

392D0532

Nr L 337/18

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS OFFICIELLA TIDNING

21.11.92

## KOMMISSIONENS BESLUT

av den 19 november 1992

om fastställande av provtagningsplaner och diagnostiska metoder för påvisande och bekräftelse av vissa fisksjukdomar

(92/532/EEG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION  
HAR FATTAT DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska ekonomiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 91/67/EEG av den 28 januari 1991 om djurhälsovillkor för utsläppande på marknaden av djur och produkter från vattenbruk<sup>(1)</sup>, särskilt artikel 15 i detta, och

med beaktande av följande:

Enligt artikel 15 i detta direktiv skall provtagningsplaner och diagnostiska metoder fastställas för användning när sjukdomar hos djur i vattenbruk skall påvisas och bekräftas.

Samråd har skett med Vetenskapliga veterinärmedicinska kommittén som inrättas genom kommissionens beslut 81/651/EEG<sup>(2)</sup>.

Åtgärderna enligt detta beslut är förenliga med yttrandet från Ständiga veterinärkommittén.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

*Artikel 1*

De provtagningsplaner och diagnostiska metoder som skall användas för att påvisa och bekräfta förekomsten av infektiös hematopoetisk nekros (IHN) och viral hemorragisk septikemi (VHS) fastställs i bilagan.

*Artikel 2*

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 19 november 1992.

*På kommissionens vägnar*

Ray MAC SHARRY

*Ledamot av kommissionen*<sup>(1)</sup> EGT nr L 46, 19.2.1991, s. 1.<sup>(2)</sup> EGT nr L 233, 19.8.1981, s. 32.

## BILAGA

## DEL I

## PROVTAGNING OCH DIAGNOSTIK VID VHS- OCH IHN-KONTROLLER

## I. Provtagning

## 1. Tider för provtagning

Anläggningar skall inspekteras kliniskt minst två gånger om året mellan oktober och juni eller närhelst vattentemperaturen understiger 14 °C. Inspektionerna skall ske med minst fyra månaders mellanrum. Alla produktionsenheter (dammar, tankar, akvarier, kassar etc.) skall inspekteras med avseende på förekomst av fisk som har dött, är svag eller betar sig onormalt. Särskild uppmärksamhet skall (om möjligt) ägnas området kring vattenutsläpp, där svag fisk brukar samlas på grund av det strömmande vattnet.

## 2. Urval och insamling av prover

30–150 fiskar och/eller ovarievätskeprover skall samlas in för undersökning i samband med inspektionerna enligt tabell 1. Förekommer regnbågslax, skall inga fiskarter av annat slag ingå i provet. Förekommer inte regnbågslax, skall provet innehålla befintliga fiskarter om dessa är mottagliga för VHS eller IHN enligt bilaga A i rådets direktiv 91/67/EEG om djurhälsovillkor för utsläppande på marknaden av djur och produkter från vattenbruk. De olika fiskarterna skall vara jämnt representerade i provet. Under den första fyraåriga kontrollperioden, innan anläggningen nått godkänd status, skall provet omfatta 150 individer för att man med 95 % säkerhet skall kunna påvisa en virusbärare vid en prevalens på 2 %. Under följande år (bibehållande av godkänd status) kan provets storlek minska till 30 för att man med 95 % säkerhet skall kunna fastställa en andel virusbärare vid en prevalens på 10 % (tabell 1b).

Vid anläggningar som kan dokumentera historisk frihet från VHS och IHN (baserat på ett regelbundet, officiellt hälsokontrollprogram) kan den mindre provmängden användas även under den inledande fyraårsperioden.

Om mer än en vattentäkt används för fiskproduktion, skall fisk från samtliga vattentäkter ingå i proven om 150 eller 30 fiskar. Om det förekommer svaga fiskar, fiskar med onormalt beteende eller sådana som nyligen dött (ej ruttnande) skall dessa i första hand ingå i provet. Om det inte finns sådana fiskar, skall provet bestå av friska individer med normalt beteende och som samlats in på sådant sätt att anläggningens alla delar såväl som alla årsklasser ingår i provet.

## 3. Beredning och transport av fiskprover

Före transport eller överföring till laboratoriet skall de organdelar som skall undersökas avlägsnas från fiskarna med steril sax och pincett och överföras till plaströr som innehåller transportmedium, dvs. cellkulturvätska med 10 % kalvserum och antibiotika. En kombination av 200 IE penicillin, 200 µg streptomycin och 200 µg kanamycin per milliliter rekommenderas, men även andra antibiotika med beprövad verkan får användas. De vävnader som skall undersökas är mjälten, främre njuren, encephalon och, i vissa fall, ovarievätska (tabell 1a och 1b).

Organdelar från 5–10 fiskar (tabell 1a och 1b) får placeras i samma rör så att det utgör ett samlingsprov. Vävnaderna i varje prov bör väga minst 1 g så att den slutliga spädningen blir 1:10.

Rören placeras i isolerade behållare (t.ex. tjockväggiga polystyrenlådor) med så mycket is eller kylklampar så att proverna behåller en temperatur mellan 0 och 5 °C under transporten till laboratoriet. Frysning skall undvikas.

Den virologiska undersökningen skall påbörjas så snart som möjligt och senast 48 timmar efter det att proverna samlats in. Om fiskarna som skall undersökas är kortare än 6 cm, får hela fiskar skickas till laboratoriet i plastpåsar, kylda på ovan angivna sätt.

#### 4. *Insamling av kompletterande diagnostiskt material*

Efter överenskommelse med det berörda diagnostiklaboratoriet får även andra fiskvävnader samlas in och beredas för kompletterande undersökningar.

### II. Beredning av prover för virologisk undersökning

#### 1. *Homogenisering av organ*

På laboratoriet skall vävnaderna i rören homogeniseras fullständigt (antingen med stomacher, mixer eller mortel och stöt) och därefter blandas med det ursprungliga transportmediet. Om ett prov består av hela fiskar, dvs. fiskar kortare än 6 cm, skall dessa sönderdelas med steril sax, sedan kroppen bakom analöppningen avlägsnats, samt homogeniseras enligt ovan och blandas med transportmediet i förhållandet 1:10.

#### 2. *Centrifugering av homogenat*

Homogenatet skall centrifugeras i en kylcentrifug vid 2–5 °C vid 2 000–4 000 × g i 15 minuter, varefter supernatanten samlas upp för undersökning.

Om provet har transporterats i särskilt medium (dvs. med tillsats av antibiotika) kräver supernatanten ingen ytterligare behandling med antibiotika.

Om provet har skickats in som hela fiskar skall homogenatet efter centrifugeringen blandas med transportmediet som innehåller antibiotika och därefter stå i fyra timmar i rumstemperatur eller över natten vid 4 °C.

Behandlingen med antibiotika utförs för att förhindra bakteriell förorening och gör filtrering genom membranfilter onödig.

Omedelbart efter centrifugeringen skall en del av supernatanten blandas med lika delar av ett på lämpligt sätt utspädd divalent antiserum mot IPN-virus (referensstammarna Sp och Ab) och inkuberas med detta i minst en timme vid 15 °C eller högst 18 timmar vid 4 °C. Antiserumets titer måste vara minst 1:2 000 i ett 50 % plaqueneutralisationstest.

Syftet med att behandla alla inokulat med antiserum mot IPN-viruset (ett virus som i vissa delar av Europa finns i 50 % av alla fiskprover) är att förhindra CPE orsakad av att IPN-virus utvecklas i inokulerade cellkulturer. Detta minskar tiden för de virologiska undersökningarna såväl som antalet fall där förekomsten av CPE skulle kunna uppfattas som en potentiell indikation på VHS eller IHN.

När prover kommer från produktionsenheter som anses fria från IPN, kan behandling av inokulat med antiserum mot IPN utelämnas.

### III. Virologisk undersökning

#### 1. *Cellkulturer och medier*

BF-2 och antingen EPC- eller FHM-celler odlas vid 20–25 °C i Eagle's MEM (eller modifieringar därav) med tillsats av 10 % foetalt bovins serum och antibiotika i standardkoncentrationer.

När cellerna odlas i slutna flaskor, skall mediet buffras med bikarbonat. Det medium som används för cellkulturer i öppna kärl skall buffras med Tris-HCl (23 mM) och Na-bikarbonat (6 mM) vid ett pH-värde som skall ligga så nära 7,6 som möjligt, eftersom detta pH-värde är optimalt för virusförökning.

Cellkulturer som skall användas för inokulering med vävnads material bör vara unga (4–48 timmar) och i aktiv tillväxt (inte konfluenta) vid inokuleringen.

#### 2. *Inokulation av cellkulturer*

Antibiotikabehandlade organsuspensioner skall inokuleras i cellkulturer i två spädningar, dvs. primärspädningen plus en spädning 1:100 av denna (för att förhindra homolog interferens). Minst två cellinjer måste inokuleras (se III.1). Förhållandet mellan inokulatets storlek och volymen av cellkulturens medium bör vara ca 1:10.

För varje spädning och varje cellinje skall användas minst ca 2 cm<sup>2</sup> cellyta motsvarande en brunn i en cellkulturplatta med 24 brunnar. Användning av cellkulturplattor rekommenderas men andra cellodlingskärl med motsvarande eller större växtyta kan också accepteras.

### 3. Inkubation av cellkulturer

Inokulerade cellkulturer skall inkuberas vid 15 °C i sju dagar. Om färgen i cellkulturens medium ändras från rött till gult som tecken på att mediet håller på att försuras, skall pH-värdet justeras med steril bikarbonatlösning eller likvärdiga ämnen för att säkerställa cellkulturens mottaglighet för virusinfektion.

Frusna förråd av VHSV och IHNIV skall titreras på cellkulturerna var sjätte månad för att visa att dessa är mottagliga för infektion.

### 4. Mikroskopi

Inokulerade cellkulturer skall inspekteras dagligen med avseende på förekomst av CPE med omkring 40 gångers förstoring. Om CPE kan observeras skall identifiering av virus enligt avsnitt IV påbörjas omedelbart.

Samtidigt skall lämpliga åtgärder vidtas för att upphäva godkändstatusen för den produktionsenhet där det viruspositiva provet kommer ifrån, liksom för alla nedströms belägna produktionsenheter.

Godkändstatusen skall förbli upphävd tills laboratorietesterna visar att det inte är fråga om VHSV eller IHNIV. Högst fyra veckor tillåts för identifiering av viruset, inkluderande tiden som behövs för undersökning vid referenslaboratorier.

### 5. Odling av subkulturer

Om inte CPE har utvecklats efter sju dagars inkubation, skall subkulturer odlas med friska cellkulturer, varvid cellytan skall vara lika stor som i primärkulturen.

Lika delar av medium från samtliga kulturer/brunnar som utgör primärkulturen slås samman, efter ett infrysnings/upptiningsförlopp av kulturerna, och 0,5 ml av mediet blandas med lika mycket antiserum mot IPN enligt beskrivningen i avsnitt II.2 och blandningen inkuberas vid 15 °C i 60 minuter. Blandningen inokuleras sedan i homologa cellkulturer i spädning 1:1 och 1:100 enligt beskrivning i avsnitt III.2. Inokuleringen får föregås av preinkubation av de utspädda lösningarna med divalent antiserum mot IPNvirus i lämplig spädning.

De inokulerade kulturerna inkuberas därefter i sju dagar vid 15 °C och observeras enligt beskrivningen i avsnitt III.4.

## IV. Identifiering av virus

### 1. Neutralisation

Om CPE har påvisats i en cellkultur, skall mediet samlas upp, cellerna avlägsnas genom långsam centrifugering eller membranfiltrering (0,45 µm) och mediet därefter spädas 1:100 och 1: 10 000 i cellkulturmedium.

Lika delar av spädningen blandas med lika delar av följande reagenser, var och en för sig, och inkuberas i 60 minuter vid 15 °C:

- |   |       |
|---|-------|
| – gruppsspecifik antikropp mot VHSV (Egtved-virus)  | 1:50* |
| – gruppsspecifik antikropp mot smittsam hematopoetisk nekrosvirus (IHNIV)                                   | 1:50* |
| – specifikt divalent antiserum mot smittsamt pankreatiskt nekrosvirus (IPNV)<br>(referensstammar Sp och Ab) | 1:50* |
| – medium  | 1:1   |

\* eller enligt referenslaboratoriets uppgift om eventuell cytotoxicitet hos antiserum. De använda reagenserna skall vara av referenskvalitet i fråga om titer och specificitet.

Från varje blandning av virus och serum skall minst två cellkulturer inokuleras med 50 µl vardera och sedan inkuberas vid 15 °C. Utvecklingen av CPE kontrolleras enligt beskrivning i avsnitt III.4.

Om testet inte har lett till en säker identifiering av viruset inom en vecka, skall endera av följande åtgärder vidtas:

- Viruset överförs till ett nationellt referenslaboratorium för fiskvirus för omedelbar identifiering.
- Immunofluorescens (IFAT) (avsnitt IV.2), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (avsnitt IV.3) eller andra metoder för virusidentifiering med reagenser av referenskvalitet.

## 2. Immunofluorescens (IFAT)

För varje virusisolat som skall identifieras besås minst åtta täckglas eller motsvarande med EPC-celler med en täthet som efter 24 timmars odling ger en utväxt av ca 60–90 %. Valet av EPC-celler beror på deras goda vidhäftning mot glasytor.

När cellerna har sjunkit ned till glasytan (omkring en timme efter bestrykningen), eller när kulturerna har inkuberats i upp till 24 timmar, inokuleras det virus som skall identifieras. Fyra kulturer inokuleras i volymförhållandet 1:10 och fyra i förhållandet 1:100.

20–30 timmar efter inokulationen sköljs kulturerna två gånger i Eagle's MEM utan serum, fixeras i acetone och färgas därefter med hjälp av en tvåskiktts IFAT. Första reagensskiktet består av godkänt antiserum (som i avsnitt IV.1). Andra reagensskiktet består av ett FITC-konjugerat antiserum mot det immunoglobulin som används i första skiktet. För varje testat antiserum skall minst en inokulerad högdoskultur och en inokulerad lågdoskultur bli färgad. Testet skall även omfatta lämpliga negativa och positiva kontroller.

Preparera de färgade kulturerna med glycerolsaltlösning. Undersök dem under infallande UV-ljus. Använd okular med förstoringegrad 10 × eller 12 × och objektiv × 25 eller × 40 med bländare >0,7 respektive >1,3. Spädningar av primärt antiserum och FITC-konjugerat antiserum mot immunoglobulinet är beroende av det valda eller disponibla mikroskopet.

Vissa stammar av Egtved-virus reagerar kraftigt med antiserum mot stam F 1 i IFAT, även om de inte reagerar i neutralisationstest.

## 3. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Brunnarna i mikrotiterplattor (t.ex. Nunc-immunplattor, Maxisorp, Nunc, Danmark) skall över natten täckas med rekommenderade spädningar av protein-A-rensade immunoglobulinfraktioner av de antiserum som anges i avsnitt IV.1.

Sedan brunnarna sköljts med buffertlösning PBS-Tween-20, tillsätts det virus som skall identifieras i två eller fyra stegs spädning och tillåts reagera med antikroppsbeläggningen i 60 minuter vid 37 °C. Efter sköljning med buffertlösning PBS-Tween-20 tillsätts biotinylerade antikroppar av en specificitet som motsvarar antikroppsbeläggningens specificitet och får reagera i 60 minuter vid 20 °C. Efter ytterligare en sköljning enligt ovan tillsätts HRP-konjugerad streptavidin och får reagera en timme vid 20 °C. Efter en sista sköljning blir det bundna enzymet synligt med hjälp av lämpliga ELISA-substrat (OPD, TMB eller andra).

Ovannämnda biotin-avidin-baserade ELISA-versioner nämns som exempel. Även andra ELISA-versioner med beprövad verkan får användas.

Tabell 1 A

### Erhållande av status

	Antal kliniska inspektioner per år	Undersökningar av organ från antal fiskar	Undersökning av ovarievätska från antal fiskar
<i>Kontinentalområden:</i>			
a) Anläggning med avelsbestånd	2	120 (serie 1) 150 (serie 2)	30 (serie 1) 0
b) Anläggning med enbart avelsbestånd c)	2	0	150 (serie 1 eller 2)
c) Anläggning utan avelsbestånd	2	150 (serie 1 och 2)	0
<i>Kustområden:</i>			
a) Anläggning utan avelsbestånd	2	30 (serie 1 och 2)	0
b) Anläggning med avelsbestånd	2	120 (serie 1) 150 (serie 2)	30 (serie 1) 0

Högsta antal fiskar per bassäng: 5

Tabell 1 B

## Bibehållande av status

	Antal kliniska inspektioner per år	Undersökningar av organ från antal fiskar	Undersökning av ovarievätska från antal fiskar
<i>Kontinentalområden:</i>			
a) Anläggning med avelsbestånd	2	15 (serie 1 eller 2)	15 (serie 1 eller 2)
b) Anläggning med enbart avelsbestånd	2	0	30 (serie 1 eller 2)
c) Anläggning utan avelsbestånd	2	30 (serie 1 eller 2)	0
<i>Kustområden:</i>			
a) Anläggning utan avelsbestånd	1	30 <sup>(1)</sup> (serie 1 eller 2)	0
b) Anläggning med avelsbestånd	2	0	30 (serie 1 eller 2)

Högsta antal fiskar per bassäng: 10

<sup>(1)</sup> Proverna skall samlas in under andra till sjätte månaden efter fiskens överföring från färsk- till saltvatten.

## DEL II

## DIAGNOSTISKA METODER FÖR FASTSTÄLLANDE AV IHN OCH VHS VID MISSTANKE OM UTBROTT

Diagnos på IHN och VHS kan ställas med någon av följande metoder:

- A. Konventionell virusisolering med påföljande serologisk identifiering av virus.
- B. Virusisolering med samtidig serologisk identifiering av virus.
- C. Metoder för snabbdiagnostisering (IFAT, ELISA).

I anläggningar i godkända områden får den första diagnosen på IHN och VHS inte grundas enbart på metod C. Metod A eller B måste också användas.

Det vävnadsmaterial som är avsett för virologisk undersökning får i vissa fall åtföljas av kompletterande material för bakteriologisk, parasitologisk, histologisk eller annan undersökning för att en differentialdiagnos skall kunna ställas. Sådant material skall insamlas på de sätt som anges i OIE.

## A. Konventionell virusisolering med påföljande serologisk identifiering av virus

## A.I.1 Val av prover

Minst 10 fiskar som visar typiska tecken på IHN eller VHS måste samlas in för undersökning.

## A.I.2 Beredning och transport av fiskprover

Före transport eller överföring till laboratoriet skall de organdelar som skall undersökas avlägsnas från fisken med steril sax och pincett och placeras i plaströr som innehåller transportmedium, dvs. cellkulturmedium med 10 % kalvserum och antibiotika. Kombinationen av 200 IE penicillin, 200 µg streptomycin och 200 µg kanamycin per ml kan rekommenderas men även andra antibiotika med erkänd verkan får användas. De organ som skall undersökas är mjälten, främre njuren och encephalon.

Organdelar från 5–10 fiskar får samlas i samma rör så att det utgör ett samlingsprov. Vävnaden i varje prov bör väga minst 1 g så att den slutliga spädningen blir ca 1:10.

Rören placeras i isolerade behållare (exempelvis tjockväggiga polystyrenlådor) tillsammans med så mycket is eller "frysklampar" att proverna är nerkylda till mellan 0 och 5 °C under transporten till laboratoriet. Frysning skall undvikas.

Den virologiska undersökningen skall påbörjas så snart som möjligt och senast 48 timmar efter provtagningen. Om fisken som skall undersökas är kortare än 6 cm, får hela fiskar skickas till laboratoriet i plastpåsar och skall då vara kylda på ovan angivna sätt.

### A.I.3 *Insamling av kompletterande diagnostiskt material*

Efter överenskommelse med det berörda diagnostiklaboratoriet får även andra fiskvävnader samlas in och beredas för kompletterande undersökningar.

### A.II.1 *Homogenisering av organ*

På laboratoriet skall vävnaderna i rören homogeniseras fullständigt (antingen med stomacher, mixer eller mortel och stöt) och därefter blandas med det ursprungliga transportmediet. Om ett prov består av hela fiskar, dvs. fiskar kortare än 6 cm, skall dessa sönderdelas med steril sax sedan kroppen bakom analöppningen avlägsnats samt homogeniseras enligt ovan och blandas med transportmediet i förhållandet 1:10.

### A.II.2 *Centrifugering av homogenat*

Homogenatet skall centrifugeras i en kylcentrifug vid 2–5 °C vid 2 000–4 000 × g i 15 minuter, varefter supernatanten samlas upp för undersökning.

Om provet har transporterats i särskilt medium (dvs. med tillsats av antibiotika) kräver supernatanten ingen ytterligare behandling med antibiotika.

Om provet har skickats in som hela fiskar skall homogenatet efter centrifugeringen blandas med transportmediet som innehåller antibiotika och därefter stå i fyra timmar i rumstemperatur eller över natten vid 4 °C.

Behandlingen med antibiotika utförs för att förhindra bakteriell förorening av proven och gör filtrering genom membranfilter onödig. Omedelbart efter centrifugeringen skall en del av supernatanten blandas med lika delar av ett på lämpligt sätt utspätt divalent antiserum mot IPN-virus (referensstammarna Sp och Ab) och inkuberas med detta i minst en timme vid 15 °C eller högst 18 timmar vid 4 °C. Antiserumets titer måste vara minst 1:2 000 i ett 50% plaqueneutralisationstest.

Syftet med att behandla alla inokulat med antiserum mot IPN-virus (ett virus som i vissa delar av Europa finns i 50% av alla fiskprover) är att förhindra CPE orsakad av att IPN-virus utvecklas i inokulerade cellkulturer. Detta minskar tiden för de virologiska undersökningarna såväl som antalet fall där förekomsten av CPE skulle kunna uppfattas som en potentiell indikation på VHS eller IHN.

När prover kommer från produktionsenheter som anses fria från IPN, kan behandling av inokulat med antiserum mot IPN utelämnas.

### A.III.1 *Cellkulturer och medier*

BF-2 och antingen EPC- eller FHM-celler odlas vid 20–25 °C i Eagle's MEM (eller modifieringar därav) med tillsats av 10% foetalt bovins serum och antibiotika i standardkoncentrationer.

När cellerna odlas i slutna flaskor, skall mediet buffras med bikarbonat. Det medium som används för cellkulturer i öppna kärl skall buffras med Tris-HCl (23 mM) och Na-bikarbonat (6 mM) vid ett pH-värde som skall ligga så nära 7,6 som möjligt, eftersom detta pH-värde är optimalt för virusförökning.

Cellkulturer som skall användas för inokulering med vävnadsmaterial bör vara unga (4–48 timmar) och i aktiv tillväxt (inte konfluenta) vid inokuleringen.

### A.III.2 *Inokulation av cellkulturer*

Antibiotikabehandlade organsuspensioner skall inokuleras i cellkulturer i två spädningar, dvs. primärspädningen plus en spädning 1:100 av denna (för att förhindra homolog interferens). Minst två cellinjer måste inokuleras (se A.III.1).

Förhållandet mellan inokulatets storlek och volymen av cellkulturens medium bör vara ca 1:10.

För varje spädning och varje cellinje skall användas minst ca 2 cm<sup>2</sup> cellyta motsvarande en brunn i en cellkulturplatta med 24 brunnar. Användning av cellkulturplattor rekommenderas men andra cellodlingskärl med motsvarande eller större växyta kan också accepteras.

### A.III.3 Inkubation av cellkulturer

Inokulerade cellkulturer skall inkuberas vid 15 °C i sju dagar. Om färgen i cellkulturens medium ändras från rött till gult som tecken på att mediet håller på att försuras, skall pH-värdet justeras med steril bikarbonatlösning eller likvärdiga ämnen för att säkerställa cellkulturens mottaglighet för virusinfektion.

Frusna förråd av VHSV och IHNV skall titreras på cellkulturerna var sjätte månad för att visa att dessa är mottagliga för infektion.

### A.III.4 Mikroskopi

Inokulerade cellkulturer skall inspekteras dagligen med avseende på förekomst av CPE med omkring 40 gångers förstoring. Om CPE kan observeras tydligt skall identifiering av virus enligt avsnitt A.IV påbörjas omedelbart.

Samtidigt skall lämpliga åtgärder vidtas för att upphäva godkändstatusen för den produktionsenhet som det viruspositiva provet kommer ifrån, liksom för alla nedströms belägna produktionsenheter.

Godkändstatusen skall förbli upphävd tills laboratorietesterna visar att det inte är fråga om VHSV eller IHNV. Högst fyra veckor tillåts för identifiering av viruset, inkluderande tiden som behövs för undersökningen vid referenslaboratorier.

### A.III.5 Odling av subkulturer

Om inte CPE har utvecklats efter sju dagars inkubation, skall subkulturer odlas med friska cellkulturer, varvid cellytan skall vara lika stor som i primärkulturen.

Lika delar av medium från samtliga kulturer/brunnar som utgör primärkulturen slås samman, efter ett infrysnings/upptinningsförlopp av kulturerna, och 0,5 ml av mediet blandas med lika mycket antiserum mot IPN enligt beskrivningen i avsnitt A.II.2 och blandningen inkuberas vid 15 °C i 60 minuter. Blandningen inokuleras sedan i cellkulturer i spädning 1:1 och 1:100 enligt beskrivning i avsnitt A.III.2. Inokuleringen får föregås av preinkubation av de utspädda lösningarna med divalent antiserum mot IPN-virus i lämplig spädning.

De inokulerade kulturerna inkuberas därefter i sju dagar vid 15 °C och observeras enligt beskrivningen i avsnitt A.III.4.

### A.IV.1 Neutralisation

Om CPE har påvisats i en cellkultur, skall mediet samlas upp, cellerna avlägsnas genom långsam centrifugering eller membranfiltrering (0.45 µm) och mediet därefter spädas 1:100 och 1: 10 000 i cellkulturmedium.

Lika delar av spädningen blandas med lika delar av följande reagenser, var och en för sig, och inkuberas i 60 minuter vid 15 °C:

– gruppsspecifik antikropp mot VHSV (Egtved-virus)	1:50*
– gruppsspecifik antikropp mot infektiös hematopoetisk nekrosvirus (IHNV)	1:50*
– specifikt divalent antiserum mot smittsamt pankreatiskt nekrosvirus (IPNV) (referensstammar Sp och Ab)	1:50*
– medium	1:1

\* eller enligt referenslaboratoriets uppgift om eventuell cytotoxicitet hos antiserum.

De använda reagenserna skall vara av referenskvalitet i fråga om titer och specificitet.

Från varje blandning av virus och serum skall minst två cellkulturer inokuleras med 50 µl vardera och sedan inkuberas vid 15 °C. Utvecklingen av CPE kontrolleras enligt beskrivning i avsnitt A.III.4.

Om testet inte har lett till en säker identifiering av viruset inom en vecka, skall endera av följande åtgärder vidtas:

- Viruset överförs till ett nationellt referenslaboratorium för fiskvirus för omedelbar identifiering.
- Tillämpning av IFAT (avsnitt A.IV.2), (ELISA) (avsnitt A.IV.3) eller andra metoder för virusidentifiering med reagenser av referenskvalitet.



#### A.IV.2 *Immunofluorescens (IFAT)*

För varje virusisolat som skall identifieras besås minst åtta täckglas eller motsvarande med EPC-celler med en täthet som efter 24 timmars odling ger en utväxt av ca 60–90 %. Valet av EPC-celler beror på deras goda vidhäftning mot glasytor.

När cellerna har sjunkit ned till glasytan (omkring en timme efter bestrykningen), eller när kulturerna har inkuberats i upp till 24 timmar, inokuleras det virus som skall identifieras. Fyra kulturer inokuleras i volymförhållandet 1:10 och fyra i förhållandet 1:100.

20–30 timmar efter inokulationen sköljs kulturerna två gånger i Eagle's MEM utan serum, fixeras i aceton och färgas därefter med hjälp av en tvåskikt IFAT. Första reagensskiktet består av godkänt antiserum (som i avsnitt IV.1). Andra reagensskiktet består av ett FITC-konjugerat antiserum mot det immunoglobulin som används i första skiktet. För varje testat antiserum skall minst en inokulerad högdoskultur och en inokulerad lågdoskultur bli färgad. Testet skall även omfatta lämpliga negativa och positiva kontroller.

Preparera de färgade kulturerna med glycerolsaltlösning. Undersök dem under infallande UV-ljus. Använd okular med förstoringegrad 10 × eller 12 × och objektiv × 25 eller objektiv × 40 med bländare >0,7 respektive >1,3. Spädningar av primärt antiserum och FITC-konjugerat antiserum mot immunoglobulinet är beroende av det valda eller disponibla mikroskopet.

Vissa stammar av Egtved-virus reagerar kraftigt med antiserum mot stam F 1 i IFAT, även om de inte reagerar i neutralisationstest.

#### A.IV.3 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Brunnarna i mikrotiterplattor (t.ex. Nunc-immunplattor, Maxisorp, Nunc, Danmark) skall över natten täckas med rekommenderade spädningar av protein-A-rensade immunoglobulinfraktioner av de antiserum som anges i avsnitt A.IV.1.

Sedan brunnarna sköljts med buffertlösning PBS-Tween-20, tillsätts det virus som skall identifieras i två eller fyra stegs spädning och tillåts reagera med antikroppsbeläggningen i 60 minuter vid 37 °C. Efter sköljning med buffertlösning PBS-Tween-20 tillsätts biotinylerade antikroppar av en specificitet som motsvarar antikroppsbeläggningens specificitet och får reagera i 60 minuter vid 20 °C. Efter ytterligare en sköljning enligt ovan tillsätts HRP-konjugerad streptavidin och får reagera en timme vid 20 °C. Efter en sista sköljning blir det bundna enzymet synligt med hjälp av lämpliga ELISA-substrat (OPD, TMB eller andra).

Ovannämnda biotin-avidin-baserade ELISA-versioner nämns som exempel. Även andra ELISA-versioner med beprövad verkan får användas.

### B. *Virusisolering med samtidig serologisk virusidentifiering*

#### B.I.1 *Val av prover*

Som A.I.1.

#### B.I.2 *Beredning och transport av fiskprover*

Som A.I.2.

#### B.II.1 *Homogenisering av organ*

Som A.II.1.

#### B.II.2 *Centrifugering av homogenatet*

Som A.II.2.

#### B.II.3 *Behandling av supernatant med diagnostiska antiserum*

Organsuspensionen som har behandlats med antibiotika och anti-IPN späds 1:10 och 1:10 000 i cellkulturmedium. Lika delar av spädning blandas med lika delar av de reagenser som räknas upp i avsnitt A.IV.1 och inkuberas i 60 minuter vid 15 °C.

#### B.III.1 *Cellkulturer och medier*

Som A.III.1.

**B.III.2 Inokulering av cellkulturer**

Från varje blandning av virusserum (beredd enligt B.II.3) skall minst två cellkulturer per cellinje inkuberas med 50 µl vardera.

**B.III.3 Inkubering av cellkulturer**

Som A.III.3.

**B.III.4 Mikroskopi**

Inokulerade cellkulturer skall inspekteras dagligen med avseende på förekomst av CPE vid ca 40 gångers förstoring. Om något av de använda antiserumen förhindrar CPE, får viruset därmed anses identifierat.

Om inget av de använda antiserumen har haft någon verkan, skall identifieringen fortsätta med den metodik som framgår av A.IV.

**B.III.5 Odling av subkulturer**

Om ingen CPE har utvecklats efter sju dagar, skall subkulturer odlas med kulturer som inokulerats med supernatanten plus medium (B.II.3).

**C. Snabbdiagnostiseringsmetoder (IFAT, ELISA)**

Supernatanten enligt A.II.2 behandlas enligt IFAT eller ELISA i enlighet med A.IV.2 respektive A.IV.3. Dessa snabba metoder skall senast 48 timmar efter provtagningen kompletteras med en virologisk undersökning enligt A eller B

- a) om resultatet är negativt  
eller
  - b) om resultatet är positivt med material som utgör första fallet av IHN eller VHS i godkända områden.
-