določanje območij in ukrepe uradnega nadzora.

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 91/67/EGS z dne 28. januarja 1991 o pogojih v zvezi z zdravstvenim varstvom živali, ki urejajo dajanje živali in proizvodov iz ribogojstva na trg <sup>(1)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Uredbo (ES) št. 806/2003 <sup>(2)</sup>, in zlasti člena 15 Direktive,

- (4) Zaradi opredelitve programov vzorčenja in diagnostičnih metod za ugotavljanje in potrjevanje ISA in določitev meril za določanje območij in ukrepov uradnega nadzora, kadar obstaja sum na ISA ali je le-ta potrjena, je bilo opravljeno posvetovanje s strokovnjaki za zdravstveno varstvo rib in laboratorijske preskuse. Nadalje je treba upoštevati tudi smernice za diagnostiko ISA, določene v sedanji izdaji Priročnika za diagnosticiranje bolezni vodnih živali Mednarodnega urada za epizootije (OIE).

ob upoštevanju Direktive Sveta 93/53/ES z dne 24. junija 1993 o uvedbi minimalnih ukrepov Skupnosti za nadzor nad nekaterimi boleznimi školjk <sup>(3)</sup>, kakor je bila spremenjena z Odločbo Komisije 2001/288/ES <sup>(4)</sup>, in zlasti člena 5(2) in člena 6 Direktive,

- (5) Za izvedbo teh novih zahtev je treba zagotoviti dovolj časa.

ob upoštevanju naslednjega:

- (6) Ukrepi, določeni v tej odločbi, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravstveno varstvo živali –

- (1) Direktiva 93/53/EGS določa, da se vzorčenje in laboratorijsko testiranje na prisotnost bolezni s seznama I in seznama II (ki sta navedena v Prilogi A k Direktivi 91/67/EGS), izvajata s pomočjo metod, določenih v skladu s členom 15 Direktive 91/67/EGS.

SPREJELA NASLEDNJO ODLOČBO:

- (2) Programi vzorčenja in diagnostične metode za ugotavljanje in potrjevanje nekaterih bolezni rib s seznama II, virusne hemoragične septikemije (VHS) in infekciозна hematopoetske nekroze (IHN) so določeni v Odločbi Komisije 2001/183/ES <sup>(5)</sup>.

**Člen 1**

- (3) V skladu s členom 5(2) in členom 6 Direktive 93/53/EGS so vse ribogojnice, ki se nahajajo v območju istega območja povodja ali obalnega območja, na katerem se nahaja ribogojnica, za katero se sumi, da je okužena ali za katero je potrjeno, da je okužena z

Programi vzorčenja in diagnostične metode za ugotavljanje in potrjevanje infekciозна anemije lososa (ISA), kakor tudi merila za določanje območij in ukrepe uradnega nadzora, če gre za sum ali potrditev ISA, so določeni v Prilogi k tej odločbi.

**Člen 2**

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

Ta odločba se uporablja od 23. oktobra 2003.

*Člen 3*

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 13. junija 2003

*Za Komisijo*  
David BYRNE  
*Član Komisije*

---

## PRILOGA

**Programi vzorčenja in diagnostične metode za ugotavljanje in potrjevanje infekciозна anemije lososa (ISA) in merila za določanje območij in ukrepe uradnega nadzora, če gre za sum ali potrditev ISA.**

## UVOD IN OPREDELITEV POJMOV

Ta priloga:

- (a) določa smernice in minimalne zahteve za programe vzorčenja in diagnostične metode za ugotavljanje in potrjevanje prisotnosti ISA;
- (b) vključuje določbe in opredelitve, določene v Direktivi 91/67/EGS in Direktivi 93/53/EGS;
- (c) predpisuje določbe za pravilno diagnozo, obvladovanje in nadzorovanje ISA, če gre za sum ali potrditev ISA;
- (d) je naslovljena na organe, odgovorne za obvladovanje ISA, in laboratorijsko osebje, ki opravlja preskuse v zvezi s to boleznijo. Poudarek je na postopkih vzorčenja, načelih za izvajanje laboratorijskih preskusov in njihovi uporabi ter oceni rezultatov, kakor tudi podrobnih laboratorijskih tehnikah. Kadar je to primerno, lahko laboratoriji dopolnijo preskuse, opisane v tej prilogi, ali uporabijo druge preskuse, če lahko dokažejo, da je občutljivost in specifičnost teh preskusov enaka ali višja. Poleg tega se določijo merila za določanje območij in ukrepe uradnega nadzora, ki jih je treba uvesti potem, ko se pojavi sum ali potrdi prisotnost ISA. V tej prilogi se uporabljajo naslednje dodatne opredelitve pojmov:

„Območje povodja“ pomeni celotno območje povodja od izvirov vodotokov do njihovega ustja ali del območja povodja od izvira vodotoka do naravne ali umetne ovire, ki preprečuje ribam, da bi migrirale prek te ovire.

„Obalno območje“ pomeni del obalnih ali morskih voda ali ustje vodotoka, ki je natančno geografsko omejeno in sestavljeno iz homogenega hidrodinamičnega sistema ali niza takih sistemov.

Del I določa splošna načela in merila za diagnostiko in potrditev ISA ter merila za določanje območij in ukrepe uradnega nadzora, ki jih je treba uvesti potem, ko se pojavi sum ali se potrdi ISA.

Del II določa nadzor in vzorčenje, ki se izvaja zaradi ugotavljanja prisotnosti ISA.

Del III določa metode za virološko preiskavo.

Del IV predstavlja postopek za pregled vzorcev s pomočjo RT-PCR za ugotavljanje ISA.

Del V opisuje protokol, ki ga je treba uporabiti pri pregledu odtisov ledvičnega tkiva z metodo IFAT (IIF-indirektna imunofluorescenca) v zvezi z ISA.

Del VI vsebuje metodologijo za histologijo.

Del VII navaja seznam uporabljenih kratic in okrajšav.

**I. Merila za diagnostiko ISA in določanje območij ter uvedbo nekaterih ukrepov za obvladovanje in uradni nadzor****I.1 Splošna načela za diagnozo ISA**

Razlogi za utemeljen sum okužbe z virusom ISA so navedeni v delu I.2 te priloge. Države članice zagotovijo izvedbo uradne preiskave, ko se pojavi sum, da so ribe v ribogojnici okužene z virusom ISA, zaradi čim prejšnje potrditve ali izključitve prisotnosti bolezni, pri čemer uporabijo preglede in klinične preiskave, kakor tudi odvzem in odbiro vzorcev ter metode za laboratorijske preskuse, določene v delu III-VI te priloge. Za uradno potrditev prisotnosti ISA, mora biti izpolnjen katerikoli od treh nizov meril, določenih v delu I.3 te priloge.

**I.2 Sum na okužbo z ISA**

I.2.1 Na prisotnost ISA se sumi, če je izpolnjeno vsaj eno od naslednjih meril:

- (a) ugotovitve patoanatomske preiskave ustrezajo ISA, z ali brez kliničnih znakov bolezni. Ugotovitve patoanatomske preiskave in klinični znaki bolezni so v skladu s tistimi, določenimi v sedanjih izdaji Priročnika za diagnosticiranje bolezni vodnih živali OIE;
- (b) izolacija in identifikacija virusa ISA v celični kulturi iz enega samega vzorca katere koli ribe v ribogojnici, kakor je opisano v delu III;

- (c) utemeljeni dokazi prisotnosti virusa ISA dveh neodvisnih laboratorijskih preskusov, kot sta RT-PCR (del IV) in IFAT (del V);
- (d) prenos živih rib v ribogojnico, kadar obstaja utemeljen sum, da je bil v času prenosa rib prisotna ISA;
- (e) kadar preiskava ugotovi druge pomembne epidemiološke povezave z ribogojnicami, za katere se sumi, da so okužene ali je okužba z ISA potrjena.

I.2.2 Sum na ISA je izključen, kadar se z nadaljnjimi preiskavami, ki vsebujejo vsaj en klinični pregled na mesec v obdobju šestih mesecev, ugotovi, da ni drugih dokazov o prisotnosti ISA.

### I.3 Potrditev ISA

Šteje se, da je prisotnost ISA potrjena, če so izpolnjena merila v (a) ali (b) ali (c):

- (a) če so ugotovljeni klinični znaki in rezultati patoanatomske preiskave v skladu z ISA po sedanji izdaji Priročnika za diagnosticiranje boleznih vodnih živali OIE, vključno z mrtvimi in slabotnimi ribami ali ribami z neobičajnim vedenjem, znaki anemije, drugimi ugotovitvami patoanatomske preiskave in patološkimi spremembami, z eno ali več naslednjimi metodami:
  - (i) izolacija in identifikacija virusa ISA v celični kulturi vsaj iz enega vzorca katere koli ribe v ribogojnici, kakor je opisano v delu III;
  - (ii) detekcija virusa ISA s pomočjo RT-PCR z metodami, opisanimi v delu IV;
  - (iii) detekcija virusa ISA v tkivnih ali tkivnih pripravkih s pomočjo specifičnih protiteles proti virusu ISA (npr. IFAT pri odtisih ledvičnega tkiva, kakor je opisano v delu V);
- (b) izolacija in identifikacija virusa ISA v dveh vzorcih iz ene ali več rib v ribogojnici, preskušanih ob različnih priložnostih s pomočjo metode, opisane v delu III;
- (c) izolacija in identifikacija virusa ISA iz najmanj enega vzorca katere koli ribe v ribogojnici s pomočjo metode, opisane v delu III, z dodatnimi potrditvami virusa ISA v tkivnih pripravkih iz katere koli ribe v ribogojnici s pomočjo RT-PCR (del IV) ali IFAT (del V).

### I.4 Merila za določanje območij in preklic območij za nadzor in uradni nadzor ogroženih območij, ko se pojavi sum ali potrdi ISA.

I.4.1 Zaradi uvedbe uradnega programa nadzora na podlagi tveganja države članice vzpostavijo ustrezna nadzorovana območja in ogrožena območja pod nadzorom v bližini ribogojnice, za katero se uradno sumi ali za katero je potrjeno, da je okužena z ISA.

I.4.2 Območja, ki naj se določijo, so opredeljena glede na posamično analizo tveganja za nadaljnje širjenje bolezni. V skladu z epizootiološkim stanjem se zadevno območje povodja ali obalno območje:

- opredeli kot nadzorovano območje ali
- se lahko v obsežnih območjih povodij ali obalnih območjih razdeli v nadzorovano območje in ogroženo območje, če to ne ogroža preprečevanje širjenja ISA. Poleg tega se lahko zunaj povodja ali obalnega območja po potrebi določijo dodatna ogrožena območja.

I.4.3 Glavni dejavniki, ki jih je treba upoštevati pri določitvi zgoraj navedenih območij, so tisti, ki vplivajo na tveganje za širjenje bolezni na gojene in prostoživeče ribe, kot so: število, stopnja in porazdelitev smrtnosti rib v ribogojnici, za katero se sumi ali je potrjeno, da je okužena z virusom ISA; vzrok smrtnosti v zadevni ribogojnici; oddaljenost od sosednjih ribogojnic in gostota le-teh; ribogojnice v stiku z okuženimi ribogojnicami; vrste, prisotne v ribogojnicah; upravljanje prizadetih in sosednjih ribogojnic; hidrodinamični pogoji in drugi epidemiološko pomembni dejavniki, opredeljeni v okviru epizootske preiskave, izvedene v skladu s členoma 5(2) in 8 Direktive 93/53/EGS.

I.4.4 Za vzpostavitev območij se uporabljajo naslednja minimalna merila:

I.4.4.1 Država članica vzpostavi „nadzorovano območje“ v bližini ribogojnice, za katero je potrjeno, da je okužena z virusom ISA, in sicer:

- na obalnih območjih: območje v krogu s polmerom, ki obsega vsaj območje plimovanja ali vsaj 5 km, s središčem v ribogojnici, za katero je potrjeno, da je okužena z virusom ISA, ali enakovredno območje, določeno v skladu z ustreznimi hidrodinamičnimi ali epidemiološkimi podatki, ali
- na celinskem območju: celotno območje povodja ribogojnice, za katero je potrjeno, da je okužena z virusom ISA; država članica lahko v obsežnem območju povodja omeji obsežnost območja na dele območja povodja, če to ne ogroža preprečevanje širjenja ISA.

I.4.4.2 „Začasno nadzorovano območje“ se določi v primeru suma na prisotnost ISA na podlagi enakih meril, kot so navedena za nadzorovano območje.

I.4.4.3 Država članica po potrebi vzpostavi „ogroženo območje“ zunaj nadzorovanega območja na območjih, kjer je manj intenziven nadzor sprejemljiv in zajema:

- na obalnih območjih: območje, ki obkroža nadzorovano območje prekrivajočih se območij plimovanja, območje, ki obkroža nadzorovano območje in je vključeno v krogu s polmerom 10 km od središča nadzorovanega območja ali enakovredno območje, določeno glede na ustrezne hidrodinamične ali epidemiološke podatke, ali
- na območju celine: če je potrebno, kot razširjeno območje zunaj določenega nadzorovanega območja.

#### I.5 Izpraznitev in preklic vzpostavljenih območij

I.5.1 Pristojni organ države članice zagotovi, da za vse ribogojnice znotraj nadzorovanega območja velja ustrezno obdobje nenaseljenosti, potem ko so bile izpraznjene oziroma razkužene. Obdobje nenaseljenosti v ribogojnicah, za katere je potrjeno, da so okužene z ISA, ni manjše od šest mesecev. Trajanje obdobja nenaseljenosti za druge ribogojnice na nadzorovanih območjih določi pristojni organ na podlagi ocene tveganja za vsak posamičen primer. Ko so izpraznjene vse ribogojnice na nadzorovanem območju, se vzpostavi obdobje vsaj šest tednov sinhronizirane nenaseljenosti

Poleg tega se lahko pristojni organ odloči o izpraznitvi ribogojnic v vzpostavljenih ogroženih območjih.

I.5.2 Vzpostavljena nadzorovana območja se ne smejo preklicati in ponovno naseliti, dokler niso bile vse ribogojnice v teh območjih izpraznjene, po potrebi razkužene in zanje velja izpraznitev v skladu z I.5.1. Kadar se izvaja ponovna naselitev območij, se nadzorovana območja spremenijo v ogrožena območja, kot je to določeno v 1.4.4.3.

I.5.3 Vzpostavljena začasna nadzorovana območja se ne smejo preklicati, dokler ni bil izključen sum na ISA v skladu z delom I.2.2. V primeru potrditve ISA v skladu z delom I.3, se začasno nadzorovano območje spremeni v nadzorovano območje.

I.5.4 Vzpostavljena ogrožena območja se ne smejo preklicati pred pretekom dveh let po preklicu nadzorovanega območja.

#### I.6 Uradni nadzor po sumu ali potrditvi ISA

I.6.1 Glede na člena 5(2) in 6 Direktive 93/53/EGS in zaradi ugotovitve razširjenosti in razvoja bolezni po sumu ali potrditvi ISA v ribogojnici, mora pristojni organ ali usposobljene službe za zdravstveno varstvo rib v vseh ribogojnicah v vzpostavljenih območjih izvesti uradni program nadzora na podlagi tveganja s posvetovanjem pristojnega organa in pod njegovim nadzorom.

I.6.2 Za namene uporabe takega uradnega programa nadzora mora pristojni organ, če je treba z pregledom na mestu samem, identificirati vse ribogojnice v vzpostavljenih območjih in opraviti uradni popis vrst, kategorij in števila rib v ribogojnicah, vključno s podatki o smrtnosti.

- I.6.3 Po prvem uradnem popisu ribogojnice znotraj začasnih nadzorovanih območij, ki gojijo atlantskega lososa (*Salmo salar*) ali katero koli drugo vrsto, navedeno v najnovejši izdaji *Zakonika o zdravstvenem varstvu vodnih živali* OIE kot dovzetno za ali možno prenašalko ISA, vsakih 14 dni poročajo pristojnemu organu o številu poginulih rib. O povečanju smrtnosti poročajo na dan in na kletko. Pristojni organ opravi preiskavo za vsako pomembno povečanje smrtnosti v ribogojnici.

Če je sum potrjen, vse ribogojnice v vzpostavljeni nadzorovanem območju tedensko poročajo pristojnemu organu o smrtnosti po kletki in po dnevu.

Ribogojnice v nadzornih območjih poročajo pristojnemu organu o številu poginulih rib vsakih 14 dni.

Pregledi v vzpostavljenih območjih se opravljajo redno vse leto in tako pogosto, kot je navedeno v Tabeli 1. Kadar pa zaradi podnebnih pogojev taki pregledi niso možni med delom leta, lahko države članice določijo drugačno pogostnost pregledov v načrtu ukrepov ob nepredvidljivih dogodkih.

Tabela 1

#### Uradni program nadzora

Lokacija ribogojnice	Najmanjše število pregledov na leto	Najmanjše število pregledov na leto po preključitvi nadzorovanega območja
Nadzorovano območje	12	
ogroženo območje	6	6
Začasno nadzorovano območje	6	

Program nadzora se izvaja, dokler se območja ne prekličejo.

- I.6.4 pregledi, kakor tudi odbira, odvzem, priprava in pošiljanje vzorcev se izvajajo, kakor je določeno v delih II.1 do II.4. Pregled vzorcev je v skladu z deli III do VI.

## II. pregled in vzorčenje

### II.1 Pregled odbira in odvzem vzorcev v ribogojnici, za katero se sumi na prisotnost ISA

- II.1.1 Pri rednih pregledih, izvedenih v okviru uradnega programa nadzora, navedenega v delu I.6, in v ribogojnicah, za katere se sumi, da so okužene z ISA, se vsi objekti v ribogojnici (kletke, bazeni, ribniki) pregledajo, da se ugotovi prisotnost mrtvih, slabotnih rib ali rib z neobičajnim vedenjem. Kadar je možno, se nedavno poginule ribe (ki še niso razkrojene), slabotne ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem pregledajo zaradi ugotovitve kliničnih znakov ali ugotovitev patoanatomske preiskave ki ustrezajo ISA, kakor je opisano v zadnji izdaji Priročnika OIE za diagnosticiranje bolezni vodnih živali.

- II.1.2 Če so opaženi nedavni klinični znaki, ki ustrezajo ISA, ali pa ima inšpektor ali veterinar kak drug razlog, da sumi, da bi ribe lahko bile okužene, se vzorči najmanj 10 rib. Kadar je to možno, je vzorec sestavljen iz nedavno poginulih rib in slabotnih rib ali rib z neobičajnim vedenjem. Če ni dovolj klinično prizadetih rib, se število rib v vzorcu dopolni z zdravimi ribami, odbranimi iz kletk, bazenov ali ribnikov, ki kažejo najvišjo smrtnost, ali ribami, ki kažejo klinične znake bolezni.

- II.1.3 Če so opažene nedavno poginule ribe ali slabotne ribe ali ribe z neobičajnim vedenjem, klinični znaki in ugotovitve patoanatomske preiskave pa niso v skladu z ISA, vzorčenje ni obvezno, čeprav se taki vzorci, kot so lahko potrebni za diferencialno diagnozo, vzamejo po presoji inšpektorja ali veterinarja.

II.1.4 Kadar obstaja sum, da so prostoživeče ribe okužene z ISA, države članice zagotovijo odvzem ustreznih vzorcev in njihov pregled z ustreznimi kliničnimi in laboratorijskimi metodami, določenimi v delih II do VI, da bi izključili ali potrdili prisotnost ISA in ocenili, ali pojav bolezni predstavlja znatno nevarnost za gojene ribe.

## II.2 Priprava vzorcev iz rib

II.2.1 Vzorce za histološko preiskavo vzamemo le iz sveže usmrčenih rib, ki kažejo klinične znake bolezni ali za katere so ugotovitve patoanatomske preiskave v skladu s prisotnostjo bolezni. Vse zunanje ali notranje rane vzorčimo in v vsakem primeru iz posamične ribe odstranimo vzorce jeter, srednjega dela ledvice, srca in vranice s pomočjo skalpela in prenesemo v pufersko solno raztopino z 8 do 10 % (vol/vol) formalina. Razmerje med fiksativom in tkivom mora biti najmanj 20:1, da lahko tkiva zadovoljivo ohranimo.

II.2.2 Tkiva za virološko preiskavo vzamemo iz vseh vzorčenih rib. Zaradi potrditve vzamemo dvojne vzorce. Koščke jeter, sprednjega dela ledvice, srca in vranice odstranimo s pomočjo sterilnega instrumenta in prenesemo v plastične epruvete, ki vsebujejo 9 ml transportne raztopine, t.j., gojišče celične kulture z antibiotiki. Kombinacija 12,5 µg ml<sup>-1</sup> fungizona, 200 IU ml<sup>-1</sup> polimiksina B in 200 µg ml<sup>-1</sup> kanamicina je primerna, vendar lahko uporabimo druge kombinacije z dokazano učinkovitostjo. Tkivo iz največ pet rib lahko zberemo v eni epruveti, ki vsebuje transportno raztopino, in predstavlja en skupni vzorec. Teža tkiva v enem vzorcu je 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3 Za preiskavo IFAT vzamemo odtise ledvičnega tkiva samo iz sveže usmrčenih rib, t.j. v dveh urah po smrti. S sterilno pripravo odstranimo košček srednjega dela ledvice. S tkiva popivnamo odvečno kri, nato pa ga večkrat pritisnemo na objektno stekelce, obloženo s poli-L-lizinom. Posamične odtise naredimo drug zraven drugega, vendar ne prekrivajoče, tako da dobimo nepretrgano enojno plast celic. Kri in tkivna tekočina nista ustrezna materiala za ta preskus. Vzorec ledvičnega tkiva ne smemo pustiti na pivniku, da se „odcedi“, kajti to lahko povzroči strjevanje krvi, kar pomeni, da se večje količine serumskih beljakovin odložijo na objektno stekelce. Odtise posušimo na zraku in nato hranimo na hladnem in suhem, če jih ni treba takoj fiksirati. Fiksacijo vzorčnega tkiva opravimo v 72 urah po vzorčenju rib. Odtise lahko tudi zamrzemo po sušenju z zrakom in shranimo do enega meseca pri -20 °C pred fiksacijo.

II.2.4 Ribe, ki kažejo znake anemije, lahko omamimo in takoj odvezamemo vzorce krvi za hematološko preiskavo, kot je merjenje hematokrita.

II.2.5 Tkivo za analizo RT-PCR odvezamemo iz vseh vzorčenih rib. S sterilnim instrumentom odvezamemo košček tkiva iz sprednjega ali srednjega dela ledvic in ga damo v mikrocentrifugirko, ki vsebuje 1 ml raztopine z dokazano učinkovitostjo za ohranjanje RNA. Tkivo največ pet rib lahko zberemo v eni epruveti, ki vsebuje raztopino za konzerviranje, in predstavlja en skupni vzorec. Teža tkiva v enem vzorcu je približno 0,5 g. Kadar so ribe premajhne za pridobitev vzorca zahtevane teže, se lahko odvezamejo koščki ledvic, srca, vranice, jeter ali piloričnega kanala, v tem vrstnem redu, da dosežemo 0,5 g.

## II.3 Pošiljanje vzorcev iz rib

II.3.1 Vzorce krvi in epruvete, ki vsebujejo tkiva rib za virološko preiskavo ali analizo RT-PCR, damo v izolirane posode (na primer polistirenske škatle z debelimi stenami) z dovolj ledu ali „ledenimi kockami“ za zagotovitev hlajenja vzorcev med prevozom v laboratorij. Izogniti se je treba zamrzovanju in led mora biti še vedno prisoten v škatli za prevoz pri sprejemu ali ena ali več ledenih kock mora biti še vedno delno ali popolnoma zamrznjena. V izjemnih okoliščinah lahko vzorce RT-PCR in vzorce za virološke preiskave zamrzemo in transportiramo v laboratorij pri -20 °C ali manj.

II.3.2 Objektna stekelca za IFAT pošljemo v ovitku z dovolj sušilnega sredstva, da odtisi ostanejo suhi in ohlajeni, kakor je navedeno zgoraj.

II.3.3 Če se tkivo prenaša v fiksativu za histološko preiskavo, se pošilja v zatesnjenih eprugetah v posodah, ki so odporne na udarce, kot na primer v polistirenskih škatlah z debelimi stenami.

- II.3.4 Razen če niso bili vzorci zamrznjeni, je treba začeti z virološko preiskavo čim prej in najpozneje v 72 urah po zbiranju vzorcev. Ob prihodu v laboratorij je vzorec za dodatno analizo shranjen pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ali manj.
- II.3.5 Cele ribe lahko transportiramo v laboratorij, če so med prevozom izpolnjene temperaturne zahteve, kakor je opisano v II.3.1. Cele ribe zavijemo v vpojni papir in pošljemo ohlajene v plastičnih vrečkah, kot je navedeno zgoraj.
- II.3.6 Žive ribe tudi lahko pošljemo vendar le pod nadzorom uradne službe.
- II.3.7 Za analizo tkiva RT-PCR, shranjenega v RNA*later*, moramo ekstrakcijo RNA za vzorce, shranjene pri različnih temperaturah, opraviti v določenem času. Ta čas je določen spodaj:
- |                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| — $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  | en dan        |
| — $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  | en teden      |
| — $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   | en mesec      |
| — $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ | nedoločen čas |
- II.3.8 Pakiranje in označevanje mora biti opravljeno v skladu s sedanjimi nacionalnimi oziroma mednarodnimi predpisi za prevoz.

#### II.4 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala

S soglasjem diagnostičnega laboratorija lahko zberemo druga tkiva rib in pripravimo za dodatni pregled.

### III. Virološka preiskava

#### III.1 Priprava vzorcev

- III.1.1 Kadar pride do praktičnih težav, zaradi katerih ni mogoče inokulirati celic v 72 urah po zbiranju vzorcev tkiv, je sprejemljivo tkivo zamrzniti pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do 28 dni. Pred pregledom tkivo lahko zamrznemo in odmrzemo le enkrat.
- III.1.2 Vsak vzorec (skupno tkivo v transportni raztopini) popolnoma homogeniziramo, pri čemer uporabimo drobilec Stomacher, mešalec ali terilnico in pestilo, centrifugiramo pri 2 000 do 4 000 x g 15 minut pri 0 do  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ , supernatant pa filtriramo ( $0,45\text{ }\mu\text{m}$ ) in inkubiramo z enakim volumnom primerno razredčenih protiserumov proti indigenim serotipom virusa IPN. Titer protiseruma mora biti vsaj 1:2 000 pri testu za nevtralizacijo plaka 50 %. Mešanico inkubiramo eno uro pri  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To predstavlja inokulum.

Namen obdelave vseh inokulov s protiserumom za virus IPN (virus, ki se v nekaterih delih Evrope pojavlja v 50 % vzorcev rib) je preprečevanje razvoja CPE v inokuliranih celičnih kulturah zaradi virusa IPN. To bo zmanjšalo trajanje viroloških preiskav kakor tudi število primerov, v katerih bi morali šteti pojav CPE kot morebitno indikacijo virusa ISA.

Kadar vzorci prihajajo iz proizvodnih enot, ki se štejejo za proste IPN, lahko opustimo pripravo inokulov s protiserumom za virus IPN.

#### III.2 Inokulacija celične kulture

- III.2.1 Celice SHK-1 (pasaža 80 ali manj) ali celice TO gojimo v gojišču L-15, ki vsebuje 5 % fetalnega bovina seruma, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamina in 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptetanola na mikroploščah s po 12 ali 24 jamicami. Uporabimo lahko druge celične linije z dokazano učinkovitostjo in občutljivostjo pri izolaciji virusa ISA z upoštevanjem variabilnosti sevov in sposobnosti različnih sevov, da se replicirajo v različnih celičnih linijah. Suspenzijo tkiva organa, obdelano s protiserumom, vcepimo v mlade celične kulture v fazi aktivne rasti, da dobimo končni razredčeni tkivni material v gojišču 1:1 000. Za vsak organ dodamo 40  $\mu\text{l}$  inokuluma v eno jamico, ki vsebuje 2 ml gojišča. Da bi najbolj zmanjšali tveganje za navzkrižno kontaminacijo, se priporoča uporaba ločenih plošč s po 12 ali 24 jamicami za vzorce iz različnih ribogojnic.



III.2.2 Ene plošče ne inokuliramo, da jo lahko uporabimo kot negativno kontrolo. Posebno ploščo inokuliramo z referenčnim izolatom virusa ISA kot pozitivno kontrolo na naslednji način: Sto  $\mu$ l pripravka standardnega virusa ISA (najmanjši titer  $10^7$  TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) inokuliramo v prvo jamico in dobro premešamo. Količino tega materiala prenesemo iz prve jamice v drugo, da dobimo razredčino 1:10 in dobro premešamo. To ponovimo po vsej plošči, da dobimo šest desetkratnih razredčin. Pripravek standardnega virusa ISA lahko shranimo pri - 80 °C najmanj dve leti, ko pa je odmrznjen, ga je treba uporabiti v treh dneh. Opomba: paziti moramo, da ne pride do navzkrižne kontaminacije testnih plošč s pozitivnim kontrolnim materialom. Da bi se izognili temu tveganju, pripravimo pozitivne kontrole in z njimi ravnamo ločeno od testnih plošč.

III.2.3 Vzorce inkubiramo pri  $14 \pm 2$  °C do 15 dni.

### III.3 Mikroskopija

Celične kulture dvakrat pregledamo pod mikroskopom na pojav CPE med petim in sedmim dnevom ter dvanajstim in štirinajstim dnevom po inokulaciji. Če katera koli mešanica pokaže CPE, takoj začnemo s postopkom identifikacije virusa (III.6). Če ne opazimo CPE do 14 dneva, opravimo hemadsorpcijski preskus (III.4).

### III.4 Hemadsorpcija

Replikacija virusa ISA v celičnih kulturah vedno ne povzroči CPE. Zato se za vsako jamico opravi hemadsorpcijski preskus, kakor je opisan spodaj, ali pa se za vsako jamico opravi IF preskus, kakor je opisano v III.6.1.

III.4.1 Gojišče celične kulture odstranimo iz vsake jamice, vključno tiste s pozitivnimi in negativnimi kulturami, in jih damo v označene sterilne epruvete. Petsto  $\mu$ l 0,2 % (v/v) suspenzije spranih eritrocitov kuncev ali konjev ali 0,05 % (v/v) suspenzije spranih eritrocitov šarenk ali atlantskega lososa dodamo v vsako jamico in inkubiramo pri sobni temperaturi 45 minut. Eritrocite odstranimo in vsako jamico dvakrat speremo z gojiščem L-15. Vsako jamico pregledamo pod mikroskopom.

III.4.2 Prisotnost skupinic eritrocitov, ki so pritrjene na površino SHK-1 ali TO celice, kaže na predvideno okužbo z ortomiksovirusom. Če je hemadsorpcijski preskus pozitiven, takoj opravimo postopek identifikacije virusa (III.6).

### III.5 Subkultivacija ali pasaža

III.5.1 Subkultivacija izvedemo med trinajstim in petnajstim dnevom. 225  $\mu$ l supernatanta kulture dodamo v jamice, ki vsebujejo sveže celice SHK-1 v fazi aktivne rasti, na ploščah po 12 jamic in inkubiramo pri  $14 \pm 2$  °C do 18 dni. Celične kulture dvakrat pregledamo pod mikroskopom na pojav CPE med petim in sedmim dnevom ter štirinajstim in osemnajstim dnevom po inokulaciji. Če katera koli mešanica pokaže CPE, takoj začnemo s postopkom za identifikacijo virusa (III.6). Če ne opazimo CPE med štirinajstim in osemnajstim dnevom, opravimo hemadsorpcijski preskus (III.4).

III.5.2 Če se pojavi citotoksičnost v prvih sedmih dneh inkubacije, se subkultivacija opravi v tej fazi in celice morajo biti inkubirane od 14 do 18 dni ter znova kultivirane na novem gojišču s ponovno inkubacijo od 14 do 18 dni. Če se po sedmih dneh pojavi citotoksičnost, izvedemo subkultivacijo enkrat in celice inkubiramo tako, da dobimo skupaj 28 do 36 dni inkubacije od prvotne inokulacije.

III.5.3 Če se v prvotni kulturi pojavi bakterijska kontaminacija, je treba znova pripraviti preskus, tako da uporabimo homogenat tkiv, shranjen pri - 80 °C. Pred inokulacijo centrifugiramo homogenat tkiv pri 4 000 x g 30 minut pri 0 do 6 °C in supernatant filtriramo pri 0,22  $\mu$ m. Če se pojavi bakterijska kontaminacija med subkultivacijo, supernatant filtriramo pri 0,22  $\mu$ m, ga inokuliramo v sveže celice in inkubiramo nadaljnih 14 do 18 dni.

### III.6 Preskusi za identifikacijo virusov

Če v tej fazi opazimo dokaze za CPE ali če je hemadsorpcijski preskus pozitiven, izvedemo identifikacijo virusa. Za identifikacijo virusa ISA izbiramo med metodama IF (III.6.1) in RT-PCR (del IV). Če obstaja sum na prisotnost drugih virusov, se priporoča, da se izvedejo dodatni preskusi za identifikacijo virusa. Če ti preskusi ne omogočijo dokončne identifikacije virusa v enem tednu, je treba supernatant poslati v nacionalni referenčni laboratorij ali v referenčni laboratorij EU za boleznih rib zaradi takojšnje identifikacije.

#### III.6.1 IF

III.6.1.1 Celice SHK-1 (pasaža 80 ali manj) ali celice TO se gojijo v gojišču L-15, ki vsebuje 5 % fetalnega bovina seruma, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamina in 0,08 % (v/v) 50 mM 2-merkaptotetanol na mikroploščah s po 24 ali 96 jamicami in se uporabljajo pri več kot 50 % konfluenci. Lahko uporabimo tudi druge celične linije ali gojišče z dokazano učinkovitostjo. 225 µl supernatanta kulture, ki je predvidoma okužena z virusom, dodamo v obe jamici, premešamo in 225 µl prenesemo v še dve jamici pri razredčini 1:5. Dve dodatni jamici pustimo za kontrolo in ju ne inokuliramo. Vzorce iz vsake ribogojnice damo na ločene plošče, kakor tudi kontrolne vzorce. Za kontrolo uporabimo referenčni izolat virusa ISA.

III.6.1.2 Plošče inkubiramo pri  $14 \pm 2$  °C in jih mikroskopsko pregledamo v obdobju do sedem dni. Kadar opazimo zgodnjo CPE ali če CPE ne opazimo v obdobju sedmih dni, je naslednji korak fiksacija. V tej fazi speremo jamice s PBS in jih fiksiramo z inkubacijo z 80 % acetonom 20 minut pri sobni temperaturi. Plošče posušimo na zraku in jih takoj obarvamo ali shranimo pri temperaturi 0 do 6 °C največ 24 ur pred barvanjem.

III.6.1.3 Replicirane jamice na mikroplošči obarvamo z monoklonalnimi protitelesom 3H6F8 proti virusu ISA ali drugim monoklonalnim protitelesom z dokazano učinkovitostjo in specifičnostjo, razredčimo v PBS in inkubiramo 30 minut pri  $37 \pm 4$  °C. Odstranimo monoklonalno protitelo in plošče trikrat speremo z 0,05 % Tween 20 v PBS. Vsaki jamici dodamo proti-mišji IgG, konjugiran s FITC, razredčen v PBS, in inkubiramo 30 minut pri  $37 \pm 4$  °C. Opomba: Vsak laboratorij optimizira razredčine različnih serij monoklonskega protitelesa in FITC konjugata. Odstranimo protitelo in plošče trikrat speremo z 0,05 % Tween 20 v PBS.

III.6.1.4 Takoj pregledamo jamice pod ivertnim mikroskopom za fluorescenčno mikroskopijo z ustreznim filtrom za ekscitacijo FITC. Preskus se šteje, da je pozitiven, če opazimo fluorescenčne celice. Da je test veljaven, mora biti rezultat pozitivne kontrole pozitiven in rezultat negativne kontrole negativen.

## IV. Pregled vzorcev s pomočjo RT-PCR

IV.1 V tem poglavju so opisani postopki, potrebni za pomnoževanje dela segmenta 8 genoma virusa ISA s PCR, ki se lahko izvedejo na ribjem tkivu ali virusu ISA v kulturi

### IV.1.1 Ekstrakcija RNA

- (a) Iz vsakega vzorca odstranimo RNA later. Vsaki epruveti dodamo 1 ml dH<sub>2</sub>O, obdelane z DEPC, in epruvete centrifugiramo pet minut pri 13 000 vrt./min pri 0 to 6 °C.
- (b) Supernatant odstranimo iz vsakega vzorca in vsakemu vzorcu in kontrolni epruveti, ki vsebuje ustreznih kontrolnih material (400 µl dH<sub>2</sub>O ali homogenata iz ledvic rib, ki nimajo povzročiteljev bolezni), dodamo 800 µl TRIzola (Invitrogen) ali alternativnega reagenta, ki je dokazano enake ali večje učinkovitosti. Če je treba, tkivo razrahljamo s ponovnim pipetiranjem. Epruvete inkubiramo pet minut pri sobni temperaturi. Vsaki epruveti dodamo 160 µl kloroforma in jih tri minute močno stresamo, nato pa 15 minut centrifugiramo pri 13 000 vrt./min pri 0 to 6 °C.
- (c) Zgornjo vodno plast odstranimo v označeno 1,5-ml mikrocentrifugirko, ki vsebuje 500 µl izopropanola, epruvete inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi in jih nato 15 minut centrifugiramo pri 6 500 vrt./min pri 0 to 6 °C.

- (d) Supernatant odstranimo in dodamo 1 ml 75 % etanola usedlini RNA. Epruvete nato centrifugiramo pet minut pri 6 500 vrt./min pri 0 to 6 °C.
- (e) Supernatant odstranimo in pustimo epruvete odprte približno tri minute, da izpari preostali etanol. Dodamo 15 µl dH<sub>2</sub>O, obdelane z DEPC, da ponovno suspendiramo usedlino in, če je treba, kratek čas vrtinčimo.
- (f) Spektrofotometer uporabimo za izračun koncentracije RNA in čistosti vzorcev. Optično gostoto merimo pri 260 in 280 nm.
- (g) RNA za takojšnjo uporabo (isti dan) lahko začasno shranimo pri 0 to 6 °C. RNA, ki se ne uporabi takoj, shranimo pri - 80 °C.

#### IV.1.2 RT

- (a) Dva µg RNA razredčimo v dH<sub>2</sub>O, obdelani z DEPC, v 1,5-ml mikrocentrifugirkah. Kadar je koncentracija RNA vzorca premajhna, da bi lahko uporabili 2 µg v reakciji RT, uporabimo največjo možno količino RNA. Razredčeno RNA inkubiramo 10 minut pri 55 do 60 °C.
- (b) Epruvete, ki vsebujejo RNA, damo na led in dodamo RT reagente, da dobimo končne koncentracije 1 x pufer, 1mM dNTP, poljubni heksameri 100 ng, RNase inhibitor 20 U in 200 U MMLV-RT v skupnem volumnu 20 µl.
- (c) Epruvete inkubiramo eno uro pri 37 °C.
- (d) cDNA hranimo pri 0 do 6 °C, dokler je treba, in jo čim prej uporabimo v PCR.

#### IV.1.3 PCR

- (a) Pet µl cDNA dodamo mešanici 45 µl PCR, da dobimo končne koncentracije 1x pufer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM vsak dNTP, 25 pmol vsak primer in 1U Taq polimeraza. Oligonukleotidni začetniki i so ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (začetni oligonukleotidni začetniki) in ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (reverzni oligonukleotidni začetnik. Vključimo negativne kontrole za ekstrakcijo na stopnjah RT in PCR.
- (b) Epruvete damo za pet minut v ciklični termostat, programiran pri 94 °C, čemur sledi 35 ciklov pri 94 °C eno minuto, 55 °C eno minuto in 72 °C eno minuto s končno inkubacijo pri 72 °C pet minut.
- (c) Rezultati PCR se ocenijo po elektroforezi s pomočjo 2 % agaroznega gela, obarvanega z etidijevim bromidom, ki vključuje označevalce velikosti vzdolž vzorcev in negativne kontrole za stopnji RT in PCR. Šteje se, da en sam produkt PCR 155 bp kaže na prisotnost RNA virusa ISA. Vzorca, ki vsebujejo dodatni produkt, 310 bp, se tudi štejejo, da vsebujejo RNA virusa ISA. Vzorca, ki dajo več produktov PCR, vključno z vsaj enim od približno 155 bp, lahko vsebujejo RNA virusa ISA. Ti se lahko dodatno pregledajo s pomočjo sonde DNA ali določanja zaporedja nukleotidov.

#### IV.1.4 Potrditev izolacije virusa ISA in tkivne kulture s pomočjo PCR

Če se je med virološkim pregledom vzorčnega tkiva v SHK-1 celicah pojavil popoln CPE, odstranimo 400 µl supernatanta iz jamic na mikroplošči in ga damo v sterilno 1,5-ml epruveto. Iz tega vzorca ekstrahiramo RNA kot pri III.1 in izvedemo RT-PCR. Če uporabimo kulture, kjer CPE ni popoln, odstranimo supernatant, celice postrgamo s površine jamice ali bučke in damo v sterilno 1,5-ml epruveto za ekstrakcijo RNA in RT-PCR.

#### IV.1.5 Potrditev produktov PCR s sondo DNA

- (a) Specifičnost 155 bp produkta PCR lahko ocenimo z oligonukleotidnimi sondami, ki hibridizirajo do mesta produkta PCR znotraj oligonukleotidnih začetnikov. Izvedemo elektroforezo produktov PCR v 1 % agaroznem gelu vzdolž označevalcev velikosti in pozitivno kontrolo ter negativne kontrole za stopnji RT in PCR.

- (b) DNA odtisnemo po Southernu na membrano in inkubiramo označeni oligonukleotid (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') z membrano po ustreznih stopnjah predhibridizacije.
- (c) Nevezane in nespecifično vezane sonde speremo z membrane in vezane sonde napravimo vidne.
- (d) Sonde, ki se vežejo na fragment 155 bp (in 310 bp, če je prisoten), so dokaz za specifičnost PCR in pomenijo, da je bila RNA virusa ISA prisotna v vzorcu.

#### IV.1.6 Določanje nukleotidnega zaporedja produktov PCR

Specifičnost PCR lahko ocenimo s pregledom nukleotidnega zaporedja 155 bp produkta PCR.

- (a) Produkt PCR očistimo iz agaroznega gela ali raztopine.
- (b) Zaporedje v fragmentu določimo z istimi oligonukleotidnimi začetniki, kakor so bili uporabljeni v PCR ali oligonukleotidni začetniki za vektor, če so klonirani v vektorju, preden je določeno zaporedje.
- (c) Nukleotidno zaporedje primerjamo s tistim za segment 8 virusa ISA, ki je na voljo v podatkovni bazi nukleotidnega zaporedja EMBL (vstopne številke Y10404, AJ012285, AJ242016).
- (d) Prisotnost zaporedja, ki ustreza tistemu iz segmenta 8 virusa ISA dokazuje, da je vzorec vseboval RNA virusa ISA.

### V. Pregled odtisov ledvičnega tkiva z metodo IFAT

#### V.1 Pripravljen je naslednji protokol za pregled odtisov ledvičnega tkiva z metodo IFAT

#### V.2 Priprava in barvanje odtisov

V.2.1 Stekelca tri minute fiksiramo v acetonu ali metanol/acetonu (1:1) in jih posušimo na zraku. Pred obarvanjem pregledamo vsako stekelce in ustrezna področja stekelca obkrožimo s pomočjo ImmEdge™ ali podobnega pisala in posušimo na zraku. Stekelca nato položimo v blokirno raztopino (6 % posneto mleko v PBS, ki vsebuje 0,2 % Tween 20) in inkubiramo z rahlim stresanjem 30 minut na sobni temperaturi. Vsako stekelce odcedimo in položimo vodoravno v posodo, ki vsebuje mokre robčke za vzdrževanje vlažne atmosfere.

V.2.2 Vsak odtis prelijemo z raztopino monoklonalnega protitelesa 3H6F8 proti virusu ISA (ali drugega protitelesa z dokazano specifičnostjo in učinkovitostjo) in zapremo posodo s stekelci ter inkubiramo s stresanjem 60 minut pri sobni temperaturi. Protiteleso običajno razredčimo pri 1:10 do 1:100 v 1 % posnetem mleku, vendar je treba dejansko razredčino določiti za vsako serijo. Stekelca speremo trikrat po dve minuti v PBS, ki vsebuje 0,1 % Tween 20. Vsak odtis prelijemo z raztopino, ki vsebuje kozji proti-mišji konjugat FITC, razredčen 1:1 000 v 1 % posnetem mleku, in inkubiramo v vlažnem okolju 60 minut pri sobni temperaturi. Stekelca speremo trikrat po dve minuti v PBS, ki vsebuje 0,1 % Tween 20. Vsak odtis prelijemo z raztopino CITIFLUOR™ (500 ul CITIFLUOR™ v zmesi z 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 v PBS) ali drugim primernim zaščitnim sredstvom za 10 minut. Stekelca speremo trikrat v PBS, ki vsebuje 0,1 % Tween 20. Če je potrebno nasprotno barvanje, lahko vsak odtis prelijemo s propidijevim jodidom (0,01 mg/ml) v PBS, ki vsebuje 0,1 % Tween 20, in inkubiramo tri minute pri sobni temperaturi. Stekelca speremo trikrat po dve minuti v PBS, ki vsebuje 0,1 % Tween 20. Stekelca osušimo in jih zaščitimo s CITIFLUOR™ ali drugim ustreznim zaščitnim sredstvom. Stekelca hranimo v temnem prostoru pri 4 °C, preden jih pregledamo pod mikroskopom.

#### V.3 Pregled s pomočjo fluorescenčne mikroskopije

Vsako stekelce pregledamo pod mikroskopom, ki je primerno za epi-fluorescenčno osvetljenje, s pomočjo primernega filtra, ki bo stimuliral FITC ter povzročil, da odda značilno zeleno fluorescenco. Vsa polja znotraj področij, ki jih opredelimo s svinčnikom ImmEdge™ pregledamo pod x 10 in x 20 objektivih in sumljiva območja (tista z zeleno fluorescenco) pregledamo naprej pod x 40 objektivom in fazno/fluorescentno osvetljava, da zagotovimo, da je fluorescenčno obarvanje povezano s celicami. Fazne koordinate za sumljiva področja zabeležimo za poznejšo potrditev narave fluorescence s strani drugega pregledovalca. Ko stekelca pregleda prvi pregledovalec, pozitivna ali sumljiva stekelca ponovno pregleda drugi pregledovalec in potrdi rezultate.

#### V.4 *Kontrole*

V.4.1 Tri vrste kontrole morajo biti vključene v vsako serijo stekelc, obarvanih za IFAT:

- odtis ledvičnega tkiva neokuženega atlantskega lososa (negativna kontrola),
- neokužena celična kultura SHK-1 ali druga občutljiva celična kultura (negativna kontrola),
- celična kultura SHK-1, okužena v virusom ISA, ali druga občutljiva celična kultura (pozitivna kontrola),

V.4.2 Če je na voljo, se priporoča odtis ledvičnega tkiva atlantskega lososa, okuženega z virusom ISA, kot dodatna pozitivna kontrola.

V.4.3 Če z negativnimi kontrolami dobimo pozitiven rezultat, se šteje, da je test neveljaven za vsa stekelca v tej seriji. Če so v seriji vsa stekelca, vključno s pozitivnimi kontrolami negativna, se šteje, da je test neveljaven za vsa stekelca v tej seriji. Kadar zaradi neuspeha kontrol pride do razveljavitve serije stekelc, ta stekelca uničimo in ponovno testiramo s pomočjo dvojnikov odtisov.

#### V.5 *Pregled drugih tkiv*

Ta tehnika se lahko uporabi za druga tkiva rib, kot so jetra, vranica in srce, če lahko na stekelce prenesemo ustrezno količino endoteljskih celic, levkocitov ali limfocitov. Postopek barvanja ostane enak za vsako tkivo, čeprav je za nekatera tkiva bolj priporočljivo, da opustimo barvanje s propidijevim jodidom in raje s pomočjo fazne osvetljave opredelimo vrste celic, ki so prisotne v odtisu.

### VI. HISTOLOGIJA

Na 5 µm narežemo razdelke v parafinu in jih obarvamo s pomočjo hematoksilina in eozina. Histološke spremembe, povezane z ISA, so opisane v sedanji izdaji Priručnika za diagnosticiranje bolezni vodnih živali OIE.

### VII. **Kratice in okrajšave**

cDNA	komplementarna dezoksiribonukleinska kislina
CPE	citopatski efekt
DEPC	dietil-pirokarbonat
dNTP	dezoksi-nukleotidni trifosfat
FITC	Fluorescein izotiocianat
IF	imunofluorescenca
IFAT	indirektna imunofluorescenca
OIE	Mednarodni urad za epizootije
IPN(V)	nalezljiva nekroza trebušne slinavke (virus)
ISA(V)	infekciозна anemija lososa (virus)
PBS	solna raztopina s fosfatnim pufrom
RNA	ribonukleinska kislina
RT-(PCR)	reverzna transkripcija s polimerazno verižno reakcijo
SHK-1	celice sprednjega dela ledvic pri lososu
TCID50	infektivna doza tkivne kulture pri 50 % ciljnega učinka