

ÁKVÖRDUN FRAMKVÆMDASTJÓRNARINNAR

2007/EES/16/06

frá 13. júní 2003

um viðmiðanir við skilgreiningu svæða og opinbert eftirlit ef upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist hans er staðfest (tilkynnt með númeri C(2003) 1831) (*)

(2003/466/EB)

FRAMKVÆMDASTJÓRN EVRÓPUBANDALAGANNA
HEFUR,

með hliðsjón af stofnsáttmála Evrópubandalagsins,

með hliðsjón af tilskipun ráðsins 91/67/EBE frá 28. janúar 1991 um skilyrði á sviði heilbrigðis dýra sem hafa áhrif á markaðssetningu fiskeldistegunda og -afurða⁽¹⁾, eins og henni var síðast breytt með reglugerð (EB) nr. 806/2003⁽²⁾, einkum 15. gr.,með hliðsjón af tilskipun ráðsins 93/53/EB frá 24. júní 1993 um lágmarksráðstafanir Bandalagsins vegna eftirlits með tilteknum fisksjúkdómum⁽³⁾, eins og henni var síðast breytt með ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2001/288/EB⁽⁴⁾, einkum 2. mgr. 5. gr. og 6. gr.,

og að teknu tilliti til eftirfarandi:

- 1) Með tilskipun 93/53/EBE er ákveðið að sýnataka og prófanir á rannsóknarstofu til að greina sjúkdóma í skrá I og skrá II (sem um getur í viðauka A við tilskipun 91/67/EBE) skuli fara fram samkvæmt þeim aðferðum sem eru fastsettar í samræmi við 15. gr. tilskipunar 91/67/EBE.
- 2) Í ákvörðun framkvæmdastjórnarinnar 2001/183/EB⁽⁵⁾ er mælt fyrir um sýnatökuáætlanir og aðferðir við greiningu og staðfestingu á veirublæði [ð: veirublæðingu] og iðradrepi.
- 3) Samkvæmt 2. mgr. 5. gr. og 6. gr. tilskipunar 93/53/EBE skulu allar eldisstöðvar, sem eru á sama vatnasviði eða strandsvæði og eldisstöð þar sem grunur leikur á um blóðþorrasmit (ISA) eða það hefur verið staðfest, vera undir opinberu eftirliti. Setja skal viðmiðanir vegna skilgreiningar svæða og opinbers eftirlits.
- 4) Haft hefur verið samráð við sérfræðinga í fisk-sjúkdómum og rannsóknarstofustörfum í því skyni að skilgreina sýnatökuáætlanir og aðferðir við greiningu og staðfestingu á blóðþorra og setja viðmiðanir við

skilgreiningu svæða og opinbert eftirlit ef upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest. Enn fremur verður að taka tillit til viðmiðunarreglna um greiningu blóðþorra sem mælt er fyrir um í gildandi útgáfu greiningarhandbókar Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunarinnar (International Office of Epizootics (OIE)) um sjúkdóma í lagardýrum.

- 5) Veita skal nægan tíma til framkvæmdar þessum nýju kröfum.
- 6) Ráðstafanirnar, sem kveðið er á um í þessari ákvörðun, eru í samræmi við álit fastanefndarinnar um matvælaferli og heilbrigði dýra.

SAMÞYKKT ÁKVÖRDUN ÞESSA:

1. gr.

Í viðaukanum við þessa ákvörðun er mælt fyrir um sýnatökuáætlanir og aðferðir við greiningu og staðfestingu á blóðþorra og einnig viðmiðanir við skilgreiningu svæða og opinbert eftirlit ef upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest.

2. gr.

(*) Þessi EB-gerð birtist í Stjtið. ESB L 156, 25.6.2003, bls. 61. Hennar var getið í ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 94/2004, 9. júlí 2004 um breytingu á I. viðauka (Heilbrigði dýra og plantna) við EES-samninginn, sjá EES-viðbæti við Stjórnartíðindi Evrópusambandsins nr. 65, 23.12.2004, bls. 8.

⁽¹⁾ Stjtið. EB L 46, 19.2.1991, bls. 1.

⁽²⁾ Stjtið. ESB L 122, 16.5.2003, bls. 1.

⁽³⁾ Stjtið. ESB L 175, 19.7.1993, bls. 23.

⁽⁴⁾ Stjtið. EB L 99, 10.4.2001, bls. 11.

⁽⁵⁾ Stjtið. EB L 67, 9.3.2001, bls. 65.

Ákvörðun þessi gildir frá 23. október 2003.

3. gr.

Ákvörðun þessari er beint til aðildarríkjanna.

Gjört í Brussel 13. júní 2003.

Fyrir hönd framkvæmdastjórnarinnar,

David BYRNE

framkvæmdastjóri.

VIÐAUKI

Sýnatökuáætlanir og aðferðir við greiningu og staðfestingu á blóðþorra og viðmiðanir við skilgreiningu svæða og opinbert eftirlit ef upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest

INNGANGUR OG SKILGREININGAR

Í þessum viðauka:

- a) er kveðið á um viðmiðunarreglur og lágmarkskröfur um sýnatökuáætlanir og aðferðir við greiningu og staðfestingu á tilvist blóðþorra,
- b) eru ákvæði og skilgreiningar, sem mælt er fyrir um í tilskipun 91/67/EBE og tilskipun 93/53/EBE, samþætt,
- c) eru sett fram ákvæði um rétta greiningu, varnaraðgerðir og eftirlit með blóðþorra komi upp grunur um blóðþorra eða sé blóðþorri staðfestur,
- d) eru ákvæði sem beint er bæði að yfirvöldum sem sjá um varnir gegn blóðþorra og starfsfólki á rannsóknarstofum sem sér um prófanir með tilliti til þess sjúkdóms. Lögð er áhersla á aðferðir við sýnatöku, meginreglur og framkvæmd rannsóknastofuprófana og mat á niðurstöðum úr þeim sem og nákvæma rannsóknarstofutækni. Þrátt fyrir það geta rannsóknarstofur, ef við á, breytt þeim prófunum sem er lýst í þessum viðauka eða viðhaft aðrar prófanir, að því tilskildu að unnt sé að sýna fram á jafnmikla eða meiri næmni og sérhæfni. Enn fremur er mælt fyrir um viðmiðanir við skilgreiningu svæða og opinbert eftirlit ef upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest.

Í þessum viðauka er merking eftirfarandi hugtaka sem hér segir:

„Vatnasvið“: allt vatnasviðið frá upptökum vatnsfallsins að ármynninu eða hluti vatnasviðs frá upptökum vatnsfallsins að náttúrulegri eða tilbúinni hindrun sem kemur í veg fyrir að fiskurinn fari niður fyrir þá hindrun.

„Strandsvæði“: hluti af strönd, sjó eða ármynni, skýrt afmarkaður landfræðilega, sem er einsleitt, straumfræðilegt kerfi eða nokkur slík kerfi.

Í I. hluta er mælt fyrir um almennar meginreglur og viðmiðanir við greiningu og staðfestingu á blóðþorra og viðmiðanir við skilgreiningu svæða og opinbert eftirlit, sem halda skal uppi, ef upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest.

Í II. hluta er tilgreint hvers konar skoðun og sýnataka skuli fara fram svo að greina megi blóðþorra.

Í III. hluta er mælt fyrir um aðferðir sem á að nota við veirufræðilegar rannsóknir.

Í IV. hluta er gerð grein fyrir aðferðum við rannsókn sýna með víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR) í því skyni að greina blóðþorra.

Í V. hluta er aðferðarlýsing sem á að nota við óbeina flúrskinsmótefnaprófun (IFAT) á nýrnaþrykkjum með tilliti til blóðþorra.

Í VI. hluta eru tilgreindar aðferðir í vefjafræði.

Í VII. hluta er skrá yfir þau upphafsstafaorð og þær skammstafanir sem eru notaðar.

I. Viðmiðanir við greiningu blóðþorra og skilgreiningu svæða, tiltekna varnarráðstafanir og opinbert eftirlit**I.1. Almennar meginreglur um greiningu blóðþorra**

Gildar ástæður fyrir því að telja að fiskur sé sýktur af blóðþorraveiru eru settar fram í hluta I.2 í þessum viðauka. Ef upp kemur grunur um að fiskur í eldisstöð sé sýktur af blóðþorraveiru skulu aðildarríkin sjá til þess að eins skjótt og unnt er fari fram opinber rannsókn til að staðfesta eða útiloka tilvist sjúkdómsins með skoðunum og klínískum rannsóknum, auk þess að taka og velja sýni og velja aðferðir til rannsókna á rannsóknastofu eins og mælt er fyrir um í III.–VI. hluta þessa viðauka. Til þess að fá opinbera staðfestingu á tilvist blóðþorra verður að uppfylla einhvern af þeim þremur flokkum viðmiðana sem mælt er fyrir um í hluta I.3 í þessum viðauka.

I.2. Grunur um blóðþorrasýkingu

I.2.1. Ástæða er til að hafa grun um tilvist blóðþorra ef a.m.k. ein af eftirfarandi viðmiðunum er uppfyllt:

- a) einkenni við skoðun eftir dauða samræmast einkennum blóðþorra, með eða án klínískra einkenna um sjúkdóminn. Einkenni við skoðun eftir dauða og klínísk einkenni sjúkdóms skulu vera í samræmi við einkenni sem mælt er fyrir um í gildandi útgáfu greiningarhandbókar Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunarinnar (International Office of Epizootics (OIE)) um sjúkdóma í lagardýrum,
- b) einangrun og greining blóðþorraveiru í frumurækt úr einu sýni úr einhverjum fiski í eldisstöðinni, eins og lýst er í III. hluta,

- c) rökstudd vísibending um tilvist blóðþorraveiru úr tveimur sjálfstæðum rannsóknastofuprófunum á borð við víxlrítakjarnsýrumögnun (IV. hluti) og óbeina flúrskinsmótefnaprófun (V. hluti),
- d) flutningur á lifandi fiski í eldisstöð þar sem gildar ástæður eru fyrir grun um tilvist blóðþorra á þeim tíma þegar fiskurinn var fluttur,
- e) ef rannsókn leiðir í ljós önnur mikilvæg, faraldsfræðileg tengsl við eldisstöðvar þar sem upp kemur grunur um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest.

I.2.2. Hægt er að eyða grun um blóðþorra ef áframhaldandi rannsóknir, sem fela í sér a.m.k. eina klíniska rannsókn á mánuði á sex mánaða tímabili, gefa engar frekari marktækar vísibendingar um tilvist blóðþorra.

I.3. Staðfesting á blóðþorra

Tilvist blóðþorra telst vera staðfest ef viðmiðanir a-, b- eða c-liðar eru uppfylltar:

- a) klínísk einkenni og einkenni við skoðun eftir dauða samræmast einkennum blóðþorra samkvæmt gildandi útgáfu greiningarhandbókar Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunarinnar um sjúkdóma í lagardýrum, þ.m.t. dauður eða veikburða fiskur eða fiskur sem hagar sér óeðlilega, merki um blóðleysi, önnur einkenni við skoðun eftir dauða og sjúklegar breytingar greinast og blóðþorraveira greinist með einni eða fleiri af eftirfarandi aðferðum:
 - i) einangrun og greiningu blóðþorraveiru í frumurækt úr a.m.k. einu sýni úr einhverjum fiski í eldisstöðinni, eins og lýst er í III. hluta,
 - ii) greiningu blóðþorraveiru með víxlrítakjarnsýrumögnun með þeim aðferðum sem er lýst í IV. hluta,
 - iii) greiningu blóðþorraveiru í vef eða vefjasýnum með sértækum mótefnum gegn blóðþorraveiru (t.d. óbein flúrskinsmótefnaprófun á nýrnaþrykki eins og lýst er í V. hluta),
- b) einangrun og greiningu blóðþorraveiru í tveimur sýnum úr einum eða fleiri fiskum í eldisstöð sem eru rannsakaðir á mismunandi tíma með aðferðinni sem er lýst í III. hluta,
- c) einangrun og greiningu blóðþorraveiru úr a.m.k. einu sýni úr hvaða fiski í eldisstöðinni sem er með aðferðinni, sem er lýst í III. hluta, með staðfestri vísibendingu um blóðþorraveiru í vefjasýni úr hvaða fiski í eldisstöðinni sem er með því að nota annaðhvort víxlrítakjarnsýrumögnun (IV. hluti) eða óbeina flúrskinsmótefnaprófun (V. hluti).

I.4. Viðmiðanir við skilgreiningu og afnám svæða fyrir varnaraðgerðir og opinbert eftirlit ef upp kemur grunur um blóðþorra sem er svo staðfestur.

I.4.1. Við gerð opinberrar eftirlitsáætlunar, byggðri á áhættumati, skulu aðildarríkin skilgreina viðeigandi varnar- og eftirlitssvæði í grennd við eldisstöðina þar sem opinber grunur leikur á um blóðþorra eða tilvist blóðþorra er staðfest.

I.4.2. Skilgreining svæða skal byggjast á greiningu í hverju tilviki fyrir sig á hættu á frekari útbreiðslu sjúkdómsins. Í samræmi við faraldsfræðilegt ástand skal viðkomandi vatnasvið eða strandsvæði:

— skilgreint sem varnarsvæði eða

— því má skipta, ef um víðáttumikil vatnasvið eða strandsvæði er að ræða, í varnarsvæði og eftirlitssvæði ef það dregur ekki úr líkum á því að útbreiðsla blóðþorra verði heft.

Enn fremur er heimilt að skilgreina viðbótareftirlitssvæði, eftir því sem þörf krefur, utan vatnasviðsins eða strandsvæðisins.

I.4.3. Helstu þættir, sem ber að hafa í huga við skilgreiningu framangreindra svæða, eru þeir sem hafa áhrif á hættuna á að sjúkdómurinn berist í eldisfisk eða villtan fisk, s.s.: fjöldi, hlutfall og dreifing dauðra fiska í eldisstöð þar sem upp kemur grunur um blóðþorraveiru eða tilvist hennar er staðfest; orsök dauðfalla í viðkomandi eldisstöð; hve langt er til nærliggjandi eldisstöðva og hve þétt þær liggja; smithættueldisstöðvar; hvaða tegundir eru í eldisstöðvunum; rekstrarform smitaðra og nærliggjandi eldisstöðva; straumfræðileg skilyrði og aðrir faraldsfræðilegir þættir, greindir í tengslum við faraldsfræðilega athugun, sem fer fram í samræmi við 2. mgr. 5. gr. og 8. gr. tilskipunar 93/53/EBE.

I.4.4. Eftirfarandi lágmarksviðmiðanir skulu gilda um skilgreiningu svæða.

I.4.4.1. Aðildarríki skal skilgreina „varnarsvæði“ í næsta nágrenni eldisstöðvar þar sem blóðþorraveirusmit er staðfest, sem hér segir:

- á strandsvæðum: svæði innan hrings með geisla sem svarar a.m.k til hreyfingar sjávarfalla eða er a.m.k. 5 km, með miðpunkt í eldisstöð þar sem blóðþorraveirusmit er staðfest, eða samsvarandi svæði sem er ákvarðað samkvæmt viðeigandi straumfræðilegum eða faraldsfræðilegum gögnum eða
- á svæðum á landi: allt vatnasvið eldisstöðvar þar sem blóðþorrasmit er staðfest; aðildarríki er heimilt, á víðfeðmum vatnasviðum, að takmarka umfang svæðisins við hluta vatnasviðs, að því tilskildu að það dragi ekki úr líkum á því að útbreiðsla blóðþorra verði heft.

I.4.4.2. Ef upp kemur grunur um tilvist blóðþorra skal skilgreina „bráðabirgðavarnarsvæði“ sem byggist á sömu viðmiðunum og tilgreindar eru fyrir varnarsvæði.

I.4.4.3. Aðildarríki skal skilgreina „eftirlitssvæði“, eftir því sem þörf krefur, utan varnarsvæðis á svæðum þar sem minna eftirlit er talið nægja, og skal það svara til:

- á strandsvæðum: svæðis umhverfis varnarsvæði sem nær yfir hreyfingar sjávarfalla, svæðis umhverfis varnarsvæði og innan hrings með geisla sem nær 10 km út frá miðju varnarsvæðis eða samsvarandi svæðis, ákvarðað samkvæmt viðeigandi straumfræðilegum eða faraldsfræðilegum gögnum eða
- á svæðum á landi: útvíkkaðs svæðis utan við skilgreint varnarsvæði ef þörf krefur.

I.5. *Rekstrarhvíld og afnám skilgreindra svæða*

I.5.1. Lögbært yfirvald aðildarríkjanna skal sjá til þess að allar eldisstöðvar innan varnarsvæðis séu settar í rekstrarhvíld í hæfilegan tíma eftir að allur fiskur hefur verið fjarlægður úr þeim og sóttreinsaðar eins og nauðsyn krefur. Rekstrarhvíld eldisstöðva, sem staðfest er að séu sýktar af blóðþorra, skal ekki vera styttri en sex mánuðir. Lögbæra yfirvaldið skal ákveða lengd rekstrarhvíldar annarra eldisstöðva á varnarsvæðum samkvæmt áhættumati í hverju tilviki fyrir sig. Þegar allar eldisstöðvar á varnarsvæðinu hafa verið tæmdar tekur við samstillt rekstrarhvíld sem er a.m.k. sex vikur.

Enn fremur er lögbæru yfirvaldi heimilt að ákveða rekstrarhvíld eldisstöðva á skilgreindum eftirlitssvæðum.

I.5.2. Ekki má afnema eða endurnýja skilgreind svæði fyrr en allar eldisstöðvar á svæðunum hafa verið tæmdar af fiski, sóttreinsaðar eins og nauðsyn ber til og settar í hvíld í samræmi við I.5.1. Við endurnýjun svæða skal breyta varnarsvæðum í eftirlitssvæði eins og mælt er fyrir um í 1.4.4.3.

I.5.3. Ekki má endurnýja skilgreind bráðabirgðavarnarsvæði fyrr en grunur um blóðþorra hefur verið eytt í samræmi við hluta 1.2.2. Þegar blóðþorri hefur verið staðfestur í samræmi við hluta 1.3 skal breyta bráðabirgðavarnarsvæðinu í varnarsvæði.

I.5.4. Ekki má endurnýja skilgreind eftirlitssvæði fyrr en tveimur árum eftir endurnýjun varnarsvæðisins.

I.6. *Opinbert eftirlit í kjölfar gruns eða staðfestingar á blóðþorra*

I.6.1. Með vísan til 2. mgr. 5. gr. og 6. gr. tilskipunar 93/53/EBE og til að staðfesta dreifingu og þróun sjúkdómsins í kjölfar gruns eða staðfestingar á blóðþorra í eldisstöð skal lögbært yfirvald eða viðurkenndur þjónustuaðili á sviði heilbrigðiseftirlits með fiskum í samráði við og undir stjórn lögbæra yfirvaldsins framfylgja opinberri eftirlitsáætlun, byggðri á áhættumati, á öllum eldisstöðvum á skilgreindu svæðunum.

I.6.2. Til að beita slíkri opinberri eftirlitsáætlun verður lögbæra yfirvaldið, með vettvangsskoðun ef nauðsyn krefur, að tilgreina allar eldisstöðvar á skilgreindu svæðunum og gera opinbera heildarúttekt á tegundum, flokkum og fjölda fiska í eldisstöðvunum, þ.m.t. dánarhlutfall.

I.6.3. Eftir upphaflegu, opinberu heildarúttektina skulu eldisstöðvar á skilgreindum bráðabirgðavarnarsvæðum sem rækta lax (*Salmo salar*) eða aðrar tegundir sem eru tilgreindar í nýjustu útgáfu alþjóðaheilbrigðisreglna Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunarinnar fyrir eldisdýr, sem eru næmar fyrir blóðþorra eða hugsanlegir smitberar hans, tilkynna lögbæra yfirvaldinu um dánartölu á fjórtán daga fresti. Ef dánartalan hækkar skal tilkynna hana fyrir hvern dag og hverja kví. Lögbært yfirvald skal rannsaka alla marktæka hækkun dánartölu í eldisstöð.

Ef grunur er staðfestur skulu allar eldisstöðvar á skilgreindu varnarsvæði tilkynna lögbæra yfirvaldinu vikulega um dánartölu fyrir hverja kví og hvern dag.

Eldisstöðvar á eftirlitssvæðum skulu tilkynna um dánartölu á 14 daga fresti.

Enn fremur skal skoðun vera með reglubundnu millibili allt árið á skilgreindum svæðum og jafnoft og tilgreint er í töflu 1. Ef veðurskilyrði koma í veg fyrir slíka skoðun hluta úr ári geta aðildarríkin þó mælt fyrir um aðra skoðunartíðni í viðbragðsáætluninni.

Tafla 1

Opinber eftirlitsáætlun

Staðsetning eldisstöðvar	Lágmarksfjöldi skoðana á ári	Lágmarksfjöldi skoðana á ári eftir að varnarsvæði hefur verið afnumið
Varnarsvæði	12	
Eftirlitssvæði	6	6
Bráðabirgðavarnarsvæði	6	

Eftirlitsáætluninni skal fram haldið þar til svæðin hafa verið afnumin.

I.6.4. Skoðun, svo og val, söfnun, undirbúningur og sending sýna, skal fara fram samkvæmt skilgreiningu í hluta II.1 til II.4. Rannsókn sýnanna skal vera í samræmi við III. til VI. hluta.

II. Skoðun og sýnataka

II.1. Skoðun, val og söfnun sýna í eldisstöð þar sem upp kemur grunur um tilvist blóðþorra

II.1.1. Í reglubundnum skoðunum, sem fara fram innan ramma opinberrar eftirlitsáætlunar, sem gerð er grein fyrir í hluta I.6, og í eldisstöðvum, sem grunur leikur á að séu sýktar af blóðþorra, skal skoða alla hluta eldisstöðvar (kvíar, ker eða tjarnir) með tilliti til þess hvort þar finnst dauður eða veikburða fiskur eða fiskur sem hagar sér óeðlilega. Ef unnt er skal rannsaka hvort klínísk einkenni um blóðþorra eða einkenni við skoðun eftir dauða um blóðþorra, eins og lýst er í gildandi útgáfu greiningarhandbókar Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunarinnar um sjúkdóma í lagardýrum, finnast í nýdauðum (órotuðum) og veikburða fiski eða fiski sem hagar sér óeðlilega.

II.1.2. Ef nýleg, klínísk einkenni greinast sem samræmast blóðþorra eða ef skoðunarmaður eða dýralæknir hefur rökstuddan grun um að fiskur kunni að vera sýktur skal taka sýni úr minnst tíu fiskum. Ef unnt er skal sýnið vera úr nýdauðum (órotuðum) og veikburða fiski eða fiski sem hagar sér óeðlilega. Ef ekki finnast nógu margir fiskar með klínísk einkenni skal taka viðbótarsýni úr heilbrigðum fiskum sem eru valdir úr þeim kvíum, kerum eða tjörnum sem hafa hæsta dánartölu eða flesta fiska með klínísk einkenni sjúkdóms.

II.1.3. Ef nýdauður eða veikburða fiskur eða fiskur, sem hagar sér óeðlilega, finnst en klínísk einkenni og einkenni eftir dauða samræmast ekki blóðþorra er sýnataka ekki skyldubundin en þó getur skoðunarmaður eða dýralæknir, að eigin ákvörðun, tekið þau sýni sem nauðsynleg eru til samanburðargreiningar.

II.1.4. Ef grunur leikur á að fiskur úr náttúrunni sé sýktur af blóðþorra skulu aðildarríkin sjá til þess að viðeigandi sýni séu tekin og rannsökuð með viðeigandi, klínískum aðferðum eða rannsóknarstofuaðferðum, sem mælt er fyrir um í II. til VI. hluta, í því skyni að útiloka eða staðfesta tilvist blóðþorra og meta hvort eldisfiski stafi umtalsverð hætta af uppkomu sjúkdómsins.

II.2. *Fisksýni undirbúin*

II.2.1. Einungis skal taka sýni til vefjafræðilegrar rannsóknar úr nýslátruðum fiski sem sýnir klínísk einkenni eða einkenni eftir dauða sem samræmast sjúkdómseinkennum. Taka skal sýni með öllum ytri eða innri vefjaskemmdum og í öllum tilvikum skulu sýni úr lifur, miðhluta nýrans, hjarta og milta skorin úr hverjum fiski með skurðarhníf og lögð í 8–10% (rúmmálshlutfall) jafnalausn sem er formalín/saltlausn. Hlutfallið milli festingarvökva og vefjar verður að vera a.m.k. 20:1 til að tryggja fullnægjandi varðveislu vefjanna.

II.2.2. Taka skal vefi til veirufræðilegrar rannsóknar úr öllum fisksýnunum. Taka skal tvöföld sýni til frekari staðfestingar. Bitar úr lifur, framhluta nýra, hjarta og milta skulu teknir úr fiskinum með dauðhreinsuðu áhaldi og færðir yfir í plastpípur með 9 ml flutningslausn, þ.e. frumræktaræti með sýklalyfjum. Unnt er að mæla með samsetningunni $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ fungison, 200 a.e. ml^{-1} pólýmixin B og $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ kanamýsín en einnig er heimilt að nota aðra samsetningu með staðfestri virkni. Heimilt er að safna saman vefjum úr allt að fimm fiskum í eina pípu með flutningslausn og leggja fram sem eitt safnsýni. Þyngd vefja í einu sýni skal vera $1,0 \pm 0,5 \text{ g}$.

II.2.3. Nýrnaþrykk til óbeinnar flúrskinsmótefnaprófunar skal einungis taka úr nýslátruðum fiski, þ.e. innan tveggja klukkustunda frá dauða hans. Biti úr miðhluta nýrans skal tekinn úr fiskinum með dauðhreinsuðum áhöldum. Vefnum er þrýst á þerripappír til að fjarlægja afgangsblood og síðan þrýst endurtekið á sýnisgler sem er húðað með pólý-L-lýsini. Stök þrykk skulu liggja hvert að öðru, en ekki skarast, þannig að úr verði eitt samfellt lag af frumum. Ekki þarf að nota blood eða holdvessa í þessari prófun. Forðast skal að láta nýrnasýnið þorna upp á þerripappírnum því það getur leitt til blóðstorkunar og til þess að mikið af sermipróteinum fari á sýnisglerið. Þrykkinn skal loftþurrka og halda svölum og þurrum ef ekki á að festa þau þegar í stað. Festing þrykkja skal fara fram innan 72 klukkustunda frá því að sýni eru tekin úr fiskinum. Að öðrum kosti má frysta þrykk að lokinni loftþurrkun og geyma í allt að því einn mánuð við -20 °C áður en festing fer fram.

II.2.4. Heimilt er að rota fisk sem hefur einkenni blóðleysis og taka þegar í stað blóðsýni, meðhöndluð með heparíni, til blóðfræðirannsóknar á borð við blóðkornaskil.

II.2.5. Taka skal vefi til greiningar með víxlritakjarnsýrumögnun úr öllum fisksýnum. Biti úr fram- eða miðhluta nýrans skal tekinn úr fiskinum með dauðhreinsuðu áhaldi og færður yfir í örskilvinduglas með 1 ml RNA-rotvarnarlausn með staðfestri virkni. Heimilt er að safna saman vefjum úr allt að fimm fiskum í eina pípu með rotvarnarlausn og leggja fram sem eitt safnsýni. Þyngd vefja í einu sýni skal vera u.þ.b. $0,5 \text{ g}$. Ef fiskur er smærri en svo að ná megi sýni af tilskilinni þyngd úr honum má taka hluta úr nýra, hjarta, milta, lifur eða skúflanga, í þessari forgangsröð, þannig að sýnið verði $0,5 \text{ g}$.

II.3. *Flutningur á sýnum úr fiski*

II.3.1. Blóðsýni og pípur sem innihalda fiskvefi til veirufræðilegrar rannsóknar eða greiningar með víxlritakjarnsýrumögnun, skulu sett í einangruð ílát (t.d. pólýstýrenkassa með þykkum veggjum) ásamt nægum ís eða „ísklumpum“ til að tryggja kælingu sýnanna meðan á flutningi til rannsóknarstofu stendur. Sýnin mega ekki frjósa og á viðtökustað skal enn vera ís í flutningskassanum eða einn eða fleiri ísklumpar verða að hafa haldist frosnir að hluta eða alveg. Í undantekningartilvikum má hraðfrysta sýni sem á að greina með víxlritakjarnsýrumögnun og sýni til veirufræðilegrar rannsóknar og flytja á rannsóknarstofuna við -20 °C eða minna.

II.3.2. Senda skal sýnisgler fyrir óbeina flúrskinsmótefnaprófun í sérstökum hylkjum með svo miklu rakadrægu efni að þrykkinn haldist þurr og kæld eins og að framan greinir.

II.3.3. Ef fiskvefir eru fluttir í festingarvökva til vefjafræðilegrar rannsóknar skulu þeir sendir í lekaþéttum pípum í ílátum sem standast högg, t.d. pólýstýrenkössum með þykkum veggjum.

- II.3.4. Svo fremi sýnin séu ekki fryst skal hefja veirufræðilega rannsókn eins fljótt og auðið er og ekki seinna en 72 klukkustundum eftir að sýnunum er safnað saman. Sýni sem er tekið til frekari staðfestingar skal geymt við $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eða lægra hitastig eftir viðtöku á rannsóknarstofu.
- II.3.5. Flytja má heilan fisk á rannsóknarstofu ef kröfunum um hitastig í flutningi, sem lýst er í hluta II.3.1, er fullnægt. Vefja má heilan fisk inn í rakadrægan pappír og senda í plastpoka sem er kældur eins og áður er getið.
- II.3.6. Einnig má senda lifandi fisk, en aðeins undir eftirliti opinbera þjónustuaðilans.
- II.3.7. Við greiningu vefjasýna, sem eru rotvarin í RNAlater-geymslulausn, með víxlrítakjarnsýrumögnun verður RNA-útdráttur að fara fram innan tiltekins tíma að því er varðar sýni sem eru geymd við misháan hita. Sá tími er sem hér segir:
- | | |
|---------------------------------|--------------|
| — $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ | einn dagur |
| — $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ | ein vika |
| — $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ | einn mánuður |
| — $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ | ótakmarkaður |
- II.3.8. Öll pökkun og merking verður að vera í samræmi við gildandi, innlendar og alþjóðlegar flutningsreglur eftir því sem við á.

II.4. *Söfnun viðbótargreiningarefnis*

Með samkomulagi við rannsóknarstofuna, sem annast greininguna, má einnig að safna öðrum fiskvefjum og undirbúa fyrir viðbótarannsókn.

III. Veirufræðileg rannsókn

III.1. *Sýnin undirbúin*

III.1.1. Ef upp koma erfiðleikar í framkvæmd sem koma í veg fyrir að hægt sé að sá á frumur innan 72 klukkustunda frá því að vefjasýnin eru tekin er heimilt að frysta vefinn við $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ í allt að því 28 daga. Aðeins er heimilt að frysta og þíða vefina einu sinni áður en rannsókn fer fram.

III.1.2. Gera skal hvert sýni (vefjasafnsýni í flutningslausn) fullkomlega einsleitt og nota til þess eltímagá (stomacher), blandara eða mortél og staut, skilja í skilvindu við 2000 til $4000 \times \text{g}$ í 15 mínútur við 0 til $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ en flotíð skal sía (með $0,45\text{ }\mu\text{m}$ síu og rækta með sama rúmmáli af hæfilega þynntri blöndu af mótsermi gegn staðbundnum (indigenous) sermigerðum brisdrepsveiru (IPN-veiru). Títtri mótsermisins skal vera minnst 1:2000 í 50% hlutleysandi eyðuprófun. Blandan er höfð í eina klukkustund við $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Úr þessu verður til sáð.

Markmiðið með því að meðhöndla allt sáð með mótsermi gegn brisdrepsveiru (veiru sem finnst sums staðar í Evrópu í 50% fisksýna) er að koma í veg fyrir að frumuskemmdir (CPE), sem stafa af brisdrepsveiru, komi fram í frumurækt sem sáð hefur verið í. Þetta stýttir veirufræðilegu rannsóknina og fækkar þeim tilfellum þar sem telja verður að frumuskemmdir séu hugsanleg vísbinding um blóðþorraveiru.

Þegar sýni eru úr framleiðslueiningum sem álitnar eru lausar við brisdrep er heimilt að sleppa því að meðhöndla sáð með mótsermi gegn brisdrepsveiru.

III.2. *Sáning á frumurækt*

III.2.1. SHK-1-frumur (umsáning (pass) 80 eða undir) eða TO-frumur skulu ræktaðar í L-15-æti með 5% nautgripafósturssermi, 2% (rúmmálshlutfall) 200 mM L-glútamíni og 0,08% (rúmmálshlutfall) 50 mM 2-merkaptóetanóli úr bökkum með 12 eða 24 brunnnum. Heimilt er að nota aðrar frumulínur með viðurkennda verkun og næmi fyrir einangrun blóðþorraveiru, að teknu tilliti til breytileika stofna og hæfni mismunandi stofna til eftirmyndunar í mismunandi frumulínum. Sviflausn úr líffærum, meðhöndluð með mótsermi, skal sáð á nýja frumurækt í góðum vexti sem gefur endanlega þynningu vefjarefnis í ræktunaræti sem er 1:1000. Fyrir hverja sviflausn úr líffærum skal setja $40\text{ }\mu\text{l}$ af sáði í brunna með 2 ml af ræktunaræti. Til að minnka hættuna á víxlmengun er ráðlagt að nota bakka með 12 eða 24 brunnnum undir fisksýni frá mismunandi eldisstöðvum.

III.2.2. Í einn af bökkunum skal ekki sáð heldur skal nota hann fyrir neikvæðan samanburð. Í sérstakan bakka fyrir jákvæðan samanburð skal sáð með tilvísunareinangri með blóðþorraveiru, sem hér segir. Sáð skal í fyrsta brunninn eitt hundruð μl af stofnlausn blóðþorraveirunnar (lágmarkstíttri 10^7 TCID₅₀ ml⁻¹) og blanda vel. Taka skal tiltekið magn af þessu efni úr fyrsta brunninum og setja í annan brunn til að ná þynningu sem er 1:10 og blanda vel. Þetta er endurtekið á öllum bakkanum til að ná sex tíföldum þynningum. Stofn blóðþorraveirunnar má geyma við -80 °C í .a.m.k. tvö á en hafi hann þiðnað verður að nota hann innan þriggja daga. Athugasemd: Koma skal í veg fyrir vixlmengun prófunarbakka við efni fyrir jákvæðan samanburð. Til að forðast þá hættu skal setja upp jákvæðan samanburð og meðhöndla á annan hátt en prófunarbakkana.

III.2.3. Sýni skulu höfð við 14 ± 2 °C í allt að því 15 daga.

III.3. Smásjárskoðun

Skoða skal frumurækt tvisvar með smásjá til að kanna frumuskemmdir, fimm til sjö dögum og 12–14 dögum eftir sáningu. Ef frumuskemmdir sjást í einhverju safnsýni skal þegar í stað hefja sanngreiningu veira (III.6). Hafi engar frumuskemmdir greinst á fjórtánda degi skal viðhafa hemaðsogsprófun (haemadsorption test) (III.4).

III.4. Hemaðsog

Eftirmyndun blóðþorraveira í frumurækt leiðir ekki alltaf til frumuskemmda. Því skal viðhafa hemaðsogsprófun í hverjum brunni, eins og lýst er hér á eftir, eða að öðrum kosti IF-prófun, eins og lýst er í III.6.1, í hverjum brunni.

III.4.1. Fjarlægja skal frumuræktaræti úr hverjum brunni, einnig þeim sem eru fyrir jákvæðan og neikvæðan samanburð, og setja í merktar, sóthreinsaðar pípur. Í hvern brunn skal setja fimm hundruð μl af 0,2% (rúmmálshlutfall) sviflausn úr þvegnum rauðkornum úr kanínu eða hrossi eða 0,05% (rúmmálshlutfall) sviflausn úr þvegnum rauðkornum úr regnbogasilungi eða laxi og rækta við stofuhita í 45 mínútur. Fjarlægja skal rauðkornin og þvo hvern brunn tvisvar með L-15-miðli. Skoða skal hvern brunn í smásjá.

III.4.2. Klasi af rauðkornum á yfirborði SHK-1- eða TO-frumna benda til sýkingar af ortómýxóveiru. Ef hemaðsogsprófun reynist jákvæð skal þegar í stað viðhafa sanngreiningarprófun fyrir veirus (III.6).

III.5. Ræktun undirrækta eða umsáning

III.5.1 Umsáning fer fram frá 13. degi til 15. dags. Tvö hundruð tuttugu og fimm μl af floti úr rækt skulu settir í brunn með nýjum SHK-1-frumum í góðum vexti í bökkum með 12 brunnum og þetta skal haft við 14 ± 2 °C í allt að því 18 daga. Skoða skal frumuræktir tvisvar í smásjá til að kanna frumuskemmdir, fimm til sjö dögum og 14 til 18 dögum eftir sáningu. Ef frumuskemmdir sjást í einhverju safnsýni skal þegar í stað hefja sanngreiningu veira (III.6). Hafi engar frumuskemmdir greinst á fjórtánda til átjándaga degi skal viðhafa hemaðsogsprófun (III.4).

III.5.2. Komi frumueiturhrif fram á fyrstu sjö dögum ræktunar skal umsáning fara fram á því stigi og frumurnar ræktaðar í 14–18 daga og síðan skal umsá þeim aftur og rækta í 14–18 daga til viðbótar. Komi frumueiturhrif fram eftir sjö daga skal umsáning fara fram þegar í stað og frumurnar ræktaðar þar til samanlagður ræktunartími frá frumsáningu er 28–36 dagar.

III.5.3. Verði bakteríusmitun í frumurækt verður að endurtaka prófun þar sem notaður er vefjafafningur sem geymdur er við -80 °C. Fyrir sáningu er vefjafafningurinn skilinn í skilvindu við $4000 \times g$ í 30 mínútur við 0 til 6 °C og flotið síað með 0,22 μm síu. Verði bakteríusmitun við umsáningu skal flotið síað með 0,22 μm síu, sáð á nýjar frumur og ræktað í 14–18 daga til viðbótar.

III.6. *Prófanir til sanngreiningar veira*

Ef visbending um frumuskemmdir kemur fram á einhverju stigi eða hemaðsogsprófun reynist jákvæð skal gera prófanir til sanngreiningar veira. Aðferðir sem hægt er að velja um til sanngreiningar á blóðþorraveiru eru IF (III.6.1) og víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR) (IV. hluti). Ef talið er að um aðrar veirur sé að ræða er ráðlagt að grípa til annarra sanngreiningarprófana fyrir veirur. Leiði prófanirnar ekki til öruggrar sanngreiningar veirunnar á einni viku skal senda flotið til innlestrar tilvísunarrannsóknarstofu í fisksjúkdómum eða til tilvísunarrannsóknarstofu Evrópusambandsins í fisksjúkdómum til skjótrar sanngreiningar.

III.6.1. Ónæmisflúrskin (IF)

- III.6.1.1. SHK-1-frumur (umsáning 80 eða lægri) eða TO-frumur skulu ræktaðar í L-15-æti með 5% nautgripafósturssermi, 2% (rúmmálshlutfall) 200 mM L-glútamíni og 0,08% (rúmmálshlutfall) 50 mM 2-merkaptóetanóli í bökkum með 24 eða 96 brunnnum og notaðar við meira en 50% samrennsli. Einnig er heimilt að nota aðrar frumulínur eða vaxtaræti með viðurkennda verkun. Í hvorn af tveimur brunnnum skal setja tvö hundruð tuttugu og fimm µl af floti úr þeirri rækt, sem talin er vera smituð af veiru, blanda og flytja 225 µl í aðra tvo brunna, þ.e. þynning sem er 1:5. Í tvo brunna til viðbótar er ekki sáð heldur eru þeir notaðir til samanburðar. Sýni úr hverri eldisstöð skulu meðhöndluð á aðskildum bökkum og það sama gildir um samanburð fyrir veirur. Setja skal upp veirusamanburð með tilvísunareinangri með blóðþorraveiru.
- III.6.1.2. Bakkar skulu hafðir við 14 ± 2 °C og skoðaðir í smásjá í allt að því sjö daga. Þegar fyrstu frumuskemmdir greinast, eða hafi engar frumuskemmdir greinst á sjöunda degi, skal næsta skref vera festing. Brunnarnir eru þá skolaðir með PBS og festir með því að hafa þá með 80% asetoni í 20 mínútur við stofuhita. Bakkarnir eru loftþurrkaðir og litaðir þegar í stað eða geymdir við 0–6 °C í mesta lagi í 24 klukkustundir fyrir litun.
- III.6.1.3. Lita skal samhliða brunna með einstofna mótefni 3H6F8 gegn blóðþorraveiru eða öðru einstofna mótefni með viðurkennda verkun og sérhæfni, þynna í PBS og hafa við 37 ± 4 °C í 30 mínútur. Fjarlægja skal einstofna mótefni með því að skola bakkana þrisvar með 0,05% Tween 20 í PBS. FITC-merkt mótefni gegn músa-IgG, er sett í hvern brunn, þynnt í PBS og haft við 37 ± 4 °C í 30 mínútur. Athugasemd: finna skal heppilegustu þynningu úr mismunandi lögnum einstofna mótefnis og FITC-merkts mótefnis á hverri rannsóknarstofu. Fjarlægja skal mótefni með því að skola bakkana þrisvar með 0,05% Tween 20 í PBS.
- III.6.1.4. Brunnana skal þegar í stað skoða í umhverfðri smásjá sem er gerð fyrir flúrljómssmárrannsókn með hentugri síu fyrir örvun á FITC. Prófun telst vera jákvæð ef í ljós koma flúrljómandi frumur. Til að prófun sé gild verða niðurstöður úr jákvæðum samanburði að vera jákvæðar og úr neikvæðum samanburði verða niðurstöðurnar að vera neikvæðar.

IV. Rannsókn sýna með víxlritakjarnsýrumögnun (RT-PCR)

IV.1. *Í þessum þætti er lýst tilskildum aðferðum við kjarnsýrumögnun á hluta af bút 8 af genamengi blóðþorraveiru sem beita má á fiskvef eða blóðþorraveiru í rækt*

IV.1.1. RNA-útdráttur

- a) RNAlater-geymslulausn er fjarlægð úr hverju sýni. Í hverja pípu skal setja 1 ml af DEPC-meðhöndluðu dH₂O og hafa pípunar í skilvindu við 13 000 snúninga á mínútu í fimm mínútur við 0–6 °C.
- b) Flotið skal tekið úr hverju sýni og 800 µl TRIzol (Invitrogen) eða öðru prófefni, sem staðfest er að hefur jafnmikla eða meiri verkun, skal bætt í hvert sýni og samanburðarpípu með viðeigandi samanburðarefni (400 µl dH₂O eða nýrnajafningur úr tilteknum fiski sem er laus við sjúkdómsvalda). Ef nauðsyn krefur skal leysa upp vefina með því að pípla þá margsinns. Pípunar skulu hafðar við stofuhita í fimm mínútur. Í hverja pípu skal setja 160 µl klóróforms, þær skal hrísta kröftuglega í þrjár mínútur og skilja síðan í skilvindu við 13 000 snúninga á mínútu í 15 mínútur við 0–6 °C.
- c) Flytja skal efra vatnslagið í merkt 1,5 ml örvinduglas, sem inniheldur 500 µl isóprópanól, láta glösin standa í 10 mínútur við stofuhita og setja þau síðan í skilvindu við 6500 snúninga á mínútu í 15 mínútur við 0–6 °C.

- d) Fjarlægja skal flotið og bæta 1 ml 75% etanóls við RNA-botnfallið sem hefur myndast. Glösin skulu síðan sett í skilvindu og skilin við 6500 snúninga á mínútu í fimm mínútur við 0–6 °C.
- e) Fjarlægja skal flotið og láta glösin standa opin í u.þ.b. þrjár mínútur þannig að það sem eftir er af etanólinu gufi upp. Bæta skal 15 µl af DEPC-meðhöndluðu dH₂O við til að koma botnfallinu aftur í lausn og, ef nauðsyn krefur, hrísta örstutt í iðublandara.
- f) Nota skal litrófsmæli til að reikna út RNA-styrk og hreinleika sýna. Ljósþéttni er mæld við 260 og 280 nm.
- g) RNA, sem á að nota þegar í stað (sama dag), má geyma til bráðabirgða við 0–6 °C. RNA, sem ekki á að nota þegar í stað, skal geymt við –80 °C.

IV.1.2. Víxlritun (RT)

- a) Þynna skal tvö µg RNA í DEPC-meðhöndluðu dH₂O í 1,5 ml örvinduglössum. Ef RNA-styrkur sýnis er minni en svo að unnt sé að nota 2 µg í víxlritunarhrarfi skal nota svo mikið RNA sem framast er unnt. Þynnt RNA skal haft við 55–60 °C í tíu mínútur.
- b) Glös, sem innihalda RNA, skulu síðan sett á ís og víxlritunarprófefnum bætt við til að fá endanlegan styrk sem er 1 × jafnalausn, 1mM dNTPs, 100 ng slembivalin sexkirmi (random hexamers), 20 einingar RNasa-lati og 200 einingar MMLV-RT í heildarrúmmálinu 20 µl.
- c) Glösin skulu höfð við 37 °C í eina klukkustund.
- d) Geyma skal cDNA við 0–6 °C fram að notkun og nota við kjarnsýrumögnun eins fljótt og unnt er.

IV.1.3. Kjarnsýrumögnun (PCR)

- a) Bæta skal fimm µl cDNA við 45 µl PCR-blöndu til að fá endanlega styrkleika sem er 1 × jafnalausn, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM af hverju dNTP, 25 pmol af hverjum vísi (primer) og 1 eining af Taq-pólýmerasa. Vísar eru ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') („framvísir“, „forward primer“) og ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') („bakvísir“, „reverse primer“). Setja skal upp neikvæðan samanburð fyrir útdrátt, víxlritun og kjarnsýrumögnun.
- b) Setja skal glös í lotuhitara (thermocycler) sem er stilltur á 94 °C í fimm mínútur, síðan 35 lotur á 94 °C í eina mínútu, 55 °C í eina mínútu og 72 °C í eina mínútu og í lokin skal hafa glösin við 72 °C í fimm mínútur.
- c) Niðurstöður úr kjarnsýrumögnun skulu metnar í kjölfar rafdráttar með 2% agarósageli sem er litað með etídiúbrómíði og með stærðarmerkjum meðfram sýnum og neikvæða samanburðinum úr víxlritun og kjarnsýrumögnun. Ein stök afurð, sem er 15 5bp, úr kjarnsýrumögnun telst vísbending um tilvist RNA úr blóðþorraveiru. Sýni með einni afurð til viðbótar, sem er 310 bp, skal einnig teljast innihalda RNA úr blóðþorraveiru. Sýni sem gefa af sér margar afurðir úr kjarnsýrumögnun, þ.m.t. minnst eina sem er u.þ.b. 155 bp, kunna að innihalda RNA úr blóðþorraveiru. Þetta má rannsaka frekar með því að nota DNA-þreifara eða greina núkleótíðaröðina.

IV.1.4. Staðfesting með kjarnsýrumögnun á einangrun blóðþorraveiru í vefjarækt

Ef algerar frumuskemmdir hafa orðið við veirufræðilega rannsókn á vefjasýnum í SHK-1-frumum skal taka 400 µl af floti úr bollanum og setja í dauðhreinsaða 1,5 ml pípu. Draga skal RNA út úr þessu sýni, sbr. III.1, og beita víxlritakjarnsýrumögnun. Ef notaðar eru ræktir þar sem frumuskemmdir eru ekki algerar skal fjarlægja flotið, skrapa frumurnar af yfirborði brunnsins eða flöskunnar og setja í sótthreinsaða 1,5 ml pípu fyrir RNA-útdrátt og víxlritakjarnsýrumögnun.

IV.1.5. Staðfesting á afurðum kjarnsýrumögnunar með DNA-þreifara

- a) Meta má sérhæfni 155 bp afurðar kjarnsýrumögnunar með þreifun með fákirmi sem þáttaparast við svæði afurðarinnar úr kjarnsýrumögnuninni, innan vísanna. Afurðirnar úr kjarnsýrumögnun skulu rafdrengnar í 1% agarósageli meðfram stærðarmerkjum og jákvæðum og neikvæðum samanburði úr víxlritun og kjarnsýrumögnun.

- b) DNA skal suðurþrykkt (Southern blotted) og merкта fákirnið (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') haft með himnunni að loknum viðeigandi skrefum í forþáttapörum.
- c) Óbundnir þreifarar og þreifarar, sem ekki eru bundnir sértækt, skulu þvegnir af himnunni og bundnir þreifarar gerðir sýnilegir.
- d) Þreifari, bundinn við bót sem er 155 bp (og 310 bp ef slíkur bótur finnst) er sönnun á sérhæfni PCR og vísbending um að RNA úr blóðþorraveiru fyrirfannst í sýninu.

IV.1.6. Greining á núkleótíðaröð afurða kjarnsýrumögnunar

Hægt er að meta sérhæfni kjarnsýrumögnunar með því að rannsaka núkleótíðaröð 155 bp afurðar kjarnsýrumögnunar.

- a) Hreinsa skal agarósagel eða -lausn af afurðum kjarnsýrumögnunar.
- b) Raðgreina skal bótinn með því að nota sömu vísa og voru notaðir í kjarnsýrumögnunar- eða genaferjuvísunum ef klónað er í genaferju fyrir raðgreiningu.
- c) Bera skal núkleótíðröðina saman við röðina í bót 8 hjá blóðþorraveiru, sem liggur fyrir í EMBL-gagnabankanum yfir núkleótíðaraðir (vörslunúmer Y10404, AJ012285, AJ242016).
- d) Tilvist raðar sem samsvarar röðinni í bót 8 hjá blóðþorraveiru er sönnun þess að sýnið innihélt RNA úr blóðþorraveiru.

V. Rannsókn á nýrnaþrykkjum með óbeinni flúrskinsmótefnaprófun (IFAT)

V.1. *Eftirfarandi aðferðarlýsing hefur verið samin fyrir rannsókn á nýrnaþrykkjum með óbeinni flúrskinsmótefnaprófun*

V.2. *Þrykk undirbúin og lituð*

V.2.1. Sýnisgler skulu fest í asetoni eða metanól/asetoni (1:1) í þrjár mínútur og loftþurrka. Hvert sýnisgler skal skoðað áður en litun fer fram og viðeigandi svæði á sýnisglerinu afmarkað með ImmEdge™-penna, eða áþekktum merkipenna, og síðan loftþurrkað. Að því loknu eru sýnisglerin sett í blokklausn (6% undanrenna í PBS sem inniheldur 0,2% Tween 20) og höfð við vægan hristing í 30 mínútur við stofuhita. Vökvi er látinn renna af hverju sýnisgleri og því komið lárétt fyrir í sýnisglerjakassa með vættum pappír sem heldur andrúmsloftinu röku.

V.2.2. Þekja skal hvert þrykk með lausn úr einstofna mótefni 3H6F8 gegn blóðþorraveiru (eða öðru einstofna mótefni með viðurkennda verkun og sérhæfni), síðan skal loka sýnisglerjakassanum og hafa við hristing í 60 mínútur við stofuhita. Mótefnið skal að öllu jöfnu þynnt í hlutfalli frá 1:10 til 1:100 í 1% undanrennu en þynninguna þarf í reynd að ákvarða fyrir hverja lögn. Sýnisglerin skulu þvegin þrisvar í tvær mínútur í PBS sem inniheldur 0,1% Tween 20. Þekja skal hvert þrykk með lausn sem inniheldur FITC-merkt mótefni úr geit gegn mús, þynnt 1:1000 í 1% undanrennu, og hafa við stofuhita og raka í 60 mínútur. Sýnisglerin skulu þvegin þrisvar í tvær mínútur í PBS sem inniheldur 0,1% Tween 20. Þekja skal hvert sýnisgler með CITIFLUOR™-lausn (500 µl CITIFLUOR™, sem er blönduð með 1,5 ml 0,1% (rúmmálshlutfall) Tween 20 í PBS) eða öðru heppilegu steypiefni í 10 mínútur. Sýnisglerin skulu þvegin þrisvar í PBS sem inniheldur 0,1% Tween 20. Ef þörf er á mótlitun má þekja hvert þrykk með própídíumjóðiði (0,01 mg/ml) í PBS, sem inniheldur 0,1% Tween 20, og hafa í þrjár mínútur við stofuhita. Sýnisglerin skulu þvegin þrisvar í tvær mínútur í PBS sem inniheldur 0,1% Tween 20. Vökvi er látinn renna af hverju sýnisgleri og það haft í CITIFLUOR™ eða öðru hentugu steypiefni Sýnisglerin skulu geymd í myrkri við 4 °C áður en smásjárrannsókn fer fram.

V.3. *Rannsókn þar sem notuð er flúrljómandi smásjárrannsókn*

Skoða skal hvert sýnisgler í smásjá, sem hentar til epi-flúrljómunar, með hentugri síu sem örvar FITC þannig að það gefur frá sér hið einkennandi, græna flúrskín. Allir reitir á svæðum, sem eru afmörkuð með ImmEdge™-pennanum, skulu skoðaðir með $\times 10$ og $\times 20$ hlutlinsum og grunsamleg svæði (þau sem eru með grænu flúrskíni) skulu skoðuð nánar með $\times 40$ hlutlinsu og fasa-/flúrljómandi lýsingu til að tryggja að flúrlitunin tengist frumum. Hnitin fyrir grunsamlegu svæðin skulu skráð með tilliti til þess að annar athugandi muni síðar staðfesta eðli flúrljómunarinnar. Að lokinni skoðun fyrsta athuganda skal annar athugandi skoða aftur þau sýnisgler sem eru jákvæð eða grunsamleg og skulu niðurstöður staðfestar.

V.4. *Samanburður*

V.4.1. Þrenns konar samanburður skal hafður fyrir hvert sett sýnisglerja sem eru lituð vegna óbeinnar flúrskinsmótefnaprófunar:

- nýrnaþrykk af ósýktum laxi (neikvæður samanburður),
- ósýkt SHK-1-frumurækt eða önnur smitnæm frumurækt (neikvæður samanburður),
- SHK-1-frumurækt, sýkt af blóðþorraveiru, eða önnur smitnæm frumurækt (jákvæður samanburður).

V.4.2. Ef nýrnaþrykk af laxi, smituðum af blóðþorraveiru, er tiltækt er mælt með því að það sé notað fyrir frekari jákvæðan samanburð.

V.4.3. Ef jákvæðar niðurstöður fást úr neikvæðum samanburði telst prófunin vera ógild fyrir öll sýnisglerin í því setti. Ef öll sýnisglerin í tilteknu setti, þ.m.t. jákvæður samanburður, eru neikvæð telst prófunin vera ógild á öllum sýnisglerjunum í því setti. Í þeim tilvikum þar sem misheppnaður samanburður leiðir til þess að sett af sýnisglerjum verður ógilt skal eyðileggja þau sýnisgler og endurtaka prófunina og nota þau þrykk sem voru höfð til vara.

V.5. *Rannsókn á öðrum vefjum*

Þessari tækni er hægt að beita á aðra fiskvefi, s.s. úr lifur, milta og hjarta, svo framarlega sem hægt er að setja nægilegt magn af þelfrumum, hvítkornum eða eitilfrumum á sýnisglerið. Litunaraðferðin skal vera sú sama fyrir hvern vef, enda þótt það geti verið hentugra að sleppa litun með própídíumjóiði fyrir suma vefi og nota þess í stað fasalýsingu (phase contrast illumination) til að sanngreina þær frumugerðir sem finnast í þrykkinu.

VI. **VEFJAFRÆÐI**

Rannsóknarsýni, sem eru steypit í paraffín, eru skorin í 5 µm þykkar sneiðar og lituð með hematóxýlíni og eósíni. Vefjabreytingum, sem tengjast blóðþorra, er lýst í gildandi útgáfu greiningarhandbókar Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunarinnar (International Office of Epizootics (OIE)) um sjúkdóma í lagardýrum.

VII. **Skammstafanir**

cDNA	samfallandi deoxýríbósakjarnasýra
CPE	frumuskemmdir (cytopathic effect)
DEPC	dietylþyrókarbónat
dNTP	deoxýnúkleótíðþrífosfat
FITC	ísóbíósýanat í flúrskinslausn
IF	ónæmisflúrskinn (immunofluorescence)
IFAT	óbein flúrskinsmótefnaprófun
OIE	Alþjóðadýraheilbrigðisstofnunin
IPN(V)	smitnæmt drep í brisi (veira)
ISA(V)	blóðþorri (veira)
PBS	fosfatstillt saltlausn
RNA	ríbósakjarnasýra
RT-(PCR)	víxlritakjarnsýrumögnun (reverse transcriptase (polymerase chain reaction))
SHK-1	nýrnafrumur úr laxi
TCID ₅₀	smitandi skammtur vefjaræktar við 50% endapunkt (tissue culture infective dose at the 50 % end point)