

Vedlegg 7. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for sykdommer på liste 2

I. Innledning

I dette vedlegg fastsettes detaljerte framgangsmåter for de diagnostiske metodene som skal benyttes i forbindelse med laboratorieundersøkelsene i bekjempelses- og overvåkingsprogrammene omhandlet i vedlegg 6, samt for å bekrefte eller utelukke mistanke om forekomst av følgende ikke-eksotiske sykdommer oppført på liste 2 i vedlegg 1:

1.	Infeksiøs lakseanemi (ILA)	Del 1
2.	Hemoragisk virusseptikemi (VHS)	Del 2
3.	Infeksiøs hematopoietisk nekrose (IHN)	Del 2
4.	Koi herpesvirussykdom (KHVD)	Del 3
5.	Infeksjon med <i>Marteilia refringens</i>	Del 4
6.	Infeksjon med <i>Bonamia ostreae</i>	Del 5
7.	Hvitflekkysykdom (WSD)	Del 6

II. Definisjoner

I dette vedlegg menes med «transportmedium» et cellekulturmedium med 10 % kalveserum og med 200 IE penicillin, 200 µg streptomycin og 200 µg kanamycin per milliliter, eller med andre antibiotika med dokumentert virkning.

DEL 1

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV INFEKSIØS LAKSEANEMI (ILA)

I. Framgangsmåter for prøvetaking med henblikk på overvåking og bekjempelse av ILA

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse med henblikk på overvåkings- eller bekjempelsesprogrammene omhandlet i del 1 i vedlegg 6 eller for å bekrefte eller

utelukke forekomst av ILA, skal de detaljerte metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. I.1, I.2 og I.3 i dette avsnitt benyttes.

I.1. Tillaging av fiskeprøver

Ved laboratorieundersøkelser som skal påvise forekomst av ILA, skal det når det er mulig, ikke lages samleprøver av fiskeprøvene. I forbindelse med overvåking av ILA kan 2–5 fisk imidlertid utgjøre en samleprøve.

Prøver til analysering med revers transkriptasepolymerasekjedereaksjon (RT-PCR) skal tas fra all fisk som omfattes av prøvetakingen. En del av midtnyren fjernes fra fisken med et sterilt instrument og overføres til et mikrosentrifugerør med 1 ml RNA-konserverende løsning med dokumentert virkning. Vev fra opptil fem fisk kan samles i et rør med transportløsning og utgjør én samleprøve. Vekten av vevet i én prøve skal være 0,5 g. Dersom fisken er for liten til at det er mulig å oppnå en prøve med denne vekten, kan det tas ut deler av nyre, hjerte, milt, lever eller pylorusblindsekker, i denne rekkefølgen, til prøven utgjør 0,5 g.

Vev til histologisk undersøkelse skal bare tas ut fra nylig avlivet fisk med normal konstitusjon som viser kliniske tegn eller funn *post mortem* som er forenlige med forekomst av ILA. Eventuelle ytre eller indre skader skal tas med i prøven, og i alle tilfeller tas det prøver av midtnyre, hjerte, lever, bukspyttkjertel, tarm, gjeller og milt som fjernes fra hvert individ med skalpell og overføres til 8–10 % (vol/vol) formalinbufret saltløsning. Forholdet mellom fikseringsmiddel og vev skal være minst 20:1 for å sikre tilfredsstillende konservering av vevet. Med henblikk på immunhistokjemi (IHK) skal det tas prøver fra midtnyre og hjerte.

Vev til virologisk undersøkelse i cellekultur skal tas ut fra all fisk som omfattes av prøvetakingen. Deler av lever, fornyre eller midtnyre, hjerte og milt skal fjernes fra fisken med et sterilt instrument og overføres til plastrør med 9 ml transportmedium. Vev fra opptil fem fisk kan samles i et rør med transportløsning og utgjør én samleprøve. Vekten av vevet i én prøve skal være $1,0 \pm 0,5$ g.

I.2. Forsendelse av fiskeprøver

Hel fisk kan transporteres til laboratoriet dersom kravene til temperatur under transport, som beskrevet i tredje ledd i dette nummer, kan oppfylles. Hel fisk skal pakkes i absorberende papir og sendes i en plastpose som kjøles som beskrevet i nevnte ledd.

Levende fisk kan også sendes, men bare under tilsyn av det nasjonale referanselaboratoriet for fiskesykdommer, og idet det tas hensyn til de andre reglene for desinfisering og biosikkerhet som gjelder ved transport av levende fisk.

Blodprøver og rør med fiskevev til virologisk undersøkelse eller RT-PCR-analyse skal plasseres i isolerte beholdere, f.eks. tykkveggede bokser av polystyren, sammen med en tilstrekkelig mengde is eller fryseblokker for å sikre at prøvene holdes kjølig under transport til laboratoriet. Innfrysing skal unngås, og ved mottak av forsendelsen må det fremdeles være is i transportboksen, eller én eller flere av fryseblokkene må fremdeles være helt eller delvis fryst. I unntakstilfeller kan RT-PCR-prøver og prøver til virologisk undersøkelse hurtiginnfryses og transporteres til laboratoriet ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller lavere.

Med henblikk på RT-PCR-analyse av vev som er konserverert i RNAlater, skal RNA-ekstraksjonen utføres innenfor følgende tidsrammer, avhengig av den temperaturen som prøvene oppbevares ved:

Prøver oppbevart ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 dag.

Prøver oppbevart ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 uke.

Prøver oppbevart ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 måned.

Prøver oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: på ubestemt tid.

Dersom fiskevev transporteres i fikseringsmiddel med henblikk på histologisk undersøkelse, skal det sendes i lekkasjesikre rør i støtbestandige beholdere. Innfrysing av prøvene må unngås.

Den virologiske undersøkelsen i cellekultur skal starte så raskt som mulig og senest 48 timer etter prøvetakingen. I unntakstilfeller kan den virologiske undersøkelsen starte senest 72 timer etter prøvetakingen, forutsatt at materialet som skal undersøkes, er beskyttet av et transportmedium og at kravene til temperatur under transport kan oppfylles.

I.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale

Forutsatt at diagnoselaboratoriet godkjenner det, kan annet fiskevev enn vevet omhandlet i nr. I.1 tas ut og tillages med henblikk på supplerende undersøkelse.

II. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking og for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om ILA

Når det foretas laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde en viss helsestatus med hensyn til ILA, som omhandlet i del 1 avsnitt I i vedlegg 6, eller for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om ILA ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i del 1 avsnitt II i vedlegg 6, skal de detaljerte metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. II.1–II.5 benyttes.

II.1. Undersøkelse av prøver med RT-PCR

Den diagnostiske metoden som skal benyttes til påvisning av ILAV, skal være RT-qPCR. Ettersom RT-qPCRresultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, skal det benyttes egnede positive og negative kontroller og amplikoner for å unngå enhver tvil.

II.1.1. Ekstraksjon av totalt RNA

Alt arbeid med RNA skal utføres på is og med hansker.

Totalt RNA ekstraheres ved bruk av fenol/kloroform-metoden eller med spinnkolonner med affinitet for RNA i henhold til produsentens anvisninger.

Renset RNA resuspenderes i destillert RNase-fritt vann (dvs. vann behandlet med 0,1 % dietylpyrokarbonat).

Det ekstraherte RNAets konsentrasjon og renhet beregnes ved å måle den optiske tettheten ved 260 nm og 280 nm. En alternativ metode kan være å benytte interne kontroller rettet mot virusgenomet, som omhandlet i nr. II.1.3.

II.1.2. Påvisning av ILAV med RT-PCR

En rekke RT-PCR-metoder kan benyttes til amplifisering av ILAV-genomet. Det kan utføres totrinns RT-PCR, der RT- og PCR-reaksjonstrinnene gjennomføres i to separate rør. Det kan også utføres en ett-trinnsreaksjon, der to reaksjoner gjennomføres i ett rør. Ett-trinnsmetoden skal benyttes når det er mulig, ettersom risikoen for krysskontaminering minimeres når innholdet ikke trenger å bli overført, og denne metoden anses for å være like følsom som totrinnsmetoden.

Primerne og analysen som beskrives i dette nummer, dvs. primerparet ILA1 eller ILA2 som er rettet mot segment 8, og som er funnet å være egnet til å påvise ILAV i utbrudd og i smittebærende fisk, skal benyttes. Reversprimeren ILA2 er ikke egnet for isolater fra Nord-Amerika, og i slike tilfeller skal et alternativt primersett benyttes.

Foroverprimer (ILA1): 5'-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3'.

Reversprimer (ILA2): 5'-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3'.

Sykluser: 1 syklus ved 50 °C i 30 minutter, 1 syklus ved 94 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder, 72 °C i 60 sekunder, 1 syklus ved 72 °C i 5 minutter. Produktstørrelse: 155 bp.

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre RT-PCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II.1.3. Påvisning av ILAV med RT-qPCR

Bruk av RT-qPCR kan øke spesifisiteten og trolig også følsomheten. Metoden kan utføres raskere fordi det ikke kreves gelelektroforese, samtidig som risikoen for krysskontaminering reduseres fordi det er mulig å beregne mengden genomisk virus-RNA i prøverøret. En ulempe ved RT-qPCR-analysen er at det ofte ikke er mulig å sekvensere amplifiserte produkter. Dersom det er tvil om det amplifiserte produktets spesifisitet, må det utføres en annen ILAV-spesifikk analyse for å kontrollere resultatet.

Analysen beskrevet i dette nummer, som er en analyse rettet mot segment 8, skal benyttes. Denne analysen skal omfatte isolater fra Den europeiske union, Det europeiske frihandelsforbund og Nord-Amerika. Når det er mulig, skal ett-trinnsmetoden benyttes, ettersom en analyse der det benyttes ett rør minimerer risikoen for krysskontaminering.

Foroverprimer: 5'- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3'.

Reversprimer: 5'- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3'.

Probe: 5'-FAM-CATCGTCGCTGCAGTTC – MGBNFQ-3'.

I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Sykluser: 1 syklus ved 50 °C i 30 minutter, 1 syklus ved 95 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder, 60 °C i 60 sekunder (justeres ved behov). Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II.1.4. Sekvensering av amplifiserte PCR-produkter

Foroverprimer (ILAs6-3F): 5'-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3'.

Reversprimer (ILAs6-2R): 5'-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3'.

I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Sykluser (ett-trinns RT-PCR): 1 syklus ved 50 °C i 30 minutter, 1 syklus ved 94 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder, 72 °C i 60

sekunder, 1 syklus ved 72 °C i 5 minutter (justeres ved behov). Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

Alternativt kan følgende metode for sekvensering av HPR i segment 6 benyttes:

Foroverprimer: 5'-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3'.

Reversprimer: 5'-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3'.

Produktstørrelse: 304 nt dersom HPR0.

RT-PCR-analyser med tilsvarende følsomhet og spesifisitet som analysene beskrevet i dette nummer, kan også benyttes.

Det amplifiserte RT-PCR-produktets renhet skal kontrolleres med gelelektroforese før sekvensering. Dersom det bare forekommer ett rent fragment, skal det renses direkte fra PCR-reaksjonen. Dersom det forekommer flere amplifiserte fragmenter, skal fragmentet av interesse renses ved hjelp av gelelektroforese. PCR-fragmentene skal renses for løsninger eller agarosegeler ved bruk av spinnkolonner med affinitet for PCR-fragmenter i henhold til produsentens anvisninger.

Sekvensering skal utføres ved bruk av amplifiseringsprimere hos eksterne foretak spesialisert på sekvensering. Resultatene skal analyseres med søkeverktøyet BLAST, og sekvensene skal sammenlignes med andre kjente sekvenser i NCBI's (National Centre for Biotechnical Information i USA) database over nukleotider.

Sekvenseringen må fjerne enhver tvil om et amplifisert RT-PCR-produkts spesifisitet.

II.2. Isolering av ILAV i cellekulturer

II.2.1. Tillaging av prøver

Vevet kan oppbevares ved -80 °C. Vevet må bare fryses og tines én gang før det undersøkes. Med henblikk på overvåking og bekjempelse skal undersøkelsen utføres så raskt som mulig.

Hver prøve (samleprøve med vev i transportløsning) homogeniseres fullstendig ved hjelp av en validert homogenisator, sentrifugeres ved 2 000–4 000 × g i 15 minutter ved 0–6 °C, og supernatanten filtreres (0,45 µm) og inkuberes med et like stort volum av en passende fortdynnet blanding av antiserum mot de stedege serotypene av IPNV. Antiserumtiteren skal være minst 1:2 000 i en 50 % plaque-nøytralisasjonstest. Blandingen inkuberes i én time ved 15 °C. Dette utgjør inokulatet.

Hensikten med å behandle alle inokulater med antiserum mot IPN-virus (et virus som i noen deler av Europa forekommer i 50 % av alle fiskeprøver), er å hindre at det

utvikles en sykdomsframkallende effekt (CPE) forårsaket av IPN-virus i inokulerte cellekulturer. En slik behandling kan utføres for å redusere de virologiske undersøkelsenes varighet og antall tilfeller der forekomst av CPE vil kunne oppfattes som et mulig tegn på ILAV. Når prøvene stammer fra produksjonsenheter som anses for å være frie for IPN, kan behandling av inokulater med antiserum mot IPN-virus utelates.

II.2.2. Inokulering i cellekulturer

Nyreceller fra atlantisk laks (ASK-celler) skal benyttes til primær isolering av ILAV. Andre cellelinjer med dokumentert effektivitet og følsomhet med tanke på isolering av ILAV kan benyttes, idet det tas hensyn til stammevariasjoner og forskjellige stammers evne til replikasjon i forskjellige cellelinjer. ASK-cellene synes å støtte isolering og vekst av hittil kjente virusisolater, så lenge det benyttes et lavt passasjenivå. Det kan oppstå en tydeligere sykdomsframkallende effekt i ASK-celler enn i andre mottakelige cellelinjer, f.eks. SHK-1 (Salmon head kidney-1).

ASK-celler (passasje 65 eller lavere) dyrkes i et L-15-medium som inneholder 10 % føtalt bovint serum, 2 % (vol/vol) 200 mM L-glutamin og 0,08 % (vol/vol) 50 mM 2-merkaptoetanol i flerbrønnsplater. Antiserumbehandlet organsuspensjon inokuleres i unge, aktivt voksende cellekulturer slik at sluttfortynningen av vevsmaterialet i kulturmediet blir 1:1 000. For hvert organ tilsettes en suspensjon av 40 µl inokulat i en brønn med 2 ml kulturmedium. For å redusere risikoen for krysskontaminering mest mulig skal det benyttes separate 12- eller 24-brønnsplater for prøver fra forskjellige oppdrettsanlegg.

Én plate skal fungere som negativ kontroll og skal ikke inokuleres. En separat plate skal benyttes som positiv kontroll og inokuleres med et referanseisolat av ILAV på følgende måte: 100 µl av et stampreparat av ILAV (minimumstiter 10⁷ TCID₅₀ ml⁻¹ (50 % Tissue Culture Infective Dose) inokuleres i den første brønnen og blandes. Et volum av dette materialet overføres fra den første brønnen til den andre, slik at det oppnås en fortynning på 1:10, og blandes. Dette gjentas over hele platen slik at det oppnås seks tifoldige fortynninger. Stampreparater av ILAV kan oppbevares ved -80 °C i minst to år, men må benyttes innen tre dager etter tining. Krysskontaminering av testplatene med positivt kontrollmateriale må unngås. For å unngå denne risikoen må positive kontroller settes opp og håndteres atskilt fra testplatene. En følsomhetstest av ASK-celler mot ILAV-isolater hver sjette måned kan erstatte bruken av en positiv kontroll ved hver inokulering.

Prøvene inkuberes ved 15 ± 2 °C i opptil 15 dager. Cellekulturene undersøkes med mikroskop med tanke på CPE to ganger, dvs. 5–7 og 12–14 dager etter inokulering. Dersom en samleprøve viser CPE, igangsettes framgangsmåtene for virusidentifisering umiddelbart i samsvar med nr. II.2.4. Dersom ingen CPE observeres innen dag 14, skal IFAT, hemadsorpsjon eller RT-PCR utføres.

II.2.3. Subkultivering

Subkultivering utføres mellom dag 13 og 15. Cellekulturens supernatant tilsettes i brønner med friske, aktivt voksende celler i en egnet fortykning (1:10) i flerbrønnsplater, og inkuberes ved 14 ± 2 °C i opptil 18 dager. Cellekulturene skal undersøkes med mikroskop med tanke på CPE to ganger, dvs. 5–7 og 14–18 dager etter inokulering. Dersom en samleprøve viser CPE, igangsettes framgangsmåtene for virusidentifisering umiddelbart i samsvar med nr. II.2.4. Dersom ingen CPE observeres innen dag 14–18, utføres det en hemadsorpsjonstest eller RT-PCR.

Dersom det oppstår cytotoxisitet i løpet av de første sju dagene av inkubasjonen, utføres subkultivering på dette stadiet, og cellene inkuberes i 14–18 dager og subkultiveres på nytt med ytterligere 14–18 dagers inkubasjon. Dersom det oppstår cytotoxisitet etter sju dager, utføres subkultivering én gang, og cellene inkuberes slik at den samlede inkubasjonstiden fra primærinokuleringen er på 28–36 dager.

Dersom det oppstår bakteriell forurensning i primærkulturen, utføres testen på nytt med det vevshomogenatet som er oppbevart ved -80 °C. Før inokulering sentrifugeres vevshomogenatet ved $4\,000 \times g$ i 15–30 minutter ved $0-6$ °C, og supernatanten filtreres ved $0,22$ µm. Dersom det oppstår bakteriell forurensning under subkultivering, filtreres supernatanten ved $0,22$ µm, inokuleres på friske celler og inkuberes i ytterligere 14–18 dager.

II.2.4. Virusidentifiseringstester

Dersom det i noen av stadiene observeres CPE, eller dersom en hemadsorpsjonstest er positiv, utføres virusidentifisering. De foretrukne metodene for identifisering av ILAV skal være RT-PCR i samsvar med nr. II.1 og immunfluorescens (IF) i samsvar med nr. II.2.6. Dersom det antas at andre virus kan forekomme, utføres supplerende virusidentifiseringstester. Dersom nevnte tester ikke har ført til en sikker identifisering av viruset innen en uke, sendes supernatanten med tanke på umiddelbar identifisering til

- a) Verdens dyrehelseorganisasjons (OIE) referanselaboratorium for ILA eller
- b) et nasjonalt referanselaboratorium eller EU-referanselaboratoriet for fiskesykdommer.

II.2.5. Hemadsorpsjon

Ettersom replikasjon av ILAV i cellekulturer ikke alltid fører til CPE, skal det for hver brønn utføres en RT-PCR- eller en hemadsorpsjonstest i samsvar med dette nummer, eller en IF-test i samsvar med nr. II.2.6.

Cellekulturmediet fjernes fra hver brønn, herunder fra brønnene for positive og negative kontroller, og plasseres i merkede sterile rør. 500 µl av en 0,2 % (vol/vol) suspensjon av vaskede røde blodlegemer fra kanin eller hest, eller en 0,05 % (vol/vol) suspensjon av vaskede røde blodlegemer fra regnbueørret eller atlantisk laks tilsettes i hver brønn og inkuberes ved romtemperatur i 45 minutter. De røde blodlegemene fjernes, og hver brønn vaskes to ganger med L15-medium. Hver brønn undersøkes med mikroskop.

Klynger av røde blodlegemer festet til ASK-cellenes overflate er en indikasjon på en mulig infeksjon med et ortomyksovirus. Dersom en hemadsorpsjonstest er positiv, utføres det umiddelbart en virusidentifiseringstest i samsvar med nr. II.2.4.

II.2.6. Immunfluorescens (IF)

ASK-celler (passasje 65 eller lavere) dyrkes i et L-15-medium som inneholder 10 % føtalt bovint serum, 2 % (vol/vol) 200 mM L-glutamin og 0,08 % (vol/vol) 50 mM 2-merkaptoetanol i flerbrønnsplater, og benyttes ved en sammenflyt på over 50 %. Andre cellelinjer eller vekstmedier med dokumentert effektivitet kan også benyttes. 225 µl supernatant fra kulturen infisert med det antatte viruset tilsettes i hver av de to brønnene og blandes, deretter overføres 225 µl til ytterligere to brønner, dvs. en fortykning på 1:5. Ytterligere to brønner skal fungere som kontroller og skal ikke inokuleres. Prøver fra hvert sted på et oppdrettsanlegg behandles på separate plater, det samme skal viruskontrollen. Som viruskontroll skal det benyttes et referanseisolat av ILAV.

Platene inkuberes ved 14 ± 2 °C og undersøkes med mikroskop i opptil sju dager. Dersom en tidlig CPE observeres, eller dersom ingen CPE observeres i løpet av sju dager, er neste trinn fiksering. Brønnene vaskes med fosfatbufret saltløsning (PBS) og fikseres ved inkubasjon med 80 % aceton i 20 minutter ved romtemperatur. Platene lufttørkes og farges umiddelbart eller oppbevares ved 0–6 °C i høyst 24 timer før farging.

Replikatbrønner farges med en blanding av de monoklonale antistoffene (MAb) 3H6F8 og 1OC9F5 mot ILAV, eller andre monoklonale antistoffer med dokumentert effektivitet og spesifisitet, fortyknes i PBS og inkuberes ved 37 ± 4 °C i 30 minutter. MAb fjernes, og platene vaskes tre ganger med 0,05 % Tween 20 i PBS. Anti-mus-IgG konjugert med fluoresceinisotiocyanat (FITC) fortyknet i PBS tilsettes i hver brønn og inkuberes ved 37 ± 4 °C i 30 minutter. Fortynningene av de forskjellige partiene av MAb og FITC-konjugat skal optimaliseres på hvert laboratorium. Antistoffene fjernes, og platene vaskes tre ganger med 0,05 % Tween 20 i PBS.

Brønnene undersøkes umiddelbart med et invertert mikroskop konfigurert for fluorescensmikroskopi med et egnet filter for eksitasjon av FITC. Dersom det observeres fluorescerende celler, skal en test anses som positiv. For at en test skal

være gyldig skal de positive kontrollene gi positivt resultat, og de negative kontrollene skal gi negativt resultat.

II.3. Undersøkelse av annet vev

Metoden omhandlet i nr. II.2.6 kan benyttes på annet fiskevev, f.eks. lever, milt og hjerte, forutsatt at en rimelig mengde endotelceller, leukocytter eller lymfocytter kan plasseres på objektglasset. Fargemetoden skal være den samme for alt vev, selv om det for enkelte typer vev kan være å foretrekke å utelate farging med propidiumjodid og isteden benytte fasekontrastbelysning for å identifisere celletypene i avtrykket.

II.4. Histologi

Parafininnstøpte snitt skjæres i 5 µm tynne skiver og farges med hematoksylin og eosin.

Histologiske forandringer hos klinisk syk atlantisk laks varierer, men kan omfatte følgende:

- a) Tallrike erythrocytter i sentralvenøs sinus og gjellenes lamellære kapillærer, der det også kan dannes tromber av erythrocytter.
- b) Multifokale til sammenflytende petekkier eller nekrose av hepatocytter eller begge i en viss avstand fra de større blodkarene i leveren, multifokal akkumulering av erythrocytter i dilaterte leversinusoider.
- c) Akkumulering av erythrocytter i blodkar i tarmens lamina propria som etter hvert kan føre til blødning i lamina propria.
- d) Miltens stroma utspilt på grunn av akkumulering av erythrocytter.
- e) Svakt multifokal til omfattende diffus interstitiell blødning med tubulær nekrose i de blødende områdene, akkumulering av erythrocytter i renale glomeruli.
- f) Erytrofagocytose i milt og sekundærblødning i lever og nyre.

II.5. Immunhistokjemi (IHK)

Polyklonale antistoffer mot ILAV-nukleoprotein skal benyttes på parafinsnitt fra formalinfiksert vev. Organene som skal undersøkes, skal være midtnyre og hjerte (overgangsområde, herunder alle tre kamre og klaffer). Mistanke basert på patologiske tegn kontrolleres med en positiv IHK. Histologiske snitt tillages i samsvar med standardmetoder.

- 1) Tillaging av vevssnitt

Vevet fikseres i nøytral fosfatbufret 10 % formalin i minst én dag, dehydreres i stigende konsentrasjoner av etanol, klares i xylen og innstøpes i parafin i henhold til standardprotokoller. Cirka 5 µm tykke snitt (for IHK plassert på poly-L-lysinbelagte objektglass) varmes opp ved 56–58 °C (høyst 60 °C) i 20 minutter, avvokses i xylen, rehydreres i fallende konsentrasjoner av etanol og farges med hematoksylin og eosin med henblikk på patomorfologi og IHK i samsvar med nr. 2.

2) Fargingsmetode for IHK

All inkubasjon utføres ved romtemperatur i et risteapparat, med mindre annet er fastsatt i denne beslutning.

- a) Antigengjenfinning foretas ved å koke snittene i 0,1 M sitratbuffer (pH 6,0) i 2 × 6 minutter etterfulgt av blokkering med 5 % fettfri tørrmelk og 2 % geiteserum i 50 mM TBS (TBS, Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) i 20 minutter.
- b) Deretter inkuberes snittene over natten med primærantistoff (monospesifikt kaninantistoff mot ILAVnukleoprotein) fortynnet i TBS med 1 % fettfri tørrmelk og vaskes deretter tre ganger i TBS med 0,1 % Tween 20.
- c) Til påvisning av bundne antistoffer inkuberes snittene med alkalisk fosfatase-konjugerte antistoffer mot kanin-IgG i 60 minutter. Etter en siste vasking tilsettes Fast Red (1 mg ml⁻¹) og naftol-AS-MX-fosfat (0,2 mg ml⁻¹) med 1 mM levamisol i 0,1 M TBS (pH 8,2). La stå i 20 minutter. Deretter vaskes snittene i springvann før motfarging med Harris-hematoksylin og monteres i vandig monteringsmedium. ILAV-positive og ILAVnegative vevssnitt skal inngå som kontroller i hvert oppsett.

3) Tolking av IHK-resultater

IHK-resultatene tolkes som angitt i bokstav a) og b) som følger:

- a) Kontrollsnittene anses som positive når det observeres en klart synlig rødfarging av cytoplasma og intranukleært i endotelcellene i endokardiets blodkar. Et testsnitt anses bare som positivt dersom endotelcellene har en slik tydelig, intranukleær rødfarging.
- b) Kontrollsnittene anses som negative dersom det ikke forekommer noen betydelige fargereaksjoner.

Ettersom den intranukleære plasseringen er spesifikk for ortomyksovirusets nukleoprotein i en fase av virusreplikasjonen, men den samtidige cytoplasmiske fargingen ofte er dominerende, skal cytoplasmiske mønstre og andre

fargingsmønstre uten intranukleær plassering anses som ikke-spesifikke eller usikre.

De sterkeste positive fargingsreaksjonene oppnås normalt i endotelceller fra hjerte og nyre. I svært omfattende hemoragiske lesjoner kan endotelfargingsreaksjonene være svake eller fraværende, trolig på grunn av lysis av infiserte endotelceller.

DEL 2

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV IHN OG VHS

I. Diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking av VHS og IHN

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde helsestatus som sykdomsfri med hensyn til IHN eller VHS, som omhandlet i del 2 avsnitt I i vedlegg 6, ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 1 nr. II.1 og II.2 i nevnte vedlegg, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. I.1–I.6 benyttes.

I.1. Tillaging og forsendelse av fiskeprøver

I.1.1. Vev til virologisk undersøkelse i cellekultur

Før forsendelse eller overføring til laboratoriet skal deler av de organene som skal undersøkes, fjernes fra fisken med sterile disseksjonsinstrumenter og overføres til sterile plastrør med transportmedium.

Mengden fiskemateriale som er egnet til virologisk undersøkelse i cellekultur og RT-qPCR, avhenger av fiskens størrelse. Vevet det skal tas prøver av, er derfor hel yngel (lengde < 4 cm), indre organer, herunder nyre (4 cm < lengde < 6 cm), eller, for større fisk, nyre, milt, hjerte og/eller hjerne samt rognvæske fra stamfisk på gytetidspunktet.

Rogn- eller spermvæske eller organdeler fra høyst ti fisk kan samles i et sterilt rør som inneholder minst 4 ml transportmedium, og utgjør én samleprøve. Vevet i hver prøve skal veie minst 0,5 gram (g).

Den virologiske undersøkelsen i cellekultur skal starte så raskt som mulig og senest 48 timer etter prøvetakingen. I unntakstilfeller kan den virologiske undersøkelsen starte senest 72 timer etter prøvetakingen, forutsatt at materialet som skal undersøkes, er beskyttet av et transportmedium og at kravene til temperatur under transport kan oppfylles.

I.1.2. Prøver til analysering med revers transkriptasepolymerasekjedereaksjon (RT-PCR eller RT-qPCR)

Fiskeprøvene skal tas ved hjelp av et sterilt instrument og overføres til et sterilt plastrør med transportmedium i samsvar med framgangsmåten beskrevet i nr. I.1.1. Vev fra ti fisk kan samles i et rør og utgjør én samleprøve. Dersom mengden inokulat er liten, kan vev fra opptil fem fisk benyttes. Alternativt kan prøver samles i RNASTabiliserende reagenser, f.eks. 0,2 g vev/ml reagens i henhold til produsentens anbefalinger, selv om hver fisk skal behandles separat og ikke skal samles med andre i prøvene på grunn av den lille mengden materiale som skal benyttes til ekstraksjon.

Hel fisk kan også sendes til laboratoriet.

I.2. Forsendelse av fiskeprøver

Rør med fiskevev i transportmedium til celledyrking eller til RT-PCR-/RT-qPCR-analyse plasseres i isolerte beholdere, f.eks. tykkveggede bokser av polystyren, sammen med en tilstrekkelig mengde is eller et alternativt kjølemiddel med samme kjøleeffekt for å sikre at prøvene oppbevares kjølig under transport til laboratoriet. Innfrysing av prøvene må imidlertid unngås. Prøvens temperatur under transport må aldri overstige 10 °C, og ved mottak må det fremdeles være is i transportboksen, eller én eller flere fryseblokker må fremdeles være helt eller delvis fryst.

Hel fisk kan sendes til laboratoriet dersom kravene til temperatur under transport omhandlet i første ledd, kan oppfylles. Hel fisk pakkes i absorberende papir og sendes deretter i en plastpose. Levende fisk kan også sendes.

I.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale

Dersom diagnoselaboratoriet har godkjent det, kan det tas prøver av annet fiskevev som tillages med henblikk på supplerende undersøkelser.

I.4. Tillaging av prøver til undersøkelse i cellekultur og med RT-qPCR

I.4.1. Innfrysing i unntakstilfeller

Dersom det oppstår praktiske vansker som gjør det umulig å behandle fiskevevsprøvene innen 48 timer etter at de er tatt, kan vevsprøvene fryses i transportmedium ved høyest -20 °C og den virologiske undersøkelsen utføres innen 14 dager. Fiskevev må imidlertid bare fryses og tines én gang før undersøkelsen. Årsaken til innfrysing av fiskevevsprøvene skal registreres hver gang.

I.4.2. Homogenisering av organer

På laboratoriet homogeniseres fiskevevet i rørene fullstendig, enten ved hjelp av en stomacher, blander eller morter og pistill med steril sand, deretter suspenderes vevet i det opprinnelige transportmediet.

Dersom en prøve består av en hel fisk som er kortere enn 4 cm, findeles den med en steril saks eller skalpell etter at den delen av kroppen som er plassert bak gattåpningen, er fjernet. Dersom en prøve består av en hel fisk med en kroppslengde på 4–6 cm, tas det prøver av indre organer, herunder nyre. Dersom en prøve består av en hel fisk som er over 6 cm lang, tas vevsprøvene som beskrevet i nr. I.1. Vevsprøvene findeles med en steril saks eller skalpell og homogeniseres som beskrevet i første ledd i dette nummer, og suspenderes i transportmedium.

Det endelige forholdet mellom vevsmateriale og transportmedium skal justeres på laboratoriet til 1:10.

I.4.3. Sentrifugering av homogenat

Homogenatet sentrifugeres i en kjølesentrifuge ved 2–5 °C og 2 000–4 000 × g i 15 minutter, hvorpå supernatanten samles opp og kan behandles med antibiotika i enten fire timer ved 15 °C eller over natten ved 4–8 °C. Dersom prøven er sendt i et transportmedium, kan behandling av supernatanten med antibiotika utelates.

Dersom det oppstår praktiske vansker, f.eks. at inkubatoren går i stykker eller det oppstår problemer med cellekulturer, som gjør det umulig å inokulere celler innen 48 timer etter at fiskevevsprøvene er tatt, kan supernatanten fryses ved –80 °C og den virologiske undersøkelsen utføres innen 14 dager.

Dersom den oppsamlede supernatanten oppbevares ved –80 °C innen 48 timer etter prøvetaking, kan den bare gjenbrukes én gang til virologisk undersøkelse.

Før inokulering av cellene blandes supernatanten med like deler av en passende fortynnet blanding av antiserum mot de stedege serotypene av infeksjøs pankreasnekrosevirus (IPN-virus) og inkuberes med dette i minst én time ved 15 °C eller høyst 18 timer ved 4 °C. Antiserumets titer skal være minst 1/2 000 i en 50 % plaque-nøytralisasjonstest.

Hensikten med å behandle alle inokulater med antiserum mot IPN-virus er å hindre at det utvikles en sykdomsframkallende effekt (CPE) som følge av IPN-virus i inokulerte cellekulturer. Dette vil redusere de virologiske undersøkelsenes varighet og antall tilfeller der forekomst av CPE vil måtte oppfattes som et mulig tegn på VHS- eller IHN-virus.

Når prøver stammer fra produksjonsenheter som anses for å være frie for IPN, kan behandling av inokulater med antiserum mot IPN-virus utelates.

I.4.4. Tillaging av prøver til RT-PCR- og RT-qPCR-baserte overvåkingsprogrammer

Dersom prøvene er plassert i transportmedium, benyttes framgangsmåten beskrevet i nr. I.4.2 og I.4.3. Etter sentrifugering samles supernatanten opp og RNA ekstraheres. Dersom det ikke skal foretas ytterligere undersøkelser rett etter sentrifugering, fryses prøvene omgående ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller lavere.

Ved analysering av fiskevev som er konservert i RNA-stabiliserende reagens, utføres det etterfølgende arbeidet innenfor følgende tidsfrister for prøver oppbevart ved forskjellige temperaturer:

prøver oppbevart ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 dag,

prøver oppbevart ved $25\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 uke,

prøver oppbevart ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$: 1 måned,

prøver oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$: på ubestemt tid.

Samleprøver i RNA-stabiliserende reagens skal behandles som enkeltprøver i RNA-stabiliserende reagens. For prøver som samles i RNA-stabiliserende reagens, skal prøvemengden ikke overskride den som anbefales av produsenten for ekstraksjon med RNA-sett, f.eks. RNeasy Minikit (Qiagen) eller lignende. Dersom det lages større samleprøver, må ekstraksjonssettene eller -metodene gjenspeile dette.

Prøver som er tatt i RNA-stabiliserende reagenser, skal ikke benyttes til celledyrking.

I.4.5. Samleprøver til RT-qPCR

Ettersom RT-qPCR-protokollene har lik eller høyere følsomhet enn celledyrkingsmetodene, kan det ved PCR være akseptabelt å benytte supernatant fra homogenisert fiskevevsmateriale bestående av organer fra opptil ti fisk samlet i cellekulturmedium. Ettersom det benyttes en mye mindre mengde inokulat ved PCR enn ved celledyrking, skal alt fiskevev være nøyte homogenisert før materialet samles med henblikk på ekstraksjon.

Samme prinsipp skal også benyttes dersom prøvene er tatt i RNA-stabiliserende reagenser. I dette tilfellet er det imidlertid ofte vanskelig å innhente et representativt materiale fra opptil ti fisk i ett rør, og antall fisk per samleprøve skal derfor reduseres til 2–5.

I.5. Virologisk undersøkelse i cellekultur

I.5.1. Cellekulturer og medier

Celler fra cellelinjen Bluegill fry (BF-2) eller cellelinjen Rainbow trout gonad (RTG-2) og enten *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) eller Fathead minnow (FHM) dyrkes ved 20–30 °C i et egnet medium, dvs. Eagle's Minimum Essential Medium (MEM), eller modifikasjoner av dette, tilsatt 10 % føtalt bovint serum og antibiotika i standardkonsentrasjoner.

Når cellene dyrkes i lukkede glass, bufres mediet med hydrogenkarbonat. Mediet som benyttes til dyrking av celler i åpne enheter, kan bufres med tris(hydroksymetyl)aminometan-HCl (Tris-HCl) (23 mM) og natriumhydrogenkarbonat (6 mM). pH-verdien skal være $7,6 \pm 0,2$.

Cellekulturene som skal benyttes til inokulering med fiskevevsmateriale, skal når det er mulig, være unge, normalt én dag gamle monolag-cellekulturer. Cellekulturer som er 4–48 timer gamle, kan imidlertid aksepteres. Cellene skal være aktivt voksende ved inokuleringen.

I.5.2. Inokulering av cellekulturer

For å hindre homolog interferens skal antibiotikabehandlede organsuspensjoner inokuleres i cellekulturer i to fortyntinger, dvs. primærfortynningen pluss en fortynting på 1:10 av denne, noe som fører til sluttfortyntinger av vevsmateriale i cellekulturmedium på henholdsvis 1:100 og 1:1 000. Minst to cellelinjer skal inokuleres i samsvar med nr. I.5.1. Forholdet mellom mengden inokulat og volumet av cellekulturmedium skal være omtrent 1:10.

For hver fortynting og hver cellelinje skal det benyttes et celleareal på over 2 cm², noe som tilsvarer én brønn i en cellekulturplate med 24 brønner. Cellekulturplater skal benyttes når det er mulig.

I.5.3. Inkubasjon av cellekulturer

De inokulerte cellekulturene inkuberes ved 15 °C i 7–10 dager. Dersom cellekulturmediet endrer farge fra rød til gul, noe som tyder på forsuring av mediet, justeres pH-verdien med steril hydrogenkarbonatløsning eller tilsvarende for å sikre cellenes mottakelighet for virusinfeksjon.

Minst hver sjettede måned eller ved mistanke om at cellenes mottakelighet er redusert skal fryste lagre av VHSV og IHNV titreres for å kontrollere cellekulturenes mottakelighet for infeksjon. Dersom det er mulig, skal framgangsmåten beskrevet i avsnitt III benyttes.

I.5.4. Mikroskopi

Inokulerte cellekulturer skal undersøkes jevnlig, minst tre ganger i uken, ved $40\text{--}150\times$ forstørrelse med tanke på forekomst av CPE. Dersom det observeres en tydelig CPE, startes framgangsmåtene for virusidentifisering i samsvar med nr. I.6 umiddelbart.

I.5.5. Subkultivering

Dersom ingen CPE er utviklet etter primærinkubasjonen i 7–10 dager, skal det foretas subkultivering med friske cellekulturer på et celleareal av samme størrelse som primærkulturens.

Delmengder av medium (supernatant) fra alle kulturer eller brønner som utgjør primærkulturen, samles i henhold til cellelinje 7–10 dager etter inokulering, og inokuleres deretter i homologe cellekulturer som er uforynnet og fortynt 1:10 (som gir sluttfortynninger på henholdsvis 1:10 og 1:100 av supernatanten), som beskrevet i nr. I.5.2. Alternativt inokuleres delmengder av 10 % av det mediet som utgjør primærkulturen, direkte i en brønn med frisk cellekultur (dvs. subkultivering fra brønn til brønn). Før inokuleringen kan det foretas preinkubasjon av fortyningene med antiserum mot IPN-virus i en passende fortynting som beskrevet i nr. I.4.3.

De inokulerte kulturene inkuberes deretter i 7–10 dager ved $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ og undersøkes i samsvar med nr. I.5.4.

Dersom det oppstår en giftig CPE i løpet av de første tre inkubasjonsdagene, foretas subkultivering på dette stadiet, men cellene skal deretter inkuberes i sju dager og subkultiveres igjen med ytterligere sju dagers inkubasjon. Dersom det utvikles en giftig CPE etter tre dager, skal cellene subkultiveres én gang og inkuberes slik at det går i alt 14 dager fra primærinokuleringen. Det må ikke være tegn på giftighet i de siste sju dagene av inkubasjonen.

Dersom det oppstår bakteriell forurensning til tross for behandling med antibiotika, skal supernatanten før subkultivering sentrifugeres ved $2\ 000\text{--}4\ 000\times g$ i 15–30 minutter ved $2\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ eller filtreres gjennom et $0,45\ \mu\text{m}$ filter (membran med svak proteinbinding) eller begge deler. Framgangsmåtene for subkultivering er de samme som dem som er beskrevet for giftig CPE i fjerde ledd i dette nummer.

Dersom ingen CPE forekommer, kan testen erklæres som negativ.

I.6. Virusidentifisering

Dersom det observeres tegn på CPE i en cellekultur, samles mediet (supernatanten) opp og undersøkes med én eller flere av følgende metoder: enzymmerket antistoffprøve (ELISA), immunfluorescens (IF), nøytralisasjon, RT-PCR eller RT-qPCR. Dersom disse testene ikke fører til en sikker identifisering av viruset i løpet av én uke, skal supernatanten sendes til det nasjonale referanselaboratoriet eller til EU-referanselaboratoriet for fiskesykdommer, med henblikk på umiddelbar identifisering.

I.6.1. ELISA

Det skal utføres en antigen-ELISA med doble antistoffer for å identifisere virusisolatet. Mikrotiterplater belegges med 50 µl/brønn (0,9 pg) protein A-rensede immunglobuliner (Ig) av dokumentert kvalitet fra kaninantiserum mot IHNV eller VHSV fortynnet i karbonatbuffer (pH 9,6) som inneholder 15 mM natriumazid, og inkuberes fra 18 timer til to uker ved 4 °C.

På en fortynningsplate fortynnes hver prøve som inneholder 1 % Triton X-100, og de positive kontrollene fortynnes med bufferløsning (dvs. fosfatbufret saltløsning (PBS)-T-BSA, 1 % BSA) i en firfoldig fortynning: ufortynnet, 1:4, 1:16, 1:64. ELISA-platene vaskes i PBS som inneholder 0,05 % Tween-20 (PBS-T), og 50 µl av hver fortynning overføres fra fortynningsplaten til den vaskede og belagte ELISA-platen.

I neste trinn inkuberes ELISA-platene i 30 minutter ved 37 °C. Deretter vaskes platene og inkuberes i 30 minutter ved 37 °C med spesifikke monoklonale antistoffer (dvs. MA5B11 til identifisering av VHSV og Hyb 136-3 til identifisering av IHNV). 50 µl kaninantistoffer mot mus konjugert med pepperrotperoksidase (HRP) fortynnet 1:1 000 i PBS-T-BSA overføres til ELISA-platen.

Etter en ny vasking startes reaksjonene ved å tilsette 50 µl/brønn ortofenylendiamin (OPD). ELISA-platene inkuberes mørkt i 20 minutter ved romtemperatur, og reaksjonen stoppes ved å tilsette 100 µl/brønn 0,5 M H₂SO₄.

Absorbans måles ved en bølgelengde på 492 og 620 nm i en ELISA-leser. Prøvene erklæres som positive eller negative når testresultatene er sammenlignet med absorbansverdiene for de positive og negative kontrollene. Generelt anses prøver med kombinert absorbans (A) < 0,5 for ufortynnet materiale som negative, prøver med A-verdier mellom 0,5 og 1,0 anses som mistenkelige, og prøver med A-verdier > 1,0 anses som positive.

Andre ELISA-versjoner med dokumentert lignende effektivitet kan benyttes istedenfor dem som omhandles i dette nummer.

I.6.2. Immunfluorescens (IF)

De listeførte sykdomsframkallende virusene VHSV og IHNV identifiseres ved å infisere celler i 96-brønners «Black»plater, konvensjonelle 24-brønnsplater eller på dekkglass i 24-brønnsplater. Når IHNV eller VHSV eller begge identifiseres ved å infisere celler på dekkglass, skal følgende protokoll benyttes:

- a) På dekkglass utstrykes det celler med en tetthet som gir 60–90 % sammenflyt etter 24 timers dyrking. Når det er mulig, skal det til dette formålet benyttes EPC-celler, ettersom de adhererer svært godt til glassoverflater, men andre cellelinjer, f.eks.

BF-2, RTG-2 eller FHM, kan også benyttes. 150 µl cellekultursupernatant i to forskjellige fortynninger (1:10 og 1:1 000) inokuleres i duplikat på én dag gamle monolag og inkuberes ved 15 °C i 24 timer.

- b) Deretter fjernes cellekulturmediet, og de infiserte cellemonolagene fikseres med 0,5 ml iskald, vandig acetonløsning (80 % vol/vol). Fikseringen utføres i avtrekkshette i 15 minutter ved romtemperatur, deretter fjernes acetonløsningen og dekkglassene lufttørkes i minst 30 minutter. På dette stadiet skal platene enten behandles umiddelbart eller oppbevares ved -20 °C til senere bruk.
- c) Spesifikke monoklonale antistoffer (dvs. MAb IP5B11 til identifisering av VHSV og Hyb 136-3 til identifisering av IHNV) fortynnes i 0,01 M PBST (pH 7,2) i den fortynningen som anbefales av leverandøren av de monoklonale antistoffene; 50–100 µl/brønn tilsettes i det fikserte monolaget, og platene inkuberes i én time ved 37 °C i et fuktkammer.
- d) Dekkglassene vaskes forsiktig tre ganger med PBS som inneholder 0,05 % Tween-20 (PBS-T), og bufferen fjernes helt etter siste skylling. Cellene inkuberes deretter i én time ved 37 °C med antistoff mot mus-immunglobulin konjugert med fluoresceinisotiocyanat (FITC) eller tetrametylrhodamin-5-(og-6-)-isotiocyanat (TRITC) brukt som primærantistoff og fortynnet i henhold til leverandørens anvisninger, deretter vaskes cellene i PBS-T og tørkes. Fargede kulturer monteres på objektglass ved hjelp av glyserol-saltløsning og undersøkes under innfallende ultrafiolett (UV) lys. 10 × eller 12 × okularer og et × 25 eller × 40 objektiv med blender på henholdsvis > 0,7 og > 1,3 skal benyttes.

Andre IF-teknikker (med hensyn til cellekulturer, fiksering og antistoffer av referanse kvalitet) med dokumentert tilsvarende effektivitet kan benyttes.

I.6.3. Nøytralisasjon

Celler fra den oppsamlede supernatanten fjernes ved sentrifugering (2 000–4 000 × g) eller membranfiltrering (0,45 µm) med en membran med svak proteinbinding, og supernatanten fortynnes 1:100 og 1:10 000 i cellekulturmedium.

Delmengder av minst to supernatantfortynninger blandes og inkuberes separat i 60 minutter ved 15 °C med like deler av følgende reagenser:

- a) Serum som inneholder gruppespesifikke antistoffer mot VHSV fortynnet i forholdet 1:50 (vol/vol).
- b) Serum som inneholder gruppespesifikke antistoffer mot IHNV fortynnet i forholdet 1:50 (vol/vol).

c) En blanding av antisera mot de stedeagne serotypene av IPNV fortynnet i forholdet 1:50 (vol/vol).

d) Medium alene (positiv kontroll).

Minst to cellekulturer inokuleres ved hjelp av 50 µl av supernatant-serum-blandingen for hvert virus og inkuberes deretter ved 15 °C. Utviklingen av CPE kontrolleres som beskrevet i nr. I.5.4.

VHSV-stammer og -isolater som ikke reagerer i nøytralisasjonstester, skal identifiseres med IF eller ELISA.

Andre nøytralisasjonstester med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

I.6.4. RT-PCR/RT-qPCR

I.6.4.1. Tillaging av viralt RNA

Alt arbeid med RNA skal utføres på is og med hansker.

RNA skal ekstraheres ved bruk av fenol/kloroform-metoden eller med spinnkolonner med affinitet for RNA i henhold til produsentens anvisninger. Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige RNA-ekstraksjonssett som vil gi RNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med RT-PCR-protokollene beskrevet i numrene nedenfor.

RNA resuspenderes i destillert RNase-fritt vann (dvs. vann behandlet med 0,1 % dietylpyrokarbonat) eller en egnet elueringsbuffer.

I.6.4.2. RT-PCR

Følgende primere skal benyttes til påvisning av IHNV:

Foroverprimer 5'-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3'.

Reversprimer 5'-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3'.

Følgende sykluser skal benyttes (ett-trinns RT-PCR): 1 syklus: 50 °C i 30 minutter, 1 syklus: 95 °C i 2 minutter, 30 sykluser: 95 °C i 30 sekunder, 50 °C i 30 sekunder, 72 °C i 60 sekunder, 1 syklus: 72 °C i 7 minutter og bløtlegging ved 4 °C.

Følgende primere skal benyttes til påvisning av VHSV:

VN For 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3'.

VN Rev 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3'.

Følgende sykluser skal benyttes (ett-trinns RT-PCR): 50 °C i 30 minutter, 95 °C i 15 minutter, 35 sykluser ved 94 °C i 30 sekunder, 55 °C i 30 sekunder og 68 °C i 60 sekunder. Deretter skal reaksjonen holdes ved 68 °C i 7 minutter.

RT-PCR-reaksjonenes kvantitet og spesifisitet skal vurderes ved hjelp av gelelektroforese i 1,5 % agarosegel med etidiumbromid og observeres ved hjelp av UV-gjennomlysning. Et PCR-amplikon på 693 bp kan observeres for IHNV. For VHSV skal størrelsen være 505 bp.

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. For å unngå enhver tvil skal det derfor benyttes egnede positive og negative kontroller og sekvenserte amplikoner. Når det gjelder VHSV-primere, må det utvises særlig forsiktighet ved bruk av BF-2-celler, ettersom primerne kan reagere med cellelinjens DNA/RNA og gi falskt positive resultater av lignende størrelse. Når supernatant fra BF-2-celler testes, skal alle amplifiserte PCRfragmenter sekvenseres.

I.6.4.3. RT-qPCR for VHSV

Når det gjelder VHSV, utføres amplifisering med følgende primere og probe:

Foroverprimer: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3'.

Reversprimer: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3'.

Probe: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

Ett-trinns RT-qPCR:

I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Sykluser: 50 °C i 30 minutter, 95 °C i 15 minutter, 40 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder, 60 °C i 40 sekunder, 72 °C i 20 sekunder (justeres ved behov). Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

I.6.4.4. RT-qPCR for IHNV

Når det gjelder IHNV, skal amplifisering utføres ved bruk av følgende primere og probe:

Foroverprimer: 5'-AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3'.

Reversprimer: 5'- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA - 3'.

Probe: 5' 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

Totrinns RT-qPCR:

Ettersom følgende analyse bygger på en amplifisering i to trinn, må det for å unngå kontaminering utvises særlig stor forsiktighet ved håndtering av rørene mellom første og andre reaksjon.

Sykluser (etter RT-trinnet): 50 °C i 2 minutter, 95 °C i 10 minutter, deretter 40 sykluser ved 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 1 minutt (justeres ved behov).

Andre RT-PCR- eller RT-qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om VHS eller IHN eller begge ved mistanke om utbrudd

Dersom det kreves at det utføres en laboratorieundersøkelse for å bekrefte eller utelukke forekomst av IHN eller VHS eller begge ved bruk av de diagnostiske metodene som er beskrevet i del 2 nr. II.3 i vedlegg 6, skal følgende diagnostiske metoder og framgangsmåter benyttes:

- a) Konvensjonell virusisolering med etterfølgende serumnøytralisasjon, immunkjemisk eller molekylær virusidentifisering.
- b) Viruspåvisning med RT-PCR eller RT-qPCR.
- c) Andre diagnostiske metoder, f.eks. IFAT, ELISA, RT-PCR, IHK.

II.1. Konvensjonell virusisolering med etterfølgende virusidentifisering

II.1.1. Utvelging av prøver

Minst ti fisk med typiske tegn på IHN eller VHS skal velges for undersøkelse.

II.1.2. Tillaging og forsendelse av fiskeprøver

Ved tillaging og forsendelse med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.2 benyttes.

II.1.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale

Ved innsamling av supplerende materiale med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.3 benyttes.

II.1.4. Tillaging av prøver til cellekulturundersøkelse

Ved tillaging av prøver til cellekulturundersøkelse med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.4 benyttes.

II.1.5. Virologisk undersøkelse i cellekultur

Ved virologisk undersøkelse med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.5 benyttes.

II.1.6. Virusidentifisering

Ved virusidentifisering med henblikk på konvensjonell virusisolering skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.6 benyttes.

II.2. Viruspåvisning med RT-qPCR

II.2.1. Utvelging av prøver

Ved utvelging av prøver med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.1.2 benyttes.

II.2.2. Tillaging og forsendelse av fiskeprøver

Ved tillaging og forsendelse med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.2 benyttes.

II.2.3. Innsamling av supplerende diagnostisk materiale

Ved innsamling av supplerende diagnostisk materiale med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.3 benyttes.

II.2.4. Tillaging av prøver til RT-qPCR

Ved tillaging av prøver med henblikk på viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.6.4.1 benyttes.

II.2.5. RT-qPCR

Ved viruspåvisning med RT-qPCR skal metodene og framgangsmåtene fastsatt i nr. I.6.4.1, I.6.4.3 og I.6.4.4 benyttes.

II.3. Andre diagnostiske metoder

Supernatant, tillaget som beskrevet i nr. I.4.3, kan analyseres med ELISA, indirekte fluorescens-antistoffteknikk (IFAT) eller RT-PCR i samsvar med henholdsvis nr. I.6.1, I.6.2 eller I.6.4. Vevsmaterialet kan analyseres med andre diagnostiske metoder, f.eks. med IFAT på frysesnitt eller immunhistokjemi på formalinfiksert vevsmateriale. Disse raske metodene skal suppleres med en virologisk undersøkelse i samsvar med enten nr. II bokstav a) eller nr. II bokstav b) innen 48 timer etter prøvetaking dersom

a) resultatet er negativt, eller

b) resultatet er positivt med materiale fra det første tilfellet av IHN eller VHS.

III. Framgangsmåte for titrering for å kontrollere cellekulturenes mottakelighet for infeksjon

Ved titrering for å kontrollere cellekulturenes mottakelighet for infeksjon, som omhandlet i nr. I.5.3, skal følgende framgangsmåter i dette nummer benyttes.

Det skal benyttes minst to VHSV-isolater og ett IHNV-isolat. Isolatene skal representere hovedgruppen av virus i Den europeiske union, dvs. for VHSV ett sykdomsframkallende isolat fra regnbueørret i ferskvann og ett marint isolat som er sykdomsframkallende for piggvar, og for IHNV en EU-stamme som er sykdomsframkallende for regnbueørret. Det skal benyttes veldefinerte isolater fra medlemsstatene. Viruspartier i cellekulturer med lavt passasjetall dyrkes i cellekulturflasker på BF-2- eller RTG-2-celler for VHSV og på EPC- eller FHM-celler for IHNV. Det skal benyttes cellekulturmedium med minst 10 % serum. Til inokulering benyttes en lav MOI (< 1).

Ved full CPE høstes viruset ved sentrifugering av cellekultursupernatanten ved 2 000 × g i 15 minutter, filtersteriliseres gjennom et 0,45 µm membranfilter og fordeles i merkede kryorør. Viruset skal oppbevares ved –80 °C.

En uke etter innfrysing tines tre glass med hvert virus i kaldt vann og titreres på sine respektive cellelinjer. Minst hver sjette måned, eller ved mistanke om at en cellelinjes mottakelighet er redusert, tines og titreres hvert virusisolat.

Framgangsmåtene for titrering skal beskrives detaljert, og samme framgangsmåte skal benyttes hver gang.

Titring til fortynningsendepunktet skal gjentas minst seks ganger for hvert fortynningstrinn. Titerne skal sammenlignes med tidligere titere. Dersom titeren for et av de tre virusisolatene faller med en faktor på minst to logaritmer sammenlignet med den opprinnelige titeren, skal cellelinjen ikke lenger benyttes til overvåkingsformål.

Dersom det oppbevares forskjellige cellelinjer på laboratoriet, skal hver rekke undersøkes separat.

Dokumentasjonen skal oppbevares i minst ti år.

DEL 3

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV KOI HERPESVIRUSSYKDOM (KHVD)

I. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om KHVD

Dersom det kreves at det utføres en laboratorieundersøkelse for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om KHVD ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 3 avsnitt III i vedlegg 6, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. I.1–I.2 i denne del benyttes.

I.1. Tillaging av fiskeprøver

Til diagnostiske formål kan fisken (sendt levende eller avlivet og pakket separat i forseglede aseptiske beholdere), eller alternativt fryste organer eller organdeler konservert i 80 % til absolutt etanol eller virustransportmedium (må behandles innen 48 timer etter prøvetaking), benyttes til testing med konvensjonelle PCR- eller qPCR-baserte metoder.

Med henblikk på påvisning av KHV skal det tas prøver av gjeller og nyre, i tillegg kan milt, hjerne og tarm inngå i en ytterligere separat prøve. I akutte tilfeller kan vevsmateriale fra opptil fem fisk utgjøre en samleprøve.

Videre kan prøver som tas uten at dyret avlives, f.eks. blodprøver, svaberprøver fra gjeller, biopsi av gjeller og skrapeprøver fra slimhinner, i visse tilfeller benyttes (det vil si at svært verdifull fisk kan benyttes ved mistanke om forekomst av KHV).

I.1.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter.

Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene beskrevet i nr. I.2.

I.2. Påvisning og identifisering av agens med metoder basert på polymerasekjedereaksjon (PCR)

I.2.1. Påvisning av KHV med qPCR

Til påvisning av KHV med qPCR skal følgende qPCR-analyse benyttes:

Foroverprimer (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3'.

Reversprimer (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3'.

Probe (KHV-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Sykluser: 1 syklus ved 95 °C i 15 minutter, deretter 40 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder og 60 °C i 60 sekunder. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

I.2.2. Påvisning av KHV med konvensjonell PCR

Analysen beskrevet i dette nummer, som er rettet mot tymidinkinase-genet (TK) i KHV, skal benyttes. Andre PCRanalyser med dokumentert tilsvarende følsomhet og spesifisitet som den analysen som beskrives, kan også benyttes.

Foroverprimer (KHV-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3'.

Reversprimer (KHV-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Sykluser: 1 syklus ved 95 °C i 5 minutter, deretter 35 sykluser ved 95 °C i 30 sekunder, 52 °C i 30 sekunder, 72 °C i 1 minutt og 1 syklus ved 72 °C i 10 minutter. Produktstørrelsen bør være 409 bp.

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre PCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

Den første påvisningen i et område skal bekreftes ved sekvensering eller sendes til et nasjonalt referanselaboratorium eller til EU-referanselaboratoriet for fiskesykdommer med henblikk på umiddelbar identifisering.

II. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking av KHVD

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde visse helsestatuser med hensyn til KHVD, som omhandlet i del 3 avsnitt I i vedlegg 6,

ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 3 avsnitt II eller III i nevnte vedlegg, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. II.1 og II.2 i denne del benyttes.

II.1. Tillaging av fiskeprøver

Dersom det er mulig, skal det tas prøver av fisk som i en lengre periode er blitt holdt ved en temperatur der viruset kan utvikle seg (dvs. 2–3 uker ved 15–26 °C). Dersom det er mulig, skal prøvene tas 24 timer, og senest 72 timer, etter driftsrutiner som kan reaktivere viruset i fisk med status som virusbærer, f.eks. håving eller transport, for å øke muligheten for påvisning av KHV.

Med henblikk på overvåking av KHVD kan fisken (sendt levende eller avlivet og pakket separat i forseglede aseptiske beholdere), eller alternativt frysede organer eller organdeler konservert i 80–100 % alkohol eller virustransportmedium (må behandles innen 48 timer etter prøvetaking), benyttes til testing med PCR-baserte metoder. Med henblikk på overvåking av KHVD skal det tas prøver av gjelle- og nyrevev.

Med henblikk på overvåking av KHVD skal samleprøver unngås når det er mulig. Dersom det er nødvendig å lage samleprøver, kan vevsmateriale fra høyst to fisk utgjøre en samleprøve. Større prøver skal homogeniseres med en morter og pistill eller i en stomacher, og delprøver skal tas ut til DNA-ekstraksjon før klaring. Alternativt kan det tas ut delprøver fra hvert vev i prøven som plasseres i lyseringsrør.

II.1.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter. Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene beskrevet i nr. II.2.

Det akseptable forholdet mellom vev og medium er 1:9 w/v. I testene skal det inngå 20–25 mg vevsmateriale.

II.2. Overvåking av KHVD med PCR-baserte metoder

Til overvåking av KHV skal qPCR benyttes. Dersom det forekommer positive prøver i et område som tidligere ikke er bekreftet som positivt, skal testresultatene bekreftes enten

- a) ved sekvensering av et PCR-produkt eller et flettet («nested») PCR-produkt fra prøvene.

Det skal være et samsvar på minst 98 % mellom den oppnådde rene konsensussekvensen og disse referansesekvensene,

b) eller alternativt ved å sende prøvene til et nasjonalt referanselaboratorium for å få bekreftet resultatene.

II.2.1. Påvisning av KHV med qPCR

Følgende qPCR-protokoll skal benyttes:

Foroverprimer (KHV-86f): 5'- GACGCCGGAGACCTTGTG -3'.

Reversprimer (KHV-163r): 5'- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3'.

Probe (KHV-109p): 5'-FAM- CTTCTCTGCTCGGCGAGCACG -3'.

Sykluser: 1 syklus ved 95 °C i 15 minutter, deretter 50 sykluser ved 94 °C i 15 sekunder og 60 °C i 60 sekunder.

qPCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosyklus som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. Andre qPCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

II.2.2. Konvensjonell PCR for å bekrefte påvisning av KHV

For å bekrefte forekomst av infeksjon med KHV benyttes den generiske protokollen for flettet PCR beskrevet i tabell 2.1, etterfulgt av sekvensering av det amplifiserte produktet.

Tabell 2.1

Primere og vilkår for analyse med flettet («nested») PCR rettet mot alle cyprinidherpesvirus (CyHV-1, CyHV2 and CyHV-3)

Primernavn	Sekvens	Sykluser	Produktstørrelse
CyHVpol-forever	5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3'	Første PCR-runde 1 syklus: 95 °C i 2 minutter 40 sykluser:	

CyHVpol-revers	5'-CCGTARTGAGAGTTGGCGCA-3'	95 °C i 30 sekunder 55 °C i 30 sekunder 72 °C i 45 sekunder <i>1 syklus:</i> 72 °C i 10 minutter	362 bp
Primernavn	Sekvens	Sykluser	Produktstørrelse
CyHVpol-intern forover	5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3'	Andre PCR-runde <i>1 syklus:</i> 95 °C i 2 minutter <i>40 sykluser:</i>	339 bp
CyHVpol-intern revers	5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3'	95 °C i 30 sekunder 55 °C i 30 sekunder 72 °C i 45 sekunder <i>1 syklus:</i> 72 °C i 10 minutter	

PCR-resultatene kan variere ut fra forholdene analysen utføres under, dvs. det kan være behov for å optimalisere de termiske protokollene avhengig av hvilken termosykler som benyttes. Videre kan det forekomme falskt positive resultater på grunn av feil hybridisering av primere eller kontaminering på laboratoriet. I hver kjøring skal det inngå negative templatkontroller og positive kontroller. PCR-versjoner med dokumentert tilsvarende effektivitet kan også benyttes.

Sekvenseringen kan utføres av laboratoriet eller hos eksterne foretak spesialisert på sekvensering. Sekvenseringsresultatene skal analyseres ved å sammenligne sekvensene med kjente referansesekvenser for KHV (GenBanknummer AP008984, DQ657948 og DQ177346). Det skal være et samsvar på minst 98 % mellom den oppnådde rene konsensussekvensen og disse referansesekvensene.

DEL 4

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV INFEKSJON MED *MARTEILIA* *REFRINGENS*

I. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for diagnostisering av infeksjon med *Marteilia refringens*

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde en helsestatus med hensyn til infeksjon med *Marteilia refringens*, som omhandlet i del

4 avsnitt I i vedlegg 6, eller for å bekrefte eller utelukke forekomst av denne listeførte sykdommen ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 4 avsnitt II i vedlegg 6, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. I.1, I.2 og I.3 i denne del benyttes.

I.1. Framgangsmåte for prøvetaking

For å øke sjansene for å finne infiserte dyr, skal det prioriteres å ta prøver av individuelle bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr.

Etter prøvetaking oppbevares østers eller blåskjell ved 4 °C eller kjølt på is i høyst 24 timer dersom prøvene omfatter bløtdyr med åpne skall, og i høyst 72 timer dersom dette ikke er tilfellet, i en plastpose påført en etikett med opplysninger om østersenes eller blåskjellenes art og opprinnelse. Bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr skal oppbevares atskilt fra andre bløtdyr.

Et 3–5 mm tykt vevssnitt, herunder vev fra gjeller og hjerte, skal benyttes til histologisk diagnostisering av *Marteilia refringens*. En bit av fordøyelseskjertelen skal benyttes i enkelte tester, herunder avtrykk og polymerasekjedereaksjon (PCR).

I.2. Mikroskopiteknikker

I.2.1. Cytologi (avtrykkscytologi)

Etter at vev fra fordøyelseskjertelen er tørket på absorberende papir, lages det en rekke avtrykk på et objektglass. Objektglassene lufttørkes, fikseres i metanol eller i absolutt etanol og farges ved hjelp av et kommersielt tilgjengelig blodfargingssett, f.eks. Diff-Quik®/Hemacolor®, i samsvar med produsentens anvisninger. Etter skylling i springvann og tørking monteres objektglassene med dekkglass ved hjelp av en egnet syntetisk harpiks. Objektglassene observeres først ved $\times 200$ forstørrelse og deretter med immersjonsolje ved $\times 1\,000$ forstørrelse.

Et positivt resultat skal være observasjon av celler i størrelser på opptil 30–40 μm . Cytoplasmaet farges basofilt, mens cellekjernen farges eosinofilt. Det observeres lyse haloer rundt store, sterkt fargede (lysbrytende) granulater og celler intracellulært i større celler.

Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.2.2. Histologi

Vevssnitt som omfatter gjeller, fordøyelseskjertel, kappe og gonade, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin og farging, f.eks. med hematoksylin og eosin. Observasjonene foretas ved stigende forstørrelse opp til $\times 1\,000$.

Et positivt resultat skal være observasjon av celler med størrelser fra 4 til 40 µm. Tidlige stadier består av multinukleære celler som er sfæriske til avlange. Disse forekommer hovedsakelig i epitel fra spiserør og magesekk og noen ganger fra leppepalpene. Sporulering omfatter celledelinger inne i celler og finner sted i fordøyelseskjertelens tubuli og ducti. Lysbrytende granulater observeres under sporulering, men ikke i tidlige stadier. I sene faser av en infeksjon observeres det frie sporangier i mage-tarmkanalens lumen. Cytoplasmaet farges basofilt, mens cellekjernen farges eosinofilt. Granulatene kan ha mørk oransje til mørk rød farge.

Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.3. Molekylære teknikker

I.3.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter.

Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som vanligvis gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene, som beskrevet i nr. I.3.2.

I.3.2. Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Det er utarbeidet og publisert en rekke PCR-protokoller.

Det skal benyttes PCR-primere rettet mot regionen ITS1 (internt transkribert spacer), ettersom de er i stand til bare å amplifisere *M. refringens*.

PCR skal utføres i et volum på 50 µl. PCR-blandinger skal inneholde buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 ved 25 °C] og 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-blanding, 1 µM forover- og reversprimere, 0,02 enheter µl⁻¹ Taq DNA-polymerase og 10–100 ng ekstrahert DNA. Etter denaturering av DNA ved 94 °C i 5 minutter skal det kjøres 30 sykluser som følger: denaturering ved 94 °C i 1 minutt, hybridisering ved 55 °C i 1 minutt og elongering ved 72 °C i 1 minutt per kilobasepar. Det utføres en siste elongering i 10 minutter ved 72 °C. Til påvisning av *M. refringens* utføres det PCR med primere rettet mot regionen ITS1 (5'-CCG-CAC-ACG-TTCTTC-ACT-CC-3' og 5'-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3').

Positive kontroller skal bestå av genomisk DNA fra en svært infisert vert eller plasmid-DNA, herunder målregionen.

Negative kontroller skal bestå av genomisk DNA fra ikke-infiserte verter og PCR-reagenser uten mål-DNA.

Et positivt resultat er positiv PCR-amplifisering ved den forventede størrelsen (412 bp), idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

I.3.3. In situ-hybridisering (ISH)

Det er utarbeidet og publisert en rekke ISH-protokoller.

Proben rettet mot rRNA-genkompleksets SSU skal benyttes, ettersom den er blitt validert med tanke på histologi.

Vevssnitt som omfatter gjeller og fordøyelseskjertel, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin. Snitt på 5 µm skjæres og plasseres på aminoalkylsilanbelagte objektglass, som deretter varmes i ovn over natten ved 40 °C. Snittene avvokses i xylenbad i 10 minutter. Dette trinnet gjentas én gang, deretter fjernes løsemidlet i to etterfølgende bad med absolutt etanol, hvert med 10 minutters varighet. Deretter dehydreres snittene ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner. Snittene behandles med proteinase K (100 µg ml⁻¹) i TE-buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) ved 37 °C i 30 minutter. Objektglassene dehydreres ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner og lufttørkes. Snittene inkuberes med 100 µl hybridiseringsbuffer (4 × SSC [Standard Saline Citrate], 50 % formamid, 1 × Denhardts løsning, 250 µg ml⁻¹ gjær-tRNA, 10 % dekstransulfat) inneholdende 10 ng (1 µl av PCR-reaktantene tillaget som beskrevet i nr. I.3.2 ved bruk av primerne CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG og TTC-GGG-TGG-TCT-TGA-AAG-GC) av den digoksi-geninmerkede proben. Snittene dekkes med in situ-dekkglass av plast og plasseres på en varmeblokk ved 95 °C i 5 minutter. Deretter avkjøles objektglassene på is i 1 minutt før hybridisering over natten ved 42 °C i et fukt-kammer. Snittene vaskes to ganger i 5 minutter i 2 × SSC ved romtemperatur, og én gang i 10 minutter i 0,4 × SSC ved 42 °C. Påvisningstrinnene utføres i henhold til produsentens anvisninger. Deretter skylles objektglassene i sterilt destillert vann (dH₂O). Snittene motfarges med Bismarck Brown Yellow, skylles i dH₂O og dekkglass monteres ved hjelp av et vandig monteringsmedium.

Positive og negative kontroller skal være snitt fra henholdsvis kjente infiserte og kjente ikke-infiserte verter.

Et positive resultat vises ved lilla-svart merking av *M. refringens*-celler i kjente målvev, idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller positive.

I.3.4. Sekvensering

Sekvensering utføres som et av de siste trinnene for å bekrefte diagnosen. Målregioner er SSU rDNA og ITS1.

II. Detaljerte diagnostiske metoder og framgangsmåter for overvåking og bekreftelse av infeksjon med *Marteilia refringens*

Med hensyn til overvåkingsprogrammer og for å bekrefte forekomst av en infeksjon med *Marteilia refringens* eller for å utelukke mistanke om denne listeførte sykdommen, i samsvar med kravene fastsatt i del 4 avsnitt II i vedlegg 6, skal de diagnostiske metodene og tilhørende framgangsmåter som skal benyttes, være i samsvar med retningslinjene fastsatt i tabell 4.1 som følger:

Tabell 4.1

Retningslinjer for bruk av diagnostiske metoder for overvåkingsprogrammer og for å bekrefte eller utelukke infeksjon med *Marteilia refringens*

Metode	Målrettet overvåking	Sannsynlig diagnose	Bekreftende diagnose
Avtrykk av fordøyelseskjertel	X	X	X eller
Histopatologi	X		X eller
In situ-hybridisering			X og
PCR	X	X	X og
Sekvensering			X

DEL 5

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV INFEKSJON MED *BONAMIA OSTREAE*

I. Framgangsmåter for diagnostisering av infeksjon med *Bonamia ostreae*

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse for å oppnå eller opprettholde en viss helsestatus med hensyn til *Bonamia ostreae*, som omhandlet i del 5 avsnitt I i vedlegg 6, eller for å bekrefte eller utelukke forekomst av denne listeførte sykdommen ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 5 avsnitt II i vedlegg 6, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i følgende nr. I.1, I.2 og I.3 benyttes.

I.1. Prøvetakingsprosess

For å øke sjansene for å finne infiserte dyr, skal det prioriteres å ta prøver av individuelle bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr.

Etter prøvetaking oppbevares østersene ved 4 °C eller kjølt på is i høyst 24 timer dersom prøvene omfatter bløtdyr med åpne skall, og i 72 timer dersom dette ikke er tilfellet, i en plastpose påført en etikett med opplysninger om østersenes art og opprinnelse. Bløtdyr med åpne skall eller nylig døde bløtdyr skal oppbevares atskilt fra andre bløtdyr.

Et 3–5 mm tykt vevssnitt, herunder vev fra gjeller og hjerte, skal benyttes til histologisk diagnostisering av *Bonamia ostreae*. En bit av fordøyelseskjertelen skal benyttes i enkelte tester, herunder avtrykk og polymerasekjedereaksjon (PCR).

I.2. Mikroskopiteknikker

I.2.1. Cytologi (avtrykkscytologi)

Etter at vev fra gjeller eller hjerte er tørket på absorberende papir, lages det en rekke avtrykk på et objektglass. Objektglassene lufttørkes, fikseres i metanol eller i absolutt etanol og farges ved hjelp av et kommersielt tilgjengelig blodfargingssett, f.eks. Diff-Quik®/Hemacolor®, i samsvar med produsentens anvisninger. Etter skylling i springvann og tørking monteres objektglassene med dekkglass ved hjelp av en egnet syntetisk harpiks. Objektglassene observeres først ved $\times 200$ forstørrelse og deretter med immersjonsolje ved $\times 1\,000$ forstørrelse.

Et positivt resultat er forekomst av små sfæriske eller eggformede organismer (2–5 μm brede) i hemocytter. Parasitten kan imidlertid også forekomme ekstracellulært. Disse organismene har basofilt cytoplasma og eosinofil cellekjerne (fargene kan variere avhengig av hvilken farge som er benyttet), og ettersom de strykes ut på objektglasset, kan de virke bredere på avtrykk enn ved en histologisk undersøkelse. Multinukleære celler kan observeres. Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.2.2. Histologi

Vevssnitt som omfatter gjeller og fordøyelseskjertel, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin og farging, f.eks. med hematoksylin og eosin. Observasjonene foretas ved stigende forstørrelse opp til $\times 1\,000$.

Et positivt resultat skal være forekomst av parasitter som svært små celler med en bredde på 2–5 μm i hemocytterne, eller frie i bindevev eller sinus i gjelle-, tarm- og kappeepitel, noe som ofte er forbundet med en kraftig betennelsesreaksjon. For å

unngå enhver tvil skal parasitten observeres inne i hemocytten med henblikk på en positiv diagnose. Teknikken er ikke artsspesifikk for parasitter.

I.3. Molekylære teknikker

I.3.1. DNA-ekstraksjon

DNA skal ekstraheres i henhold til standardframgangsmåter.

Det kan benyttes kommersielt tilgjengelige DNA-ekstraksjonssett som vanligvis gir DNA av høy kvalitet, som er egnet for bruk sammen med PCR-protokollene som beskrevet nedenfor.

I.3.2. Polymerasekjedereaksjon (PCR)

Det er utarbeidet og publisert en rekke PCR-protokoller.

To PCR-protokoller rettet mot SSU rDNA kan benyttes:

- a) Den første er konvensjonell PCR som amplifiserer flere medlemmer av *Haplosporidia*, herunder *Bonamia* spp. Primerne, som betegnes Bo og Boas, er henholdsvis 5'-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3' og 5'-CTG-ATCGTC-TTC-GAT-CCC-CC-3' og amplifiserer et produkt på 300 bp. PCR-blandinger inneholder buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl [pH 9,0 ved 25 °C] og 1 % Triton® X-100), 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-blanding, 1 µM forover- og reversprimere, 0,02 enheter µl⁻¹ Taq DNA-polymerase og 0,2 ng µl⁻¹ av DNA-templatet i et samlet volum på 50 µl. Prøvene denatureres i en termosyklus i 5 minutter ved 94 °C etterfulgt av 30 sykluser (94 °C i 1 minutt, 55 °C i 1 minutt, 72 °C i 1 minutt), deretter foretas en siste elongering i 10 minutter ved 72 °C.

Positive kontroller skal bestå av genomisk DNA fra en svært infisert vert eller plasmid-DNA, herunder målregionen.

Negative kontroller skal bestå av genomisk DNA fra ikke-infiserte verter og PCR-reagenser uten mål-DNA.

Et positivt resultat er positiv PCR-amplifisering ved den forventede størrelsen (dvs. 300 bp), idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

- b) Den andre PCR-protokollen er en sanntids-PCR-analyse med SYBR® Green. Den muliggjør spesifikk påvisning av *B. ostreae* (som beskrevet nedenfor), og kan kombineres med en sanntids-PCR-analyse med SYBR® Green som muliggjør spesifikk påvisning av *B. exitiosa* (Ramilo et al. 2013).

Primerne BOSTRE-F (5'- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') og BOSTRE-R (5'- TCGCGGTTGAATTT-TATCGT-3') amplifiserer et produkt på 208 bp. PCR-blandinger inneholder SYBR® Green Master Mix (1X), 0,3 µM forover- og reversprimere og 200 ng ekstrahert DNA. Prøvene skal denatureres i et sanntidspåvisningssystem i 10 minutter ved 95 °C etterfulgt av 35 sykluser (95 °C i 30 sekunder, 55 °C i 45 sekunder og 72 °C i 1 minutt). Smeltekurven analyseres ved å øke temperaturen fra 55 °C til 95 °C i trinn på 0,5 °C/s og ved å registrere fluorescens ved hver temperaturendring.

Positive kontroller skal bestå av genomisk DNA fra en svært infisert vert eller plasmid-DNA, herunder målregionen.

Negative kontroller skal bestå av genomisk DNA fra ikke-infiserte verter og PCR-reagenser uten mål-DNA.

Et positivt resultat skal være positiv PCR-amplifisering med en unik maksimal smeltetemperatur ($78,25 \pm 0,25$ °C under forholdene publisert av Ramilo et al. 2013), idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

I.3.3. *In situ*-hybridisering (ISH)

Det er utarbeidet og publisert en rekke ISH-protokoller.

Det skal benyttes en probe rettet mot rDNA-genkompleksets SSU, selv om det er vist at den kan kryss reagere med enkelte andre medlemmer av familien *Haplosporidia*.

Vevssnitt som omfatter gjeller og fordøyelseskjertel, fikseres i minst 24 timer i Davidsons fikseringsmiddel etterfulgt av normal behandling med henblikk på histologi med parafin. Snitt på 5 µm skjæres og plasseres på aminoalkylsilanbelagte objektglass, som deretter varmes i ovn over natten ved 40 °C. Snittene avvokses i xylenbad i 10 minutter. Dette trinnet gjentas én gang, deretter fjernes løsemidlet i to etterfølgende bad med absolutt etanol, hvert med 10 minutters varighet. Deretter dehydreres snittene ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner. Snittene behandles med proteinase K (100 µg ml⁻¹) i TE-buffer (Tris [50 mM], EDTA [10 mM]) ved 37 °C i 30 minutter. Objektglassene dehydreres ved nedsenking i etanol i stigende konsentrasjoner og lufttørkes. Snittene inkuberes med 100 µl hybridiseringsbuffer (4 × SSC [Standard Saline Citrate], 50 % formamid, 1 × Denhardts løsning, 250 µg ml⁻¹ gjær-tRNA, 10 % dekstransulfat) inneholdende 20 ng (2 µl av PCR-reaksjonen tillaget som beskrevet i nr. I.3.2 ved bruk av primerne Bo og Boas) av den digoksigeninmerkede proben. Snittene dekkes med in situ-dekkglass av plast og plasseres på en varmeblokk ved 95 °C i 5 minutter. Deretter avkjøles objektglassene på is i 1 minutt før hybridisering over natten ved 42 °C i et fuktkammer. Snittene vaskes to ganger i 5 minutter i 2 × SSC ved romtemperatur, og én gang i 10 minutter i 0,4 × SSC ved 42 °C. Påvisningstrinnene skal utføres i henhold til produsentens anvisninger. Deretter skylles objektglassene i

sterilt destillert vann (dH₂O). Snittene motfarges med Bismarck Brown Yellow, skylles i dH₂O og dekkglass monteres ved hjelp av et vandig monteringsmedium.

Positive og negative kontroller skal være snitt fra henholdsvis kjente infiserte og kjente ikke-infiserte verter.

Et positivt resultat skal svare til de merkede parasittene inne i hemocytterne, idet alle negative kontroller skal være negative og alle positive kontroller skal være positive.

I.3.4. Sekvensering

Sekvensering utføres som et av de siste trinnene for å bekrefte diagnosen. Målregioner er SSU rDNA og ITS1.

II. Framgangsmåter for overvåking og bekreftelse av infeksjon med *Bonamia ostreae*

Med henblikk på overvåking og for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om infeksjon med *Bonamia ostreae* i samsvar med kravene fastsatt i del 5 avsnitt II i vedlegg 6 skal de diagnostiske metodene og tilhørende framgangsmåter som skal benyttes, være i samsvar med retningslinjene fastsatt i tabell 5.1 som følger:

Tabell 5.1

Retningslinjer for bruk av diagnostiske metoder for overvåkingsprogrammer og for å bekrefte eller utelukke infeksjon med *Bonamia ostreae*

Metode	Målrettet overvåking	Sannsynlig diagnose	Bekreftende diagnose
Avtrykk av hjerte eller gjeller	X	X	X eller
Histopatologi	X		X eller
In situ-hybridisering			X og
PCR	X	X	X og
Sekvensering			X

DEL 6

DETALJERTE DIAGNOSTISKE METODER OG FRAMGANGSMÅTER FOR OVERVÅKING OG BEKREFTELSE AV HVITFLEKKSYKDOM (WSD)

1. Diagnostiske framgangsmåter for påvisning av hvitflekkssyndromvirus (WSSV)

Når det utføres prøvetaking og laboratorieundersøkelse med henblikk på overvåkings- og bekjempelsesprogrammene omhandlet i del 6 avsnitt I i vedlegg 6, og for å bekrefte forekomst av eller utelukke mistanke om infeksjon med WSSV ved bruk av de diagnostiske metodene beskrevet i del 6 avsnitt II i vedlegg 6, skal de detaljerte diagnostiske metodene og framgangsmåtene beskrevet i nr. 2–7 i denne del benyttes.

Metodene og framgangsmåtene beskrevet i denne delen er tilpasset etter den ISO 17025-akkrediterte testen som benyttes på Den europeiske unions referanselaboratorium for krepsdyrsykdommer. Alternative metoder, der det benyttes tilsvarende sett produsert av andre produsenter og tilsvarende forhold, som gir tilsvarende følsomhet og spesifisitet som dem som er beskrevet i denne del, kan benyttes. Det PCR-amplifiserte produktet skal under alle omstendigheter sekvenseres for å bekrefte WSSV.

2. Prøvetakingsprosess

Vev (pleopoder og gjeller) som inneholder WSSV fra krepsdyr, kan oppbevares i etanol, RNAlater eller hurtiginnfryses ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Følgende trinn skal utføres for å identifisere WSSV fra vevsprøver: homogenisering av vevet, ekstraksjon av DNA, spesifikk amplifisering av DNA fra WSSV ved bruk av PCR, visualisering av det amplifiserte produktet på en gel, rensing av DNA og sekvensering for å bekrefte det sykdomsframkallende virusets identitet.

3. Vevshomogenisering

Oppkutting av vevet og tillaging av et homogenat i en egnet buffer skal utføres ved bruk av FastPrep homogenisator og Lysing Matrix A-rør (MP Biomedicals). Vevet veies, plasseres i Lysing Matrix A-rør, fortynnes 1:10 w/v eller i henhold til produsentens anvisninger i en egnet buffer (G2 og 10 μl proteinase K til bruk med DNA Tissue kit [Qiagen]) og homogeniseres med FastPrep-24 homogenisator i 2 minutter. Homogeniserte prøver inkuberes ved $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ i minst 4 timer eller over natten. Prøvene vortekseres, sentrifugeres ved 9 000 rpm i 2 minutter, og 50 μl supernatant eller et volum tilsvarende 5 mg vev (vevsvekten som er optimal for ekstraksjonssettet), tilsettes i et prøverør for DNA-ekstraksjon og fylles med G2-buffer opp til 200 μl .

4. DNA-ekstraksjon

Totalt DNA skal ekstraheres ved hjelp av et DNA-ekstraksjonssett for vev og EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen) i henhold til produsentens anvisninger. En ekstraksjonskontroll (DNA fra kalvebrissel) og en negativ kontroll (G2buffer) skal kjøres med hvert parti med prøver. DNA elueres i et volum på 50 μl . For å sikre en vellykket ekstraksjon bestemmes DNA-konsentrasjonen for alle prøver og kontroller

ved hjelp av en Nano Drop-maskin. Ekstrahert DNA fryses ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dersom det ikke skal benyttes med det samme.

5. Polymerasekjedereaksjon (PCR) for WSSV

Metoden som skal benyttes til å påvise WSSV, skal være protokollen for påvisning av WSSV ved hjelp av flettet PCR som beskrives i følgende ledd, og som amplifiserer 18s rRNA-genets 1 447 bp- og 848 bp-amplikon i henholdsvis første og andre PCR-runde.

Den første PCR-reaksjonsrunden utføres i et volum på 50 μl som inneholder sluttkonsentrasjoner på $1 \times$ GoTaq Buffer (Promega), 5 mM MgCl_2 , 1 pmol/ μl WSSV 146 F1-primer, 1 pmol/ μl WSSV 146 R1-primer (tabell 1), 0,25 mM dNTPs, 1,25U Taq-polymerase og 2,5 μl DNA. Hver prøve kjøres i duplikat sammen med en negativ ekstraksjonskontroll, en negativ PCR-kontroll (tilsatt 2,5 μl H_2O istedenfor DNA) og en positiv kontroll. Den positive kontrollen skal være fortynnet WSSV-plasmid som er framstilt og validert for intern bruk (fås fra EURL).

Den andre PCR-reaksjonsrunden skal utføres på samme måte som første runde, men ved bruk av primersettet WSSV 146 F2/R2 og med ytterligere en positiv kontroll for å kontrollere at dette trinnet i PCR har fungert.

Primer	Sekvens
WSSV 146 F1	ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG
WSSV 146 R1	TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA
WSSV 146 F2	GTAAGTGGCCCTTCCATCTCCA
WSSV 146 R2	TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT

Både første og andre PCR-runde skal utføres ved hjelp av følgende sykluser på en DNA Engine Tetrad 2 Peltier termosykluser (eller tilsvarende): En første denaturering ved $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 2 minutter etterfulgt av $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 30 sekunder gjentatt i 30 sykluser, et elongeringstrinn ved $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 2 minutter, deretter holdes reaksjonen ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. Gelelektroforese

Amplifiserte PCR-produkter fra både første og andre PCR-runde visualiseres på 2 % agarosegel med TAE-buffer. 15 μl av hver prøve kjøres ved 120 V i cirka 20 minutter og undersøkes under UV-lys. Positive prøver vil gi et bånd på 1 447 bp i første PCR-runde og 848 bp i andre PCR-runde. Prøver av denne størrelsen skjæres ut og plasseres

i et 1,5 ml mikrosentrifugerør. DNA i gelbitene renses med Promega Wizard® SV Gel og PCR Clean-Up System i henhold til produsentens anvisninger. DNA-konsentrasjonen anslås ved hjelp av en Nano Drop-maskin. Renset DNA fryses ved – 20 °C dersom det ikke skal benyttes med det samme.

7. Sekvensering av PCR-produkter

DNA sekvenseres med Big Dye Terminator Kit v3,1 (Applied Biosystems). Det samlede volumet i hver reaksjon er 20 µl, idet sluttkonsentrasjonene er 1 × Big Dye Terminator, 1 × sekvenseringsbuffer, 10 pmol/µl forover- eller reversprimer og 10 µl rensed DNA (fortynnet til cirka 10 ng/µl) som kjøres ved bruk av følgende sykluser på en DNA Engine Tetrad 2 Peltier termosyklar (eller tilsvarende): 94 °C i 30 sekunder etterfulgt av 96 °C i 10 sekunder, 50 °C i 10 sekunder og 60 °C i 4 minutter, idet de siste tre trinnene gjentas 30 ganger.

PCR-produktene utfelles ved hjelp av en natriumacetatmetode der 20 µl DNA tilsettes i 10 µl NaAc, 70 µl H₂O og 250 µl etanol, vortekseres og sentrifugeres ved 13 000 rpm i 20 minutter, supernatanten fjernes og pelleten vaskes med 200 µl absolutt etanol og sentrifugeres ved 13 000 rpm i 5 minutter. Pelleten tørkes i 5 minutter ved 37 °C. 25 µl Hi-Di-formamid tilsettes i pelletene, varmes opp til 95 °C i 2 minutter og vortekseres grundig. Prøvene skal sekvenseres ved hjelp av ABI3130xl Avant Genetic Analyser i henhold til produsentens anvisninger. Sekvenseringsresultatene skal analyseres med programvaren Sequencher, og sekvensene skal sammenlignes med sekvensene i NCBI's database ved hjelp av BLAST-funksjonen.