13.pielikums   
Ministru kabineta   
2017.gada .februāra

noteikumiem Nr.

**Laboratoriskās diagnostikas metodes**

**I.Laboratoriskās diagnostikas metodes virālās hemorāģiskās septicēmijas un**

**infekciozās hematopoētiskās nekrozesuzraudzībai**

Šajā nodaļā noteiktās laboratoriskās diagnostikas metodes izmanto, lai iegūtu vai saglabātu veselības stāvokli “infekcijas slimības neskarts” no virālās hemorāģiskās septicēmijas un infekciozās hematopoētiskās nekrozes.

1. Zivju paraugu sagatavošanas un nosūtīšanas kārtība.

1.1. Paraugus, paredzētus šūnu kultūru virusoloģiskai izmeklēšanai sagatavo šādā kārtībā:

Pirms nosūtīšanas vai pārvešanas uz laboratoriju izmeklējamās orgānu daļas no zivs ķermeņa izņem ar steriliem secēšanas instrumentiem un ievieto sterilās plastmasas mēģenēs ar transporta barotni.

Šūnu kultūru virusoloģiskai izmeklēšanai un *RT-qPCR* nepieciešamais zivju materiāla daudzums ir atkarīgs no zivju lieluma. Piemēram, zivju kāpuriem, kuru garums ir mazāks par 4 cm, paraugam ņem visu zivs kāpura ķermeni, 4 līdz 6 cm garām zivīm - ņem iekšas kopā ar nierēm, par 6 cm lielākām zivīm – ņem nieres, liesu, sirdi un/vai galvas smadzenes, bet vaislas zivīm nārsta laikā – ņem olšūnu šķidrumu.

Sterilā mēģenē, kurā ir ne mazāk kā 4 ml transporta barotnes, ievieto olšūnu vai spermas šķidrumu, zivs kāpuru vai zivs orgānu daļas, iegūtas ne vairāk kā no desmit zivīm, kas veido vienu kopotu paraugu. Katra individuālā parauga audu svars ir ne mazāk kā 0,5 grami.

Šūnu kultūras virusoloģisko izmeklēšanu sāk iespējami drīz pēc parauga nogādāšanas laboratorijā, bet ne vēlāk kā 48 stundas pēc paraugu noņemšanas. Izņēmuma gadījumos, ja pārbaudāmo materiālu aizsargā transporta barotne un ja pārvadāšanas laikā ievēro prasības attiecībā uz parauga transportēšanas temperatūru, kā tas noteikts šīs nodaļas 2. punktā, virusoloģisko izmeklēšanu var sākt vēlākais 72 stundas pēc parauga materiāla ievākšanas.

1.2. Paraugus, paredzētus apgrieztās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcijas analīzei (*RT-PCR* vai *RT-qPCR*) sagatavo šādā kārtībā:

Paraugus no zivīm ar sterilu instrumentu ņem saskaņā ar šīs nodaļas 1.1. apakšpunktā aprakstīto procedūru un ievieto sterilā plastmasas mēģenē ar transporta barotni. Vienā mēģenē var ievietot paraugus no 10 zivīm, un tie veido vienu kopotu paraugu. Ja inokulāta apjoms ir neliels, var izmantot audus ne vairāk kā no piecām zivīm. Paraugus, ievērojot ražotāja ieteikumus, atļauts kopot ribonukleīnskābi (turpmāk – RNS) stabilizējošos reaģentos (piemēram: uz 1 ml reaģenta izmanto 0,2 g audu). Ja ekstrahēšanai lietojamā materiāla ir maz, katru zivi apstrādā atsevišķi un neliek kopotos paraugos.

Uz laboratoriju atļauts sūtīt veselas zivis.

2. Zivju paraugus nosūta uz laboratoriju šādā kārtībā:

Paraugu transportēšanas laikā uz laboratoriju nodrošina paraugu atdzesēšanu. Mēģenes ar šūnu kultivēšanai vai *RT-PCR* / *RT-qPCR* analīzei paredzētiem zivju audiem transporta barotnē nosūta kopā ar pietiekamu daudzumu ledus vai alternatīvu dzesēšanas vidi un ievietotas izotermiskos konteineros (piemēram, polistirola kastēs ar biezām sienām). Transportēšanas laikā nav nepieļaujama paraugu sasalšana. Parauga temperatūra pārvadāšanas laikā nedrīkst pārsniegt 10 °C, un transportēšanas kastē, to saņemot laboratorijā, ir jābūt ledum vai arī vienam vai vairākiem daļēji vai pilnīgi sasalušiem aukstuma elementu saturošiem blokiem.

Ja pārvadāšanas laikā iespējams nodrošināt vidi, kas atbilst iepriekšējā rindkopā minētajām prasībām attiecībā uz temperatūru, uz laboratoriju var nosūtīt veselas zivis. Veselas zivis ietin absorbējošā papīrā, kuru ievieto plastikāta maisā. Sūtīt var arī dzīvas zivis.

3. Papildu diagnostisko materiālu ievāc šādā kārtībā: ja diagnostikas laboratorija atļauj, ievākt un papildu izmeklējumiem sagatavot var arī citus zivs audus.

4. Paraugu sagatavošana šūnu kultūras izmeklēšanai un *RT-qPCR.*

4.1. Atļauts veikt paraugu sasaldēšanu izņēmuma gadījumos. Ja paraugu apstrāde 48 stundu laikā pēc zivju audu ievākšanas nav iespējama, ir pieļaujams audu paraugus sasaldēt transporta barotnē – 20 °C vai zemākā temperatūrā un virusoloģisko izmeklēšanu veikt 14 dienu laikā. Pirms paraugu izmeklēšanas zivju audus atļauts sasaldēt un atkausēt tikai vienu reizi. Sasaldējot paraugus, norāda detalizētu informāciju par katru zivju audu paraugu sasaldēšanas iemeslu.

4.2. Orgānu homogenizēšana

Laboratorijā iesūtītos audus mēģenēs pilnīgi homogenizē (vai nu ar homogenizatoru *Stomacher*, blenderi, vai miezeri un piestu ar sterilām smiltīm) un pēc tam suspendē sākotnējā transporta barotnē.

Ja paraugu veido vesela zivs, kas īsāka par 4 cm, tai nodala ķermeņa daļu aiz zarnu atveres un pēc tam šādu zivs daļu sasmalcina ar sterilām grieznēm vai skalpeli. Ja paraugu veido vesela zivs, kuras garums ir no 4 līdz 6 cm, ievāc zivs iekšas, ieskaitot nieres. Ja paraugu veido vesela zivs, kas garāka par 6 cm, audu paraugus ņem, kā aprakstīts šīs nodaļas 1. punktā. Audu paraugus sasmalcina ar sterilām grieznēm vai skalpeli, homogenizē (vai nu ar homogenizatoru *Stomacher*, blenderi, vai miezeri un piestu ar sterilām smiltīm) un pēc tam suspendē sākotnējā transporta barotnē.

Galīgo attiecību starp audu materiālu un transporta barotni laboratorijā koriģē, panākot 1:10.

4.3. Homogenizētā materiāla centrifugēšana

Homogenizēto materiālu 15 minūtes centrifugē atdzesētā centrifūgā 2 °C līdz 5 °C temperatūrā ar 2000 līdz 4000 apgriezieniem/minūtē, un ievāc centrifugātu. Pēc centrifugāta iegūšanas, to četras stundas 15 °C temperatūrā, vai visu nakti 4 līdz 8 °C temperatūrā apstrādā ar antibiotikām. Transporta barotnē nosūtītu paraugu centrifugātu ar antibiotikām var neapstrādāt.

Ja šūnas nevar inokulēt 48 stundu laikā pēc zivju audu paraugu paņemšanas, centrifugātu atļauts sasaldēt – 80 °C temperatūrā un virusoloģisko izmeklēšanu veikt 14 dienu laikā.

Ja ievākto centrifugātu 48 stundas pēc parauga ņemšanas uzglabā – 80 °C temperatūrā, to var atkārtoti izmantot tikai vienu reizi virusoloģiskajai izmeklēšanai.

Pirms šūnu inokulēšanas centrifugātu vienādās daļās samaisa ar atbilstoši atšķaidītiem kopotiem antiserumiem pret infekciozās pankreātiskās nekrozes vīrusa vietējiem serotipiem un kopā ar šo maisījumu ne mazāk kā vienu stundu inkubē 15 °C temperatūrā vai ne vairāk kā 18 stundas 4 °C temperatūrā. Antiseruma titrs 50 % plaku samazināšanās testā ir vismaz 1:2000.

Visus inokulātus apstrādā ar infekciozās pankreātiskās nekrozesvīrusa antiserumu. Procedūra nepieciešama tāpēc, lai novērstu citopātisko efektu (turpmāk – CPE), ko inokulētās šūnu kultūrās rada infekciozās pankreātiskās nekrozesvīrusa attīstīšanās. Līdz ar to tas samazina virusoloģisko pārbaužu ilgumu, kā arī to gadījumu skaitu, kur būtu jāuzskata, ka radies CPEliecina par virālās hemorāģiskās septicēmijasvai infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusu.

Ja paraugi ir no ražošanas vienībām, kuras ir brīvas no infekciozās pankreātiskās nekrozes, inokulātus ar infekciozās pankreātiskās nekrozes vīrusa antiserumu var neapstrādāt.

4.4. Paraugu gatavošana uzraudzības programmām, kuru pamatā ir *RT-PCR* un *RT-pPCR*

Ja paraugi ievietoti transporta barotnē, veic šīs nodaļas 4.2. un 4.3. apakšpunktā aprakstītās procedūras. Pēc centrifugēšanas ievāc centrifugātu un ekstrahē RNS. Ja tieši pēc centrifugēšanas nav jāveic tālāka izmeklēšana, paraugus tūlīt sasaldē −20 °C vai zemākā temperatūrā.

Ribonukleīnskābes stabilizējošā reaģentā konservētu zivju audu analizēšanas vajadzībām tālāku darbu ar atšķirīgā temperatūrā glabātiem paraugiem veic saskaņā ar šādu grafiku:

37 °C glabāti paraugi: viena diena,

25 °C glabāti paraugi: viena nedēļa,

4 °C glabāti paraugi: viens mēnesis,

- 20 °C glabāti paraugi: beztermiņa.

Ar kopotiem paraugiem RNS stabilizējošā reaģentā rīkojas tāpat, kā ar atsevišķiem paraugiem RNS stabilizējošā reaģentā. RNS stabilizējošā reaģentā ievietoto kopotu paraugu apjoms nedrīkst pārsniegt apjomu, ko ekstrahēšanai ar RNS komplektiem (tādiem kā *RNeasy Mini kits* (*Qiagen*) vai līdzīgiem) ieteicis ražotājs. Ja kopotie paraugi ir lielāki, ekstrahēšanas komplektiem vai metodēm jābūt tādiem, kas atbilst šādi veidotiem kopotiem paraugiem.

RNS stabilizējošos reaģentos ievāktus paraugus neizmanto šūnu kultivēšanai.

4.5. Rīcība ar kopotiem paraugiem, kuri paredzēti izmeklēšanai ar *RT-qPCR* metodi

Šajā nodaļā sniegto *RT-qPCR* protokolu jutība ir līdzvērtīga šūnu kultivēšanas metožu jutībai vai ir par to augstāka. *PCR* vajadzībām var izmantot centrifugātu, kas iegūts no barotnē ar šūnu kultūru homogenizēta zivju audu materiāla, kurš ņemts ne vairāk kā no 10 zivju kopotiem orgāniem. Salīdzinājumā ar šūnu kultivēšanu *PCR* testā izmanto daudz mazāk inokulāta, tāpēc, pirms likt kopā materiālu ekstrahēšanai, visi zivju audi rūpīgi jāhomogenizē.

Tas pats princips jāievēro arī tad, ja paraugus ievāc RNS stabilizējošos reaģentos. Ja reprezentatīvu materiālu no 10 zivīm vienā mēģenē ievākt ir grūti, zivju skaitu kopotā paraugā samazina līdz 2-5 zivīm.

5. Šūnu kultūru virusoloģiskā izmeklēšana

5.1. Šūnu kultūras un barotnes

20 līdz 30 °C temperatūrā piemērotā barotnē, proti, Īgla barotnē *MEM* vai tās modificētā variantā, pievienojot 10 % liellopu embrionālā seruma un antibiotikas standartkoncentrācijās, audzē zilžaunu sauleszivs šūnu līnijas-2 (*BF*-2), varavīksnes foreles gonādu šūnu līnijas-2 (*RTG*-2) un vai nu *Epithelioma papulosum cyprini* (*EPC*), vai melngalvas mailītes (*FHM*) šūnas.

Ja šūnas kultivē slēgtos stobriņos, barotni buferē ar bikarbonātu. Barotni, ko izmanto šūnu kultivēšanai vaļējos traukos, var buferēt ar *tris*-(hidroksimetil)aminometāna-HCl (*Tris*-HCl) (23 mM) un nātrija bikarbonātu (6 mM). pH jābūt 7,6 ± 0,2.

Šūnu kultūrām, ko paredzēts inokulēt ar zivju audu materiālu, jābūt jaunām (parasti, ja vien iespējams, tās ir vienu dienu vecu šūnu kultūru monoslāņi). Izņēmuma gadījumā ir pieņemams vecuma diapazons 4 līdz 48 stundas. Šūnām inokulātā aktīvi jāaug.

5.2. Šūnu kultūru inokulēšana

Lai novērstu homoloģisku interferenci, ar antibiotikām apstrādāto orgānu suspensiju šūnu kultūrās inokulē divos atšķaidījumos: primārajā atšķaidījumā un turklāt tā atšķaidījumā 1:10. Līdz ar to audu materiāla galīgie atšķaidījumi barotnē ar šūnu kultūru būs attiecīgi 1:100 un 1:1000. Atbilstoši šīs nodaļas 5.1. apakšpunktā aprakstītajai procedūrai inokulē vismaz divas no tajā minētajām šūnu līnijām. Attiecībai starp inokulāta apjomu un šūnu kultūru saturošās barotnes tilpumu jābūt apmēram 1:10.

Katram atšķaidījumam un katrai šūnu līnijai izmanto vismaz 2 cm2 šūnu platības, kas atbilst vienai 24 iedobju šūnu kultūras plates iedobei. Ja vien iespējams, izmanto šūnu kultūras plates.

5.3. Šūnu kultūru inkubēšana

Inokulētās šūnu kultūras 7 līdz 10 dienas inkubē 15 °C temperatūrā. Ja novēro barotnes paskābināšanos (barotnei ar šūnu kultūru krāsa mainās no sarkanas uz dzeltenu), ar sterilu bikarbonāta šķīdumu vai ar līdzvērtīgām vielām koriģē barotnes pH, lai nodrošinātu, ka šūnas joprojām ir uzņēmīgas pret vīrusa infekciju.

Vismaz vienu reizi sešos mēnešos vai tad, ja ir aizdomas par šūnu uzņēmīguma samazināšanos, saldētās virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusa vai infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusakultūras titrē, lai pārliecinātos par šūnu kultūru uzņēmību pret infekciju. Ja iespējams, izmanto šī pielikuma III. nodaļā aprakstīto procedūru.

5.4. Mikroskopija

Inokulētajām šūnu kultūrām ne retāk kā trīs reizes nedēļā 40 līdz 150 reižu palielinājumā apskata, vai nav radies CPE. Ja novēro nepārprotamu CPE nekavējoties saskaņā ar šīs nodaļas 6. punktā noteikto kārtību sāk vīrusa identificēšanas procedūras.

5.5. Šūnu pārsēšana

Ja pēc 7 līdz 10 dienas ilgas primārās inkubēšanas CPEnav radies, kultūru pārsēj uz jaunām šūnu kultūrām, izmantojot tādu pašu šūnu platību kā primārajai kultūrai.

Kad pagājušas 7 līdz 10 dienas pēc inokulēšanas, pa šūnu līnijām kopo visu primāro kultūru veidojošo kultūru vai iedobju barotnes (centrifugāta) alikvotas. Šos kopotos paraugus, kā aprakstīts šīs nodaļas 5.2. apakšpunktā, neatšķaidītā veidā un atšķaidījumā 1:10 (iegūstot galīgos centrifugāta atšķaidījumus, attiecīgi 1:10 un 1:100) inokulē homoloģiskās šūnu kultūrās. Atļauts primārās kultūras barotnes desmitprocentīgas alikvotas inokulēt tieši iedobē ar jaunu šūnu kultūru (pārsēšana no iedobes iedobē). Pirms atšķaidījumus inokulēt, tos, kā aprakstīts šīs nodaļas 4.3. apakšpunktā, var iepriekš inkubēt ar infekciozās pankreātiskās nekrozesvīrusa antiserumu attiecīgā atšķaidījumā. Inokulētās kultūras 7 līdz 10 dienas inkubē 15 °C temperatūrā un apskata saskaņā ar šīs nodaļas 5.4. apakšpunktu.

Ja toksisks CPErodas pirmajās trijās inkubēšanas dienās, šūnas pārsēj šajā posmā, pēc tam 7 dienas inkubē, atkal pārsēj un turpmāk septiņas dienas inkubē. Ja toksisks CPErodas vēlāk nekā pēc trim dienām, šūnām var veikt vienu pasāžu un tās inkubēt tā, lai no pirmās inokulēšanas kopā būtu 14 dienas. Pēdējās septiņās inkubēšanas dienās nekādu toksicitātes pazīmju nedrīkst būt.

Ja, neskatoties uz to, ka ir veikta apstrāde ar antibiotikām, rodas bakteriāla kontaminācija, pirms pārsēšanas 15 līdz 30 minūtes 2 līdz 5 °C temperatūrā veic centrifugēšanu 2000 līdz 4000 x apgriezieni /minūtēvai centrifugāta filtrēšanu ar 0,45 μm filtru vai abas šīs darbības (membrāna ar zemu olbaltumvielu saistīšanas spēju). Turklāt pārsēšanā ievēro tās pašas procedūras, kas attiecībā uz toksisku CPEaprakstītas šā punkta ceturtajā daļā.

Ja CPEnerodas, testa rezultātu var paziņot par negatīvu.

6. Vīrusa identificēšana

Ja novērojumi liecina, ka šūnu kultūrā ir CPE, ievāc barotni (centrifugātu) un pārbauda ar vienu vai vairākiem šādiem paņēmieniem: imūnfermentatīvā analīze (*ELISA*), imūnfluorescence (*IF*), neitralizācija, *RT-PCR* vai *RT-qPCR*. Ja ar šiem testiem vienas nedēļas laikā vīrusu nav bijis iespējams galīgi identificēt, centrifugāt nekavējošai identifikācijai nosūta uz citu Eiropas Savienības references laboratoriju.

6.1. *ELISA*

Vīrusa izolāta identificēšanai izdara divslāņu *ELISA* ar divām antivielām. Mikrotitrēšanas platēs uzklāj pārklājumu, daudzumā 50 μl uz iedobi (0,9 pg) iepilinot no truša antiseruma pret virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusu vai infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusu iegūtu pierādītas kvalitātes attīrītu A proteīna imūnglobulīnu (*Ig*) karbonāta buferšķīdumā (pH 9,6) ar nātrija azīda saturu 15 mM, un no 18 stundām līdz 2 nedēļām inkubē 4 °C temperatūrā.

Šķīdumu platē katru paraugu, kas satur 1 % *Triton X*-100, un pozitīvos kontrolparaugus atšķaida ar buferšķīdumu (liellopu seruma albumīnu fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā *PBS-T*, *BSA* 1 %) četros atšķaidījumos: neatšķaidīts, 1:4, 1:16, 1:64. *ELISA* plates skalo fosfātu fizioloģiskajā buferšķīdumā, kas satur 0,05 % *Tween*-20 (*PBS-T*), un noskalotajā un ar pārklājumu klātajā *ELISA* platē ievada 50 µl no katras šķīdumu plates šķīdumu koncentrācijas.

Pēc tam *ELISA* plates 30 minūtes inkubē 37 °C temperatūrā. Tad plates skalo un 30 minūtes 37 °C temperatūrā inkubē ar specifiskām monoklonālajām antivielām (konkrētāk, virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusaidentificēšanai ar MAb IP5B11 un infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusaidentificēšanai attiecīgi ar Hyb 136-3). *ELISA* platē pievieno 50 µl truša pretpeles antivielas mārrutku peroksidāzes konjugāta atšķaidījumā ar *PBS-T-BSA* 1:1000.

Pēc atkārtotas skalošanas ierosina reakcijas, katrā iedobē pievienojot 50 μl ortofenilēndiamīna (*OPD*). *ELISA* plates tumsā istabas temperatūrā inkubē 20 minūtes, un reakciju apstādina, katrā iedobē pievienojot 100 μl 0,5 M H2SO4.

*ELISA* lasāmierīcē monitorē absorbenci viļņa garumiem 492 un 620 nm. Pēc testa rezultātu salīdzināšanas ar pozitīvo un negatīvo kontroļu absorbences vērtībām paraugus apzīmē kā pozitīvus vai negatīvus. Kopumā paraugus, kam neatšķaidītam materiālam kopējā absorbence (A) < 0,5, uzskata par negatīviem, paraugus ar A vērtībām no 0,5 līdz 1,0 uzskata par aizdomīgiem un paraugus, kam A > 1,0, uzskata par pozitīviem.

Šajā punktā minēto *ELISA* variantu vietā var izmantot citus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

6.2. Imūnfluorescence - *IF*

Virālās hemorāģiskās septicēmijas un infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusus identificē:

-inficējot šūnas 96 iedobju "Black" platēs;

-inficējot šūnas parastajās 24 iedobju platēs vai uz 24 iedobju plates segstikliem.

Ja virālās hemorāģiskās septicēmijas vai infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrususvai tos abus identificē, inficējot šūnas uz segstikliem, rīkojas pēc šāda protokola:

(a) segstikliem uzsēj šūnas tādā blīvumā, lai pēc 24 stundu kultivēšanas būtu 60 % līdz 90 % konfluence. Ja iespējams, šajā nolūkā ieteicamas *EPC* šūnas, jo tās stingri pielīp stikla virsmām, tomēr tikpat labi var izmantot citas šūnu līnijas - tādas kā *BF*-2, *RTG*-2 vai *FHM*. 150 μl šūnu kultūras centrifugāta divos dažādos atšķaidījumos (1:10 un 1:1000) dublikātā inokulē vienu dienu vecos monoslāņos un 24 stundas inkubē 15 °C temperatūrā;

(b) pēc tam barotni ar šūnu kultūru izņem un inficētos šūnu monoslāņus fiksē ar 0,5 ml ledusauksta acetona ūdens šķīduma (80 % tilpumkoncentrācija). Fiksāciju 15 minūtes istabas temperatūrā veic velkmes skapī, pēc tam no acetona šķīduma atbrīvojas un segstikliņus vismaz 30 minūtes žāvē ar gaisu. Šajā posmā plates vai nu nekavējoties apstrādā, vai - 20 °C temperatūrā glabā turpmākai lietošanai;

(c) specifiskas monoklonālas antivielas (konkrētāk, virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusaidentificēšanai MAb IP5B11, savukārt infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusa identificēšanai attiecīgi Hyb 136-3) atšķaida 0,01 M *PBST* ar pH 7,2 tādā atšķaidījumā, kā ieteic MAb piegādātājs; fiksētajam monoslānim pievieno 50 līdz 100 μl uz iedobi, un plates mitrā kamerā vienu stundu inkubē 37 °C temperatūrā;

(d) segstikliņus trīs reizes saudzīgi skalo ar 0,05 % *Tween*-20 saturošu fosfātu buferšķīdumu (*PBS-T*) un pēc pēdējās skalošanas no visa buferšķīduma atbrīvojas. Pēc tam šūnas vienu stundu inkubē 37 °C, par primāro antivielu lietojot peļu imūnglobulīna antivielu konjugātu fluorescīna izotiocianātā (*FITC*) vai tetrametilrodamīna-5-(un-6-) izotiocianātā (*TRITC*), saskaņā ar piegādātāja norādījumiem atšķaida, atkal skalo *PBS-T* un nožāvē. Iekrāsotās kultūras novieto uz priekšmetstikliņiem, izmantojot glicerīna sālsūdens šķīdumu, un pārbauda krītošā ultravioletā (UV) gaismā. Izmanto 10x un 12x okulārus un 25x vai 40x objektīva lupu ar skaitlisko apertūru attiecīgi < 0,7 un < 1,3.

Alternatīvi attiecībā uz šūnu kultūrām, fiksēšanu un standartkvalitātes antivielām var lietot citus *IF* paņēmienus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

6.3. Neitralizācija

No ievāktā centrifugāta, centrifugējot (2000 līdz 4000 x apgriezieniem/minūtē) vai filtrējot caur membrānas filtru (0,45 μm) ar zemu olbaltumvielu saistīšanas spēju, atdala šūnas, un centrifugātu barotnē ar šūnu kultūru atšķaida 1:100 un 1:10000.

Vismaz divu centrifugāta atšķaidījumu alikvotas atsevišķi sajauc ar vienādām turpmāk minēto reaģentu daļām un pēc tam 60 minūtes inkubē 15 °C temperatūrā:

a) serums, kas satur specifiskas grupas antivielas pret virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusuatšķaidījumā 1:50 (tilpumkoncentrācija);

b) serums, kas satur specifiskas grupas antivielas pret infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusuatšķaidījumā 1:50 (tilpumkoncentrācija);

c) kopots antiserums pret vietējiem infekciozās pankreātiskās nekrozes vīrusaserotipiem atšķaidījumā 1:50 (tilpumkoncentrācija);

d) tikai barotne (pozitīvais kontrolparaugs).

Katram vīrusa centrifugāta un seruma maisījumam inokulē vismaz divas šūnu kultūras, katru ar 50 μl, un pēc tam inkubē 15 °C temperatūrā. Ņemot vērā šīs nodaļas 5.4. apakšpunktā noteiktos raksturlielumus, pārliecinās, vai nerodas CPE.

Virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusucelmus un izolātus, kas nereaģē neitralizācijas testos, identificē ar *IF* vai ar *ELISA*.

Alternatīvi var izmantot citus neitralizācijas testus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

6.4. *RT-PCR/RT-qPCR*

6.4.1. Vīrusu RNS sagatavošana

Visas darbības ar RNS veic cimdos uz ledus.

Ribonukleīnskābes ekstrahē ar fenola–hloroforma metodi vai ar ribonukleīnskābes afinitātes rotācijas stobriņiem saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos RNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva RNS, kas piemērota izmantošanai turpmāk aprakstītajos *RT-PCR* protokolos.

Ribonukleīnskabes atkārtoti suspendē destilētā no ribonukleāzes brīvā ūdenī (proti, ar 0,1 % dietilpirokarbonātu apstrādātā ūdenī) vai piemērotā eluēšanas buferšķīdumā.

6.4.2. *RT-PCR*

Infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusakonstatēšanai izmanto šādus praimerus:

tiešais praimeris: 5’-AGA-GAT-CCC-TAC-ACC-AGA-GAC-3’;

atgriezeniskais praimeris: 5’-GGT-GGT-GTT-GTT-TCC-GTG-CAA-3’.

Izmanto šādus ciklus (viensoļa *RT-PCR*): 1 cikls: 50 °C 30 min; 1 cikls: 95 °C 2 min; 30 cikli: 95 °C 30 sekundes, 50 °C 30 sekundes, 72 °C 60 sekundes; 1 cikls: 72 °C 7 min un mērcēšana 4 °C temperatūrā.

Virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusakonstatēšanai izmanto šādus praimerus:

*VN* tiešais: 5’-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGT-GAA-GCG-3’;

*VN* atgriezeniskais: 5’-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3’.

Izmanto šādus ciklus (viensoļa *RT-PCR*): 50 °C 30 min, 95 °C 15 min, 35 cikli ar 94 °C 30 sekundes, 55 °C 30 sekundes, 68 °C 60 sekundes. Pēc tam 68 °C temperatūrā 7 minūtes ļauj notikt reakcijai.

*RT-PCR* reakciju daudzumu un specifiskumu izvērtē ar gela elektroforēzi 1,5 % agarozes gelā ar etīdija bromīdu un novēro ultravioletajā caurgaismošanā. Attiecībā uz infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusuvar novērot *PCR* amplikonu 693 bp. Attiecībā uz virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusu šis lielums ir 505 bp.

*PCR* rezultāti var variēt atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā dezoksiribonukleīnskābes (turpmāk – DNS) amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltus pozitīvi rezultāti. Tāpēc, lai novērstu jebkādas šaubas, ir jāiekļauj pietiekami pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi un sekvenēšanas amplikoni. Attiecībā uz virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusapraimeriem īpaši uzmanīgi jārīkojas ar *BF*-2 šūnām, jo praimeri var reaģēt ar šūnu līnijas DNS/RNS, dodot līdzīga izmēra viltuspozitīvu rezultātu. Testējot no *BF*-2 šūnām iegūtu centrifugātu, visi amplificētie *PCR* fragmenti jāsekvenē.

6.4.3. *RT-qPCR* virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusanoteikšanai

Virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusanoteikšanai amplificēšanu veic ar šādiem praimeriem un provi:

tiešais praimeris: 5’-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3’,

atgriezeniskais praimeris: 5’-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3’

un prove: 5’-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTG-ATC-TTC-TG-BHQ1.

*Viensoļa RT-PCR*

Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Ciklēšanas nosacījumi: 50 °C 30 min, 95 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 15 s, 60 °C 40 s, 72 °C 20 s; ja nepieciešams, koriģē. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

6.4.4. *RT-qPCR IHNV* noteikšanai

Infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusanoteikšanai amplificēšanu veic ar šādiem praimeriem un provi:

tiešais praimeris: 5’- AGA-GCC-AAG-GCA-CTG-TGC-G-3’,

atgriezeniskais praimeris: 5’- TTCTTTGCGGCTTGGTTGA – 3’

un prove: 5’ 6FAM-TGAGACTGAGCGGGACA-NFQ/MGB.

*Divsoļu RT-qPCR*

Turpmāk minētais tests ir atkarīgs no divsoļu amplifikācijas. Lai nenotiktu kontaminēšanās, ar abu reakciju mēģenēm rīkojas ļoti piesardzīgi.

Ciklēšanas nosacījumi (pēc *RT* soļa): 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 40 cikli ar 95 °C 15 sekundes un 60 °C 1 min. (ja nepieciešams, koriģē).

Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

**II. Laboratoriskās diagnostikas metodes slimības diagnozes apstiprināšanai vai aizdomu izslēgšanai par inficēšanos ar virālās hemorāģiskās septicēmijas vai infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusu**

1. Parastā vīrusa izolēšana ar tai sekojošu vīrusa identificēšanu

1.1. Izmeklēšanai ņem vismaz 10 zivis, kam vērojamas tipiskas virālās hemorāģiskās septicēmijas vai infekciozās hematopoētiskās nekrozes pazīmes.

1.2. Zivju paraugu sagatavošanā un nosūtīšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 2. punktā noteiktās metodes un procedūras.

1.3. Papildu diagnostiskā materiāla vākšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 3. punktā noteiktās metodes un procedūras.

1.4. Paraugu sagatavošanā šūnu kultūras izmeklēšanai, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 4. punktā noteiktās metodes un procedūras.

1.5. Šūnu kultūru virusoloģiskajā izmeklēšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 5. punktā noteiktās metodes un procedūras.

1.6. Vīrusa identificēšanā, ko veic parastās vīrusa izolēšanas vajadzībām, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 6. punktā noteiktās metodes un procedūras.

2. Vīrusa konstatēšana ar *RT-qPCR*

2.1. Paraugu ņemšanā, ko veic, lai konstatētu vīrusus ar *RT-qPCR*, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 1.2. punktā noteiktās metodes un procedūras.

2.2. Zivju paraugus vīrusu konstatēšanai ar *RT-qPCR* sagatavo un nosūta, ievērojot šī pielikuma I. nodaļas 2. punktā noteiktās metodes un procedūras.

2.3. Papildu diagnostiskā materiāla ievākšanā, ko veic, lai konstatētu vīrusus ar *RT-qPCR*, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 3. punktā noteiktās metodes un procedūras.

2.4. Paraugu sagatavošanā, ko veic, lai konstatētu vīrusus ar *RT-qPCR*, ievēro šī pielikuma I. nodaļas 6.4.1. apakšpunktā noteiktās metodes un procedūras.

2.5. Vīrusa konstatēšanā ar *RT-qPCR* ievēro šī pielikuma I. nodaļas 6.4.1., 6.4.3. un 6.4.4. apakšpunktā noteiktās metodes un procedūras.

3. Citi diagnostiskie paņēmieni

Saskaņā ar šī pielikuma I. nodaļas 4.3. apakšpunkta aprakstu pagatavoto centrifugātu var iesniegt *ELISA* testam, netiešās imūnfluorescences antivielu testam (*IFAT*) vai *RT-PCR* attiecīgi saskaņā ar šī pielikuma I. nodaļas 6.1., 6.2. vai 6.4. apakšpunktu. Audu materiālam var izmantot citus diagnostiskus paņēmienus, piemēram, sasaldētiem griezumiem – netiešo fluorescējošo antivielu testu (*IFAT*) vai formalīnā fiksētam audu materiālam –imūnhistoķīmisko analīzi. Šos ātros paņēmienus 48 stundu laikā no paraugu ņemšanas papildina ar šīs nodaļas 1. vai 2. punktam atbilstošu virusoloģisku izmeklēšanu, ja:

a) iegūts negatīvs rezultāts vai

b) ar materiālu, kas ņemts no pirmā infekciozās hametopoētiskās nekrozes vai virālās hemorāģiskās septicēmijasgadījuma audiem, iegūts pozitīvs rezultāts.

**III. Titrēšanas procedūras kārtība šūnu kultūru uzņēmības konstatēšanai pret inficēšanos**

Veicot šī pielikuma I. nodaļas 5.3. apakšpunktā minēto titrēšanu, kurā pārliecinās par šūnu kultūru uzņēmību pret inficēšanos, ievēro turpmāk aprakstītās procedūras.

Izmanto vismaz divus virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusaizolātus un vismaz vienu infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusaizolātu. Izolāti pārstāv nozīmīgāko vīrusu grupu Eiropas Savienībā, proti, attiecībā uz virālās hemorāģiskās septicēmijas vīrusuviens patogēnisks izolāts, kas saldūdenī iegūts no varavīksnes foreles, un viens patogēnisks izolāts, kas jūras ūdenī iegūts no akmeņplekstes, bet attiecībā uz infekciozās hematopoētiskās nekrozes vīrusu- viens patogēnisks celms, kas Eiropas Savienībā iegūts no varavīksnes foreles. Izmanto Eiropas Savienības dalībvalstīs iegūtus izteiktus izolātus. Virālās hemorāģiskās septicēmijasvīrusam šūnu kultūrkolbās ar maziem šūnu kultūras pasāžas skaitļiem pavairo *BF*-2 vai *RTG*-2 līnijas partijas, savukārt infekciozās hematopoētiskās nekrozesvīrusam - *EPC* vai *FHM* līnijas partijas. Izmanto tādu barotni ar šūnu kultūru, kas satur vismaz 10 % seruma. Inokulēšanai izmanto zemu inficētspējas multiplicitāti (*MOI*) (< 1).

Kad iestājies pilnīgs CPE, šūnu kultūras centrifugātu 15 minūtes centrifugējot ar 2000 x apgriezieniem/minūtē, ievāc vīrusu, sterilizē caur 0,45 μm membrānas filtru un sadala pa etiķetētām kriomēģenēm. Vīrusu glabā −80 °C temperatūrā.

Nedēļu pēc sasaldēšanas trīs replicētas mēģenes ar katru vīrusu zem auksta ūdens atkausē un titrē pa to attiecīgajām šūnu līnijām. Katru vīrusa izolātu atkausē un titrē vismaz reizi sešos mēnešos vai tad, ja ir aizdomas, ka ir samazinājies šūnu līnijas uzņēmīgums.

Titrēšanas procedūrām jābūt detalizēti aprakstītām un katrreiz jāievēro viena un tā pati procedūra.

Titrēšanā pēc beigu punkta atšķaidījuma katrā atšķaidījuma solī izmanto vismaz sešus replicētus paraugus. Titrus salīdzina ar iepriekš iegūtiem titriem. Ja jebkuram no trim vīrusu izolātiem salīdzinājumā ar sākotnējo titru tas samazinās par koeficientu 2 log vai vairāk, šūnu līniju uzraudzībā vairs neizmanto.

Ja laboratorijā tur dažādas šūnu līnijas, atsevišķi pārbauda katru līniju.

Laboratorijā pierakstus par diagnostiskajiem izmeklējumiem glabā ne mazāk kā 10 gadus.

**IV. Laboratoriskās diagnostikas metodes slimības diagnozes apstiprināšanai vai**

**aizdomu izslēgšanai par inficēšanos ar Koiju herpesvīrusa slimības vīrusu**

1. Zivju paraugu sagatavošana

Diagnostiskiem nolūkiem nosūtīt un testēšanai ar parastajām uz *PCR* vai *qPCR* bāzētām metodēm izmantot var dzīvas vai nonāvētas un atsevišķi hermētiskās aseptiskās tvertnēs iepakotas zivis vai, alternatīvi, sasaldētus orgānus vai orgānu gabalus, kas konservēti 80 līdz 100 % spirtā vai vīrusu transporta barotnē (apstrādāšanai 48 stundu laikā no ievākšanas brīža).

Koiju herpes vīrusakonstatēšanai ievāc žaunas un nieres. Nodalītā papildu paraugā var iekļaut liesu, galvas smadzenes un zarnas. Akūtos gadījumos audu materiālu var kopot no ne vairāk kā piecām zivīm.

Noteiktos gadījumos (piemēram, ja ir aizdomas par *KHV*) var izmantot neletālus paraugus, piemēram, asinis, uztriepes no žaunām, žaunu biopsiju, gļotādu noskrāpējumus. Tā var rīkoties ar ļoti vērtīgām zivīm.

1.1. Dezoksiribonukleīnskābes ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām.

Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai šīs nodaļas 2. punktā minētajos *PCR* protokolos.

2. Ierosinātāju konstatēšana un identificēšana ar metodēm, kuru pamatā ir polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*)

2.1. *qPCR KHV* konstatēšanai

Koiju herpes vīrusakonstatēšanai ar *qPCR* izmanto šādu *qPCR* testu:

tiešais praimeris (*KHV*-86f): 5’- GACGCCGGAGACCTTGTG -3’,

atgriezeniskais praimeris (*KHV*-163r): 5’- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3’

un prove (*KHV*-109p): 5’-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3’.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 95 °C 15 min, kam seko 40 cikli ar 94 °C 15 sekundes un 60 °C 60 sekundes. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

2.2. Parastā *PCR KHV* konstatēšanai

Izmanto šajā punktā aprakstīto testu, kurā mērķgēns ir koiju herpes vīrusatimīna kināzes (TK) gēns. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *PCR* testus, kuriem ir pierādīts aprakstītajam testam līdzvērtīgs jutīgums un specifiskums.

Tiešais praimeris (*KHV*-TKf): 5'-GGGTTACCTGTAC GAG-3';

atgriezeniskais praimeris (*KHV*-TKr): 5'-CACCCAGTAGATTA TGC-3'.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 95 °C 5 min, pēc tam 35 cikli ar 95 °C 30 sekundes, 52 °C 30 sekundes, 72 °C 1 min un viens cikls ar 72 °C 10 min. Iegūtā produkta izmēram vajadzētu būt 409 bp.

*PCR* rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltus pozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *PCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

Pirmo konstatāciju kādā teritorijā vai nu apstiprina ar sekvenēšanas metodi, vai vīrusa tūlītējai identificēšanai nosūta uz Latvijas valsts references laboratoriju vai citu Eiropas Savienības dalībvalstu references laboratoriju.

**V. Laboratoriskās diagnostikas metodes Koiju herpes vīrusaslimības uzraudzībai**

Šajā nodaļā noteikto paraugu ņemšanu un laboratorisko izmeklēšanu veic, lai audzētava iegūtu vai saglabātu veselības stāvokli “infekcijas slimības neskarts” attiecībā uz koiju herpes vīrusa slimību.

1. Zivju paraugu sagatavošana

Paraugus ņem šādā kārtībā:

- no zivīm, kas ilgāku laiku turētas tādu temperatūru diapazonā, kurās iespējama koiju herpes vīrusa attīstīšanās, proti, divas līdz trīs nedēļas 15 °C līdz 26 °C temperatūrā;

- ievāc 24 stundas, taču ne vēlāk kā 72 stundas pēc tam, kad piekopta tāda saimniekošanas prakse, piemēram, tīklošana vai pārvadāšana, kuras rezultātā tādu zivju organismā, kam ir nēsātāja statuss, vīruss varētu no jauna aktivizēties.

Koiju herpes vīrusa slimībasuzraudzības nolūkiem var nosūtīt un testēšanai ar metodēm, kuru pamatā ir *PCR*, izmantot dzīvas vai nonāvētas un atsevišķi hermētiskās aseptiskās tvertnēs iepakotas zivis vai, alternatīvi, sasaldētus orgānus vai orgānu gabalus, kas konservēti 80 līdz 100 % spirtā vai vīrusu transporta barotnē (apstrādāšanai 48 stundu laikā no ievākšanas). Koiju herpes vīrusa slimībasuzraudzībai ievāc žaunu un nieru audus.

Koiju herpes vīrusa slimības uzraudzības nolūkā iespējami izvairās no kopotiem paraugiem. Ja nepieciešami kopoti paraugi, kopot atļauts ne vairāk kā divu zivju audu materiālu. Lielākus paraugus homogenizē miezerī ar piestu vai ar homogenizatoru *Stomacher* un pirms dzidrināšanas paņem apakšparaugus DNS ekstrahēšanai. Var rīkoties arī tā, ka no katriem paraugā iekļautajiem audiem ievāc apakšparaugu, ko ievieto lizēšanas mēģenēs.

1.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām. Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai šīs nodaļas 2. punktā aprakstītajos *PCR* protokolos.

Pieņemama audu un barotnes attiecība ir masa/tilp. 1:9. Testus veic ar 20 līdz 25 mg audu materiāla.

2. Koiju herpes vīrusa slimībasuzraudzīšana ar metodēm, kuru pamatā ir *PCR*

Koiju herpes vīrusauzraudzībai izmanto *qPCR*. Ja teritorijā, kas agrāk nav apstiprināta par pozitīvu, parādās pozitīvi paraugi, testu rezultātus apstiprina vai nu ar*PCR* vai divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR* galaproduktu sekvencēšanas metodi.

Iegūtajai tīrajai konsensa sekvencei vismaz par 98 % jāatbilst etalonsekvencēm, vai ja tā tas nav, paraugus nosūta uz Latvijas valsts references laboratoriju apstiprināšanai.

2.1. *qPCR* koiju herpes vīrusakonstatēšanai

*qPCR* izmanto atbilstoši šādam aprakstam:

tiešais praimeris (*KHV*-86f): 5’- GACGCCGGAGACCTTGTG -3’,

atgriezeniskais praimeris (*KHV*-163r): 5’- CGGGTTCTTATTTTTGTCCTTGTT -3’

un prove (*KHV*-109p): 5’-FAM- CTTCCTCTGCTCGGCGAGCACG -3’.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 95 °C 15 min, kam seko 50 cikli ar 94 °C 15 sekundes un 60 °C 60 sekundes.

*qPCR* rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltus pozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

2.2. Parastā *PCR* koiju herpes vīrusaapstiprināšanai

Lai apstiprinātu koiju herpes vīrusa slimības klātbūtni, izmanto turpmāk norādītajā tabulā aprakstīto parasto divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR*, pēc kuras iegūto amplificēto materiālu sekvenē.

**Koiju herpes vīrusa slimības apstiprināšana**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **N.p.k.** | **Praimeri un nosacījumi divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR* testam, kurā mērķvīrusi ir visi karpu dzimtas herpesvīrusi (*CyHV*-1, *CyHV*-2 un *CyHV*-3) Praimera nosaukums** | **Sekvence** | **Ciklēšanas nosacījumi** | **Produkta izmērs** |
| 1. | *CyHVpol*-tiešais | 5'-CCAGCAACATGTGCGACGG-3' | *PCR pirmais raunds*  *1 ciklu:*  95 °C, 2 min  *40 ciklus:*  95 °C, 30 s  55 °C, 30 s  72 °C, 45 s  *1 ciklu:*  72 °C, 10 min | 362 bp |
| 2. | *CyHVpol*-iekšējais tiešais | 5'-CGACGGVGGYATCAGCCC-3' | *PCR otrais raunds*  *1 ciklu:*  95 °C, 2 min  *40 ciklus:*  95 °C, 30 s  55 °C, 30 s  72 °C, 45 s  *1 ciklu:*  72 °C, 10 min | 339 bp |
| 3. | *CyHVpol*-iekšējais atgriezeniskais | 5'-GAGTTGGCGCAYACYTTCATC-3' |  |  |

*PCR* rezultāti var variēt atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Turklāt nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskās kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltus pozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *PCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

Sekvenēšanu var veikt laboratorija vai sekvenēšanā specializējušās ārpakalpojumu firmas. Sekvenēšanas rezultātus analizē, sekvences salīdzinot ar zināmām koiju herpes vīrusa etalonsekvencēm (Gen Bank piekļuves numuri AP008984, DQ657948 un DQ177346). Iegūtajai tīrajai konsensa sekvencei vismaz par 98 % jāatbilst minētajām etalonsekvencēm.

**VI. Paraugu ņemšanas kārtība par lašu infekciozās anēmijas**

**apstiprināšanu vai aizdomu izslēgšanai par inficēšanos ar lašu infekciozās anēmijas vīrusu**

1. Zivju paraugu sagatavošana

Laboratoriskiem izmeklējumiem attiecībā uz lašu infekciozās anēmijasklātbūtni, ja ir iespējams, zivju paraugus nekopo. Tomēr ir pieņemami kopot 2 līdz 5 zivis lašu infekciozās anēmijasuzraudzības vajadzībām.

No visām zivīm, no kurām ņemti paraugi, ievāc paraugus apgrieztās transkriptāzes polimerāzes ķēdes reakcijas analīzei (*RT-PCR*). No zivs ar sterilu instrumentu izņem vidusnieres gabaliņu un to ievieto mikrocentrifūgas mēģenē, kur iepildīts RNS konservēšanas šķīdums (1 ml), kura lietderīgums ir pierādīts. Audus vienā mēģenē ar transporta šķīdumu var ievākt no ne vairāk kā piecām zivīm, un tie veido vienu kopotu paraugu. Viena parauga audu svaram jābūt 0,5 g. Ja zivis ir pārāk mazas, vajadzīgā parauga svara iegūšanai var nosauktajā secībā paņemt nieru, sirds, liesas, aknu vai vārtnieka aklās zarnas gabaliņus, lai iznākumā svars būtu 0,5 g.

Audus histoloģiskai izmeklēšanai ņem tikai no nesen nonāvētām zivīm ar normālu miesasbūvi, kurām novēro lašu infekciozai anēmijai atbilstošas klīniskās pazīmes vai pēcnāves izmeklēšanas rezultātus. Ņem visu ārējo vai iekšējo bojājumu paraugus un no atsevišķām zivīm visos gadījumos ar skalpeļa palīdzību ņem vidusnieres, sirds, aknu, aizkuņģa dziedzera, zarnu, žaunu un liesas paraugus, ko ievieto 8–10 % tilpumkoncentrācijas fizioloģiskajā formalīna buferšķīdumā. Lai audi pietiekami labi saglabātos, fiksatīva un audu attiecībai jābūt vismaz 20:1. Imūnķīmiskajai analīzei (*IHC*) ņem vidusnieres un sirds paraugus.

No visām paraugu ņemšanai paredzētām zivīm ņem audus virusoloģiskai izmeklēšanai šūnu kultūrā. Ar sterilu instrumentu no zivīm ņem aknu, galvasnieres vai vidusnieres, sirds un liesas gabaliņus, un tos ievieto plastmasas mēģenēs, kurās iepildīti 9 ml transporta barotnes. Audus no ne vairāk kā piecām zivīm var ievākt vienā mēģenē ar transporta šķīdumu, un tie veido vienu kopotu paraugu. Viena parauga audu svaram jābūt 1,0 ± 0,5 g.

2. Zivju paraugu nosūtīšana

Ja pārvadāšanas laikā iespējams ievērot šīs nodaļas 2. punkta trešajā atkāpē aprakstītās temperatūras prasības, uz laboratoriju var nosūtīt veselas zivis. Veselās zivis ietin absorbējošā papīrā un pārvadā plastikāta maisiņos, vēsumā, kā aprakstīts minētajā atkāpē.

Var sūtīt arī dzīvas zivis, taču tad transportēšana jāuzrauga zivju slimībās specializētajai Latvijas valsts references laboratorijai un jāņem vērā papildu dezinficēšanas un biodrošības problēmas, kas rodas dzīvu zivju transportēšanā.

Virusoloģiskai izmeklēšanai vai *RT-PCR* analīzei paredzētos asins paraugus un mēģenes ar zivju audiem ievieto izotermiskos konteineros (tādos kā polistirola kastes ar biezām sienām) kopā ar pietiekamu daudzumu ledus vai aukstumbloku, kas ceļā uz laboratoriju nodrošina paraugu dzesināšanu. Paraugus nedrīkst sasaldēt, bet pārvadāšanas kastē, to saņemot, joprojām jābūt ledum vai arī vienam vai vairākiem aukstumblokiem kas daļēji vai pilnīgi sasaluši. Ārkārtas apstākļos *RT-PCR* analīzei, kā arī virusoloģiskai izmeklēšanai paredzētos paraugus drīkst ātri sasaldēt un pārvest uz laboratoriju - 20 °C vai zemākā temperatūrā.

No *RT-PCR* analīzei paredzētiem audiem, ko glabā RNA*later*, RNS atkarībā no paraugu glabāšanas temperatūras ekstrahē šādā laikā:

37 °C glabāti paraugi: viena diena,

25 °C glabāti paraugi: viena nedēļa,

4 °C glabāti paraugi: viens mēnesis,

- 20 °C glabāti paraugi: bez termiņa.

Ja zivju audi fiksatīvā jātransportē histoloģiskai izmeklēšanai, tie jānosūta hermētiskās mēģenēs triecienizturīgās tvertnēs. Šos paraugus nesasaldē.

Šūnu kultūras virusoloģisko izmeklēšanu sāk ne vēlāk kā 48 stundas pēc paraugu ievākšanas. Izņēmuma gadījumos, ja izmeklējamo materiālu aizsargā transporta barotne un ja pārvadāšanas laikā iespējams ievērot prasības attiecībā uz temperatūru, virusoloģisko izmeklēšanu var sākt vēlākais 72 stundas pēc materiāla ievākšanas.

3. Papildu diagnostiskā materiāla ievākšana

Ar nosacījumu, ka diagnostiskā laboratorija to ļauj, bez 1. punktā minētajiem ievākt un papildu izmeklēšanai sagatavot var vēl citus zivju audus.

**VII. Laboratoriskās diagnostikas metodes slimības diagnozes apstiprināšanai vai aizdomu izslēgšanai par inficēšanos ar lašu infekciozās anēmijasvīrusu**

1. Paraugu izmeklēšana ar *RT-PCR*

Lašu infekciozās anēmijas vīrusaskrīningam izmantotā diagnostikas metode ir *RT-qPCR*. Tā kā atkarībā no veikšanas apstākļiem *RT-qPCR* rezultāti var atšķirties, jebkādu šaubu novēršanai jāiekļauj pietiekami pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi, un amplikoni.

1.1. Kopējās RNS ekstrahēšana

Visas darbības ar RNS veic cimdos uz ledus.

Kopējo RNS ekstrahē ar fenola-hloroforma metodi vai saskaņā ar ražotāja norādījumiem ar RNS afinitātes rotācijas stobriņiem.

Attīrītu RNS atkārtoti suspendē destilētā no ribonukleāzes brīvā ūdenī (proti, ar 0,1 % dietilpirokarbonātu apstrādātā ūdenī).

Ekstrahētās RNS koncentrāciju un tīrību novērtē, mērot optisko blīvumu pie 260 nm un pie 280 nm. Var arī izmantot iekšējus kontrolparaugus, kuros mērķsegments ir vīrusa genoms, kā minēts šīs nodaļas 1.3. apakšpunktā.

1.2. *RT-PCR* lašu infekciozās anēmijas vīrusakonstatēšanai

Lašu infekciozās anēmijas vīrusa genoma amplificēšanai var izmantot vairākas *RT-PCR* metodes. Var veikt divsoļu *RT-PCR*, kurā *RT* un *PCR* reakcijas soļus izpilda divās atsevišķās mēģenēs. Tomēr var veikt arī viensoļa reakciju, kurā abas reakcijas izpilda vienā mēģenē. Ja vien iespējams, izmanto viensoļa metodi, jo tad saturs nav jāpārvieto, tāpēc vienas mēģenes tests samazina krusteniskās kontaminācijas risku, turklāt to atzīst par tikpat jutīgu kā divsoļu metodi.

Izmanto šajā punktā aprakstītos praimerus un testu, proti, praimeru pāri ILA1 un ILA2, kuru mērķsegments ir 8. segments un kuri atzīti par piemērotiem lašu infekciozās anēmijas vīrusakonstatēšanai uzliesmojumu gadījumos un zivju vīrusa nēsātāju organismā. ILA2 atgriezeniskais praimeris neatbilst Ziemeļamerikas izolātiem, un tādos gadījumos izmanto alternatīvu praimeru komplektu.

Tiešais praimeris (ILA1): 5’-GGCTATCTACCATGAACGAATC-3’,

atgriezeniskais praimeris (ILA2): 5’-GCCAAGTGTAAGTAGCACTCC-3’.

Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 50 °C 30 min, viens cikls ar 94 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 30 sekundes, 55 °C 30 sekundes, 72 °C 60 sekundes; viens cikls ar 72 °C 5 min. Iegūtā produkta izmērs 155 bp.

*PCR* rezultāti var variēties atkarībā no tās izpildīšanas apstākļiem, proti, atkarībā no izmantotā DNS amplifikatora var būt nepieciešams optimizēt amplificēšanas protokolus. Nepareizas praimeru hibridizācijas vai laboratoriskas kontaminācijas dēļ var tikt iegūti viltus pozitīvi rezultāti. Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Tomēr aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

1.3. *RT-qPCR* lašu infekciozās anēmijas vīrusakonstatēšanai

Ar *RT-qPCR* iespējams panākt lielāku specifiskumu un, domājams, arī jutību. Ar šo metodi testu var izpildīt ātrāk, jo nav vajadzīgs gela elektroforēzes solis, turklāt tā mazina krusteniskās kontaminācijas risku, jo vīrusa genomiskās RNS daudzumu iespējams aplēst parauga mēģenē. *RT-qPCR* testam ir tāds trūkums, ka amplificētos produktus bieži vien nav iespējams sekvenēt. Tomēr, ja ir šaubas par amplificētā produkta specifiskumu, rezultāta apstiprināšanai jāizpilda vēl kāds lašu infekciozās anēmijas vīrusaspecifisks tests.

Izmanto šajā punktā aprakstīto testu, kura mērķsegments ir 8. segments. Šis tests aptver Eiropas Savienības, Eiropas Brīvās tirdzniecības asociācijas un Ziemeļamerikas izolātus. Ja vien iespējams, izmanto viensoļa metodi, jo vienas mēģenes tests samazina krusteniskās kontaminācijas risku.

Tiešais praimeris: 5’- CTACACAGCAGGATGCAGATGT -3’,

atgriezeniskais praimeris: 5’- CAGGATGCCGGAAGTCGAT -3’

un prove: 5’-FAM- CATCGTCGCTGCAGTTC – *MGBNFQ-*3’.

Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Ciklēšanas nosacījumi: viens cikls ar 50 °C 30 min, viens cikls ar 95 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 15 sekundes, 60 °C 60 sekundes; ja nepieciešams, koriģē. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

1.4. Amplificētu *PCR* produktu sekvenēšana

Tiešais praimeris (ILAs6-3F): 5’-ATGAGGGAGGTAGCATTGCA -3’;

atgriezeniskais praimeris (ILAs6-2R): 5’-CATGCTTTCCAACCTGCTAGGA -3’.

Katrā plašu atkārtojumā iekļauj negatīvus veidnes kontrolparaugus un pozitīvus kontrolparaugus. Ciklēšanas nosacījumi (viensoļa *RT-PCR*): viens cikls ar 50 °C 30 min, viens cikls ar 94 °C 15 min, 40 cikli ar 94 °C 30 sekundes, 55 °C 30 sekundes, 72 °C 60 sekundes, viens cikls ar 72 °C 5 min; ja nepieciešams, koriģē. Aprakstītā varianta vietā var izmantot citus *RT-PCR* vai *RT-qPCR* variantus ar pierādītu līdzvērtīgu rezultativitāti.

Alternatīvi *HPR* sekvenēšanai 6. segmentā var izmantot šādu metodi:

tiešais praimeris: 5’-GAC-CAG-ACA-AGC-TTA-GGT-AAC-ACA-GA-3’,

atgriezeniskais praimeris: 5’-GAT-GGT-GGA-ATT-CTA-CCT-CTA-GAC-TTG-TA-3’.

Produkta izmērs: 304 nt, ja *HPR*0.

Var izmantot arī *RT-PCR* testus ar tādu pašu jutīgumu un specifiskumu kā šajā punktā aprakstītajiem testiem.

Pirms sekvenēšanas amplificētā *RT-PCR* produkta tīrību pārbauda ar gela elektroforēzi. Ja iegūts tikai viens tīrs fragments, to attīra tieši pēc *PCR* reakcijas. Ja ir vairāki amplificēti fragmenti, ar gela elektroforēzi attīra interesējošo fragmentu. *PCR* fragmentus no šķīdumiem vai agarozes geliem attīra, *PCR* fragmentiem saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot afinitātes rotācijas stobriņus.

Sekvenēšanu ar amplifikācijas praimeru palīdzību izdara sekvenēšanā specializējušās ārpakalpojumu firmas. Sekvenēšanas rezultātus analizē ar meklēšanas rīku *BLAST*, un sekvences salīdzina ar citām zināmām sekvencēm ASV Nacionālā Biotehniskās informācijas centra (*NCBI*) nukleotīdu datubāzē.

Sekvenēšanai jānovērš jebkādas šaubas par amplificēta *RT-PCR* produkta specifiskumu.

2. Lašu infekciozās anēmijas vīrusaizolēšana uz šūnu kultūrām

2.1. Paraugu sagatavošana

Audus var glabāt - 80 °C temperatūrā. Pirms izmeklēšanas audus sasaldē un atkausē tikai vienu reizi. Uzraudzības un kontroles nolūkiem izmeklēšanu veic iespējami drīz.

Katru paraugu (kopotos audus pārvadāšanas šķīdumā) pilnīgi homogenizē, izmantojot validētu homogenizētāju, 0 līdz 6 °C temperatūrā 15 minūtes centrifugē (2000 līdz 4000 x apgriezieniem/minūtē), un centrifugātu pēc filtrācijas (0,45 μm) inkubē ar vienādu tilpumu pienācīgi atšķaidīta pret *IPNV* vietējiem serotipiem izstrādājušos antiserumu maisījuma. Antiseruma titram 50 % plātnīšu neitralizācijas testā jābūt vismaz 1:2000. Maisījumu vienu stundu inkubē 15 °C temperatūrā. Šādi iegūst inokulātu.

Visu inokulātu apstrādei ar infekciozās pankreātiskās nekrozesvīrusa antiserumu (vīruss atsevišķās Eiropas daļās sastopams 50 % zivju paraugos) ir mērķis novērst infekciozās pankreātiskās nekrozesvīrusa izraisītu CPEinokulētajās šūnu kultūrās. Šādu apstrādi var veikt, lai samazinātu virusoloģisko izmeklējumu ilgumu, kā arī to gadījumu skaitu, kuros būtu jāuzskata, ka CPEpotenciāli liecina par lašu infekciozās anēmijas vīrusu. Ja paraugi ir no ražošanas vienībām, kuras uzskata par brīvām no infekciozās pankreātiskās nekrozes, inokulātus ar infekciozās pankreātiskās nekrozesvīrusa antiserumu var neapstrādāt.

2.2. Šūnu kultūru inokulēšana

Primārajai lašu infekciozās anēmijas vīrusaizolēšanai izmanto Atlantijas laša nieru (*ASK*) šūnas. Ņemot vērā celmu mainīgumu un to, ka dažādu celmu vairošanās spēja dažādās šūnu līnijās atšķiras, var izmantot arī citas šūnu līnijas, par kurām pierādīts, ka tās ir pietiekami produktīvas un jutīgas lašu infekciozās anēmijas vīrusaizolēšanai. Ja vien izmanto zemu pasāžas līmeni, uzskatāms, ka līdz šim zināmo vīrusu izolātu izolēšana un augšana *ASK* šūnās noris labvēlīgi. *ASK* šūnām var novērot izteiktāku CPE nekā citām uzņēmīgām šūnu līnijām, piemēram, *SHK*-1 (laša galvasnieres šūnas-1).

*ASK* (65. vai agrāks pārsējums) šūnas audzē daudziedobju platēs barotnē *L*-15, kas satur 10 % liellopu embrionālā seruma, 200 mM L-glutamīna tilpumkoncentrācijā 2 % un 50 mM 2-merkaptoetanola tilpumkoncentrācijā 0,08 %. Ar antiserumu apstrādātu orgānu suspensiju inokulē jaunu, aktīvi augošu šūnu kultūrās, raugoties, lai galīgajā atšķaidījumā audu materiāla attiecība pret kultūras barotni būtu 1:1000. Par katru orgānu iedobē ar 2 ml kultivēšanas barotnes ievada 40 μl inokulāta suspensijas. Lai līdz minimumam samazinātu krusteniskās kontaminācijas risku, paraugiem no dažādām zivaudzētavas vietām izmanto atsevišķas plates ar 12 vai 24 iedobēm.

Vienu plati atstāj bez inokulāta un izmanto par negatīvo kontrolparaugu. Par pozitīvu kontrolparaugu izmantojamu lašu infekciozās anēmijas vīrusastandartizolātu atsevišķā platē inokulē šādi. Pirmajā iedobē inokulē simt μl *ISAV* izejpreparāta (minimālais titrs 107, audu kultūras inficējošā deva ar beigu punktu 50 % (*TCID*50 ml-1)) un samaisa. Noteiktu šā materiāla tilpumu no pirmās iedobes pārvieto otrajā tā, lai iegūtais atšķaidījums būtu attiecībā 1:10, un samaisa. Šo procedūru atkārto tā, lai desmitkārtīgu atšķaidījumu iegūtu sešās iedobēs. Lašu infekciozās anēmijas vīrusaizejpreparātu - 80 °C temperatūrā var glabāt vismaz divus gadus, bet pēc atkausēšanas tas jāizlieto trīs dienu laikā. Jāraugās, lai testa platēs nepieļautu krustenisko kontamināciju ar pozitīvās kontroles materiālu. Lai izvairītos no šāda riska, pozitīvos kontrolparaugus sagatavo un ar tiem darbojas atsevišķi no testa platēm. Tā vietā, lai inokulēšanā katrreiz izmantotu pozitīvu kontrolparaugu, var ik sešus mēnešus testēt *ASK* šūnu jutīgumu pret lašu infekciozās anēmijas vīrusaizolātiem.

Paraugus ne ilgāk kā 15 dienas inkubē 15 ± 2 °C temperatūrā. Šūnu kultūras mikroskopā attiecībā uz CPEpārbauda divas reizes - laikā no piektās dienas līdz septītajai un no 12. līdz 14. dienai pēc inokulēšanas. Ja kādam kopotam paraugam vērojams CPE, nekavējoties saskaņā ar šī nodaļas 2.4. apakšpunktu sāk vīrusa identificēšanas procedūras. Ja līdz 14. dienai CPEnetiek novērots, izdara netiešās imūnfluorescences antivielu testu (*IFAT*), hemadsorbcijas testu vai *RT-PCR*.

2.3. Šūnu pārsēšana

Šūnas pārsēj laikā starp 13. un 15. dienu. Attiecīgi atšķaidītu (1:10) kultūras centrifugātu ievada iedobēs, kurās ir svaigas, aktīvi augošas šūnas, un 14 ± 2 °C temperatūrā inkubē ne ilgāk kā 18 dienas. Šūnu kultūras mikroskopā attiecībā uz CPEpārbauda divas reizes - laikā no piektās dienas līdz septītajai un no 14. līdz 18. dienai pēc inokulēšanas. Ja kādam kopotam paraugam vērojams CPE, nekavējoties saskaņā ar šīs nodaļas 2.4. apakšpunktu sāk vīrusa identificēšanas procedūras. Ja līdz 14. līdz 18. dienai CPEnetiek novērots, veic hemadsorbcijas testu vai *RT-PCR* testu.

Ja citotoksicitāti novēro pirmajās septiņās inkubācijas dienās, šūnas pārsēj tajā posmā un 14 līdz 18 dienas inkubē, pēc tam tās atkal pārsēj un inkubē vēl 14 līdz 18 dienas. Ja citotoksicitāti novēro pēc septiņām dienām, šūnas pārsēj vienu reizi un no pirmās inokulēšanas inkubē pavisam 28 līdz 36 dienas.

Ja primārajā kultūrā vērojama bakteriāla kontaminācija, testu sagatavo vēlreiz, izmantojot - 80 °C temperatūrā glabāto audu homogenātu. Audu homogenātu pirms inokulēšanas 0 līdz 6 °C temperatūrā 15 līdz 30 minūtes centrifugē 4000 × apgriziemiem/minūtē, un centrifugātu filtrē (0,22 μm). Ja bakteriālu kontamināciju

novēro šūnu pārsēšanas laikā, centrifugātu filtrē (0,22 μm), inokulē tikko pārsētām šūnām un inkubē vēl 14 līdz 18 dienas.

2.4. Vīrusa identificēšanas testi

Ja kaut vienā stadijā novēro CPEvai ja hemadsorbcijas tests ir pozitīvs, veic vīrusa identificēšanu. Lašu infekciozās anēmijas vīrusaidentificēšanā vēlamā metode ir *RT-PCR*, ko veicsaskaņā ar šīs nodaļas 1. punktu un imūnfluorescences (*IF*) metode saskaņā ar šīs nodaļas 2.6. apakšpunktu. Ja tiek uzskatīts, ka iespējama citu vīrusu klātbūtne, vīrusa identificēšanai veic papildu testus. Ja ar šiem testiem vīruss nedēļas laikā nav galīgi identificēts, centrifugātu nekavējošai identifikācijai nosūta tālāk uz:

a) Pasaules Dzīvnieku veselības organizācijas (*OIE*) references laboratoriju darbā ar *ISA* vai

b) uz Latvijas valsts references laboratoriju vai citu Eiropas Savienības dalībvalstu references laboratoriju.

2.5. Hemadsorbcija

Tā kā lašu infekciozās anēmijas vīrusareplicēšanās šūnu kultūrās ne vienmēr rada CPE, tad katrā iedobē saskaņā ar šo punktu veic *RT-PCR* testu vai hemadsorbcijas testu vai saskaņā ar šīs nodaļas 2.6. apakšpunktu - *IF* testu.

No visām iedobēm, arī pozitīvo un negatīvo kontrolparaugu iedobēm, barotni ar šūnu kultūru izņem un ievieto etiķetētās sterilās mēģenēs. Katrā iedobē iepilda piecsimt μl skalotu truša vai zirga eritrocītu tilpumkoncentrācijā 0,2 % vai skalotas varavīksnes foreles vai Atlantijas laša eritrocītu suspensijas tilpumkoncentrācijā 0,05 % un istabas temperatūrā inkubē 45 minūtes. Pēc tam eritrocītu suspensiju izlej un katru iedobi divreiz izskalo ar barotni *L*-15. Katru iedobi pārbauda mikroskopā.

Ja uz *ASK* šūnu virsmas ir eritrocītu sakopojumi, ir iespējama inficēšanās ar ortomiksovīrusu. Ja hemadsorbcijas tests ir pozitīvs, nekavējoties saskaņā ar šīs nodaļas 2.4. apakšpunktu veic vīrusa identificēšanas testu.

2.6. Imūnfluorescence (*IF*)

*ASK* (65. vai agrāks pārsējums) daudziedobju platēs audzē barotnē *L*-15, kas satur 10 % liellopu embrionālā seruma, 200 mM L-glutamīna tilpumkoncentrācijā 2 % un 50 mM 2-merkaptoetanola tilpumkoncentrācijā 0,08 %, un izmanto tad, kad konfluence pārsniegusi 50 %. Var izmantot arī citas šūnu līnijas vai barotni, kuru lietderīgums ir pierādīts. Divās iedobēs katrā iepilda 225 μl ar vīrusu varbūtēji inficētas kultūras centrifugāta, samaisa un 225 μl iepilda vēl divās iedobēs, iegūstot atšķaidījumu 1:5. Vēl divās iedobēs inokulātu neievada, un tās izmanto par kontrolparaugiem. Paraugiem no katras zivju audzētavas, kā arī vīrusa kontrolei izmanto atsevišķu plati. Vīrusa kontrolparaugam izmanto lašu infekciozās anēmijas vīrusastandartizolātu.

Plates inkubē 14 ± 2 °C temperatūrā un tās mikroskopiski pārbauda ne vēlāk kā 7 dienu laikā. Ja jau agrīnā stadijā novēro CPE, kā arī tad, ja 7 dienu laikā CPEnenovēro, nākamais solis ir fiksācija. Iedobes skalo ar fosfātu buferšķīdumu (*PBS*) un istabas temperatūrā 20 minūtes ar inkubācijas paņēmienu fiksē ar 80 % acetonu.

Plates žāvē ar gaisa plūsmu un uzreiz nokrāso vai pirms krāsošanas ne ilgāk kā 24 stundas glabā 0 līdz 6 °C temperatūrā.

Replicētas iedobes krāso ar maisījumu no lašu infekciozās anēmijas vīrusamonoklonālajām antivielām (MAb) 3H6F8 un 1OC9F5 vai ar citu MAb, kuras iedarbīgums un specifiskums ir pierādīti, pēc tam fosfātu buferšķīdumā atšķaida un 30 minūtes inkubē 37 ± 4 °C temperatūrā. Tad plates atbrīvo no monoklonālās antivielas un trīs reizes skalo ar 0,05 % *Tween* 20 fosfātu buferšķīdumā. Katrā iedobē iepilda ar fosfātu buferšķīdumu atšķaidītu peļu antivielas *IgG* un fluorescīna izotiocianāta konjugātu (*FITC*) un 30 minūtes inkubē 37±4 °C temperatūrā. Monoklonālo antivielu un *FITC* konjugāta dažādo partiju atšķaidījumus katrā laboratorijā optimizē. Plates atbrīvo no antivielas un trīs reizes skalo 0,05 % *Tween* 20 fosfātu buferšķīdumā.

Tūlīt pēc tam iedobes pārbauda inversijas mikroskopā, kas pielāgots fluorescences mikroskopijai un aprīkots ar *FITC* ierosai piemērotu filtru. Ja novēro fluorescējošas šūnas, uzskata, ka tests ir pozitīvs. Pārbaude ir derīga tikai tad, ja pozitīvajiem kontrolparaugiem rezultāti ir pozitīvi, bet negatīvajiem — negatīvi.

3. Citu audu izmeklēšana

Šīs nodaļas 2.6. apakšpunktā minēto paņēmienu var izmantot arī citiem audiem, piemēram, aknām, liesai un sirdij, ja vien uz priekšmetstikliņu izdodas pārnest pietiekami daudz endotēlija šūnu, leikocītu vai limfocītu. Visiem audiem izmanto vienu un to pašu krāsošanas paņēmienu, lai gan dažus audus nebūtu vēlams krāsot ar propīdija jodīdu, bet gan šūnu tipu audu nospiedumā noteikt ar fāzu kontrastmikroskopu.

4. Histoloģija

No parafīnā ieguldītiem griezumiem ņem 5 μm biezus griezumus un krāso ar hematoksilīnu un eozīnu.

Klīniski slimu Atlantijas lašu organismā ir vērojamas mainīgas histoloģiskās pārmaiņas, taču to vidū var būt šādas:

(a) vairāki eritrocīti centrālajā venozajā sinusā un plātnīšu kapilāros žaunās, kur var veidoties arī eritrocītu trombi;

(b) blakus aknu lielajiem asinsvadiem vērojamas vairākperēkļu vai saplūdušas petehijas, hepatocītu nekroze vai abi procesi; perēkļveida eritrocītu sakopojumi paplašinātos aknu sinusoīdos;

(c) eritrocītu uzkrāšanās zarnu *lamina propria* asinsvados un varbūtēji asiņošana *lamina propria*;

(d) eritrocītu uzkrāšanās rezultātā palielinājusies liesas stroma;

(e) intersticiāla asiņošana – no vieglas vairākperēkļu līdz plašai difūzai – ar kanāliņu nekrozi asiņošanas vietās, eritrocītu uzkrāšanās nieru kamoliņos;

(f) eritrofagocitoze liesā un sekundāra asiņošana aknās un nierēs.

5. Imūnhistoķīmija (*IHC*)

Formalīnā fiksētu audu parafinētiem griezumiem izmanto poliklonālas antivielas pret *ISAV* nukleoproteīnu. Izmeklē vidusnieri un sirdi (pārejas vieta, kurā ietilpst trīs kambari un vārsti). Patoloģisku pazīmju radītu aizdomu gadījumus pārbauda, izmantojot pozitīvu *IHC*. Histoloģiskos griezumus sagatavo pēc standartmetodēm.

5.1. Audu griezumu sagatavošana

Audus saskaņā ar standartprotokoliem vismaz vienu dienu fiksē neitrālā 10 % formalīna fosfātu buferšķīdumā, atūdeņo ar pakāpeniski pieaugoša stipruma etilspirtu, dzidrina ar ksilēnu un iegulda parafīnā. Patomorfoloģijas un *IHC* vajadzībām apmēram 5 μm biezus griezumus (*IHC* vajadzībām - uz stikliņiem ar poli-L-lizīna apvalku) 20 minūtes karsē 56 °C līdz 58 °C (maksimāli 60 °C) temperatūrā, ar ksilēna palīdzību atvasko, ar pakāpeniski sarūkoša stipruma etilspirtu rehidratē, kā arī saskaņā ar 2. punktu krāso ar hematoksilīnu un eozīnu.

5.2. Krāsošanas procedūra *IHC* vajadzībām

Jebkādu inkubēšanu veic istabas temperatūrā uz svārstplatformas, ja vien šajā lēmumā nav paredzēts citādi:

(a) antigēnu atgūšanu nodrošina, griezumus 2 × 6 minūtes vārot 0,1 M citrāta buferšķīdumā ar pH 6,0, pēc kā 20 min veic bloķēšanu ar 5 % piena beztauku sausnas un 2 % kazas seruma 50 mM *TBS* šķīdumā (*TBS*; *Tris*/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6);

(b) pēc tam griezumus uz nakti inkubē ar primāru antivielu (monospecifisku truša antivielu pret lašu infekciozās anēmijas vīrusanukleoproteīnu), kura atšķaidīta 1 % piena beztauku sausnas saturošā *TBS*, pēc tam trīsreiz skalo ar 0,1 % *Tween* 20 saturošu *TBS*;

(c) saistītu antivielu konstatēšanai griezumus 60 minūtes inkubē truša *IgG* antivielas sārmainās fosfatāzes konjugātā. Pēc galīgās skalošanas pievieno *Fast Red* (1 mg ml-l) un naftola AS-MX fosfātu (0,2 mg ml-1) ar 1 mM levamizola 0,1 M *TBS* (pH 8,2) un dod iespēju 20 minūtes attīstīties. Pēc tam griezumus skalo krāna ūdenī, kontrastam krāso ar Harisa hematoksilīnu un pārklāj ar pārklājbarotni uz ūdens bāzes. Katrā testa sagatavošanā iekļauj kontrolparaugus - attiecībā uz lašu infekciozās anēmijas vīrusugan pozitīvus, gan negatīvus audu griezumus.

5.3. *IHC* rezultātu interpretēšana

*IHC* testa rezultātus interpretē tā, kā aprakstīts turpmāk šī punkta a) un b) apakšpunktā:

a) kontrolgriezumus par pozitīviem uzskata tad, ja kontrolgriezumiem skaidri saskatāms, ka endokarda asinsvadu endotēlija šūnu citoplazma un kodols ir iekrāsoti sarkani (sarkanīgi). Testa parauga griezumu uzskata par pozitīvu tikai tad, ja šādu skaidri saskatāmu sarkanu kodola iekrāsojumu konstatē endotēlija šūnām;

b) kontrolgriezumus par negatīviem uzskata tad, ja tiem nav novērojama nekāda būtiska krāsas reakcija.

Tā kā ortomiksovīrusa nukleoproteīnam vīrusa replikācijas stadijā ir raksturīga lokalizācija kodolā, taču bieži vien vienlaicīgi izteiktāk tiek iekrāsota citoplazma. Tāds citoplazmas iekrāsojums un cita veida iekrāsojums, kas nav lokalizēts kodolā, uzskatāms par nespecifisku vai neizšķirīgu.

Pozitīvā gadījumā izteiktākās iekrāsojuma reakcijas parasti vērojamas sirds un nieru endotēlija šūnās. Ļoti plašos hemorāģiskos bojājumos endotēlija krāsojuma reakcijas var būt maz izteiktas vai vispār nav novērojamas, iespējams, inficētajās endotēlija šūnās notiekošas līzes dēļ.

**IIX. Laboratoriskās diagnostikas metodes *Marteilia refringens* infekcijas apstiprināšanai**

1. Paraugu ņemšanas procedūra

Lai varbūtība atrast inficētus dzīvniekus būtu lielāka, paraugus ņemot, priekšroka ir gliemenēm, kas pavērušās vai tikko nobeigušās.

Paraugam ņemtās austeres vai ēdamgliemenes plastmasas maisiņā, kura etiķete satur informāciju par austeru vai ēdamgliemeņu izcelsmi un īpašībām, 4 °C temperatūrā vai uz atdzesēta ledus tur ne ilgāk kā 24 stundas, ja paraugā ir pavērušās gliemenes, un ne ilgāk kā 72 stundas, ja tajā pavērušos gliemeņu nav. Pavērušās vai tikko nobeigušās gliemenes tur atsevišķi no citām gliemenēm.

*Marteilia refringens* histoloģiskai diagnosticēšanai izmanto 3 līdz 5 mm biezu audu griezumu, kurā ietilpst žaunas un sirds audi. Dažiem testiem, arī nospiedumiem un polimerāzes ķēdes reakcijai (*PCR*) izmanto gremošanas dziedzera audus.

2. Mikroskopiskie paņēmieni

2.1. Citoloģija (nospieduma citoloģija)

Kad gremošanas dziedzera audi apžāvēti uz absorbējoša papīra, uz priekšmetstikliņa atstāj vairākus nospiedumus. Priekšmetstikliņu preparātus ar gaisa plūsmu nožāvē, fiksē metilspirtā vai absolūtajā spirtā un nokrāso, saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot kādu no tirdzniecībā pieejamiem asins preparātu krāsošanas reaģentu komplektiem, tādu kā *Diff-Quik*®/*Hemacolor*®. Kad stikliņi krāna ūdenī noskaloti un nosusināti, tiem ar piemērotas sintētiskas gumijas palīdzību uzliek segstiklu. Priekšmetstikliņus vispirms novēro palielinājumā x200 un pēc tam – iegremdētus eļļā palielinājumā x1000.

Rezultāts ir pozitīvs tad, ja novēro šūnas, kuru izmērs ir no 30 līdz 40 μm. Citoplazmu iekrāso bazofilie, savukārt kodolu – eozinofilie leikocīti. Var novērot blāvus lokus ap lielām, stipri iekrāsotām (atstarojošām) granulām un, lielākās šūnās, šūnu šūnā.

Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

2.2. Histoloģija

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas, gremošanas dziedzeris, mantija un gonādas, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā, pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai un krāso, piemēram, ar hematoksilīnu un eozīnu. Novērojumus veic arvien augstākā palielinājumā līdz ×1000.

Rezultāts ir pozitīvs tad, ja novēro šūnas, kuru izmērs ir no 4 līdz 40 μm. Agrīnās stadijās ir vērojamas vairākkodolu šūnas un šūnas, kuru forma ir no sfēriskas līdz pagarinātai. Tās konstatē galvenokārt barības vada un kuņģa, dažkārt lūpu taustekļu epitēlijā. Sporulācija saistās ar šūnu dalīšanos šūnu iekšpusē un notiek gremošanas dziedzera kanāliņos un vados. Sporulācijas procesā rodas atstarojošas granulas, taču agrīnos posmos tās nenovēro. Infekcijas vēlīnās stadijās atsevišķus sporangijus novēro gremošanas trakta lūmenā. Citoplazmu iekrāso bazofilie, savukārt kodolu – eozinofilie leikocīti. Granulu krāsa var variēt no tumši oranžas līdz tumšsarkanai*.*

Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

3. Molekulārie paņēmieni

3.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām.

Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai I.3.2. punktā aprakstītajos *PCR* protokolos.

3.2. Polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*)

Ir izstrādāti un publicēti vairāki *PCR* protokoli.

Jāizmanto tie *PCR* praimeri, kuru mērķrajons ir iekšējā transkribētā speisera (ITS1) rajons, jo tie spēj amplificēt tikai *M. refringens.*

*PCR* īsteno 50 μl tilpumā. *PCR* maisījumi satur buferšķīdumu (500 mM KCl, 100 mM *Tris*/HCl [pH 9,0 25 °C temperatūrā] un 1 % *Triton*® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP maisījuma, 1 μM tiešā un atgriezeniskā praimera, 0,02 vienības μl–1 *Taq* DNS polimerāzes, un 10 līdz 100 ng ekstrahētas DNS. Kad DNS piecas minūtes denaturēta 94 °C, veic šādus 30 ciklus: denaturācija ar 94 °C 1 min, hibridizācija ar 55 °C 1 min, un – vienu minūti uz katru kilobāzes pāri – elongācija ar 72 °C. Veic pēdējo elongācijas soli – 10 minūtes 72 °C temperatūrā. *M. refringens* konstatēšanai izdara *PCR* ar praimeriem, kuru mērķrajons ir ITS1 (5’-CCG-CAC-ACG-TTC-TTC-ACT-CC-3’ un 5’-CTC-GCG-AGT-TTC-GAC-AGA-CG-3’).

Pozitīvie kontrolparaugi ir no stipri inficēta saimniekorganisma iegūta genomiskā DNS vai plazmīdu DNS, kurām ir mērķrajons.

Negatīvo kontrolparaugu sastāvā ir iekļauti no neinficētiem saimniekorganismiem iegūts genomiskais DNS un *PCR* reaģenti bez mērķa DNS.

Pozitīvs rezultāts ir pozitīva *PCR* amplifikācija sagaidāmajā izmērā (412 bp), visu negatīvo kontrolparaugu rezultātiem esot negatīviem un visu pozitīvo kontrolparaugu rezultātiem – pozitīviem.

3.3. *In situ* hibridizācija (*ISH*)

Izstrādāti un publicēti ir vairāki *ISH* protokoli.

Izmanto provi, kuras mērķrajons ir rRNS gēnu kompleksa mazā apakšvienība, jo tā ir histoloģiski validēta.

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas un gremošanas dziedzeris, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā un pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai. Nogriež 5 μm biezus griezumus, ko novieto uz priekšmetstikliņiem ar aminoalkilsilāna pārklājumu un pēc tam uz nakti karsē 40 °C karstā krāsnī.

Griezumus atvasko, uz 10 minūtēm iegremdējot ksilēnā. Šo soli vienreiz atkārto un pēc tam atbrīvojas no šķīdinātāja, griezumus divreiz pēc kārtas uz 10 minūtēm iegremdējot absolūtā spirta peldēs. Pēc tam griezumus dehidratē, tos mērcējot augoša stipruma etilspirtā. Griezumus 37 °C temperatūrā 30 minūtes apstrādā ar proteināzi K (100 μg ml–1) TE buferšķīdumā (*Tris* [50 mM], *EDTA* [10 mM]). Stikliņus atūdeņo, tos mērcējot augoša stipruma etilspirtā, pēc tam ar gaisu nožāvē. Griezumus inkubē ar 100 μl hibridizācijas buferšķīduma (4× *SSC* [citrāta fizioloģiskā standartšķīduma], 50 % formamīda, 1× Denhardta šķīduma, 250 μg ml–1 rauga tRNS, 10 % dekstrāna sulfāta), kas satur 10 ng (1 μl *PCR* reaģentu, kuri sagatavoti, kā aprakstīts šīs nodaļas 3.2. apakšpunktā, izmantojot praimerus CCG-GTG-CCA-GGT-ATA-TCT-CG un TTC-GGG- TGG-TCT-TGA-AAG-GC) proves, kas marķēta ar digoksigenīnu. Griezumus pārsedz ar *in situ* plastmasas segstikliņiem un uz piecām minūtēm novieto uz karstumbloka 95 °C temperatūrā. Pirms stikliņus 42 °C temperatūrā uz nakti atstāj hibridizēties mitrā kamerā, tos uz ledus vienu minūti atdzesina. Griezumus divreiz pa piecām minūtēm istabas temperatūrā skalo 2× SSC un vienreiz 10 minūtes 42 °C temperatūrā skalo 0,4× SSC. Konstatēšanas soļus veic saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Pēc tam stikliņus skalo sterilā destilētā ūdenī (dH2O). Griezumu krāsu neitralizē ar *Bismarck Brown Yellow*, skalo ar dH2O un, izmantojot pārklājbarotni uz ūdens bāzes, uzliek segstikliņus.

Pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi attiecīgi ir griezumi no zināmiem inficētiem un neinficētiem saimniekorganismiem.

Visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un visiem pozitīvajiem kontrolparaugiem — pozitīviem, par pozitīvu rezultātu liecina violeti melni iekrāsotas *M. refringens* šūnas zināmos mērķaudos.

3.4. Sekvenēšana

Sekvenēšanu veic kā vienu no apstiprinošas diagnosticēšanas galīgajiem soļiem. Mērķrajoni ir rDNS mazā apakšvienība un ITS1.

**IX. Laboratoriskās diagnostikas metodes *Marteilia refringens* uzraudzībai**

Lai īstenotu uzraudzības programmas un apstiprinātu Marteiliozes (*Marteilia refringens*)klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par šo slimību, izmanto diagnostikas metodes un attiecīgas procedūras, kā ir norādīts turpmāk tabulas vadlīnijās.

**Vadlīnijas par diagnostikas metožu izmantošanu uzraudzības programmās un Marteiliozes (*Marteilia refringens*)apstiprināšanai vai izslēgšanai**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| N.p.k. | Metode | Mērķorientēta uzraudzība | Prezumptīvā diagnoze | Apstiprinošā diagnoze |
| 1. | Gremošanas dziedzera nospiedumi | X | X | X vai |
| 2. | Histopatoloģija | X |  | X vai |
| 3. | *In situ* hibridizācija |  | X un |  |
| 4. | *PCR* | X | X | X un |
| 5. | Sekvenēšana |  | X |  |

**X. Laboratoriskās diagnostikas metodes *Bonamia ostreae* infekcijas diagnosticēšanai.**

1. Paraugu ņemšanas process

Lai varbūtība atrast inficētus dzīvniekus būtu lielāka, paraugus ņemot, priekšroka ir gliemenēm, kas pavērušās vai tikko nobeigušās.

Paraugam ņemtās austeres plastmasas maisiņā, kura etiķete satur informāciju par austeru izcelsmi un īpašībām, 4 °C temperatūrā vai uz atdzesēta ledus tur ne ilgāk kā 24 stundas, ja paraugā ir pavērušās gliemenes, un ne ilgāk kā 72 stundas, ja tajā pavērušos gliemeņu nav. Pavērušās vai tikko nobeigušās gliemenes tur atsevišķi no citām gliemenēm.

Bonamiozes histoloģiskai diagnosticēšanai izmanto 3 līdz 5 mm biezu audu griezumu, to vidū no žaunām un sirds audiem. Dažiem testiem, arī nospiedumiem un polimerāzes ķēdes reakcijai (*PCR*), izmanto gremošanas dziedzera audus.

2. Mikroskopiskie paņēmieni

2.1. Citoloģija (nospieduma citoloģija)

Kad žaunas vai sirds audi apžāvēti uz absorbējoša papīra, uz priekšmetstikliņa atstāj vairākus nospiedumus. Priekšmetstikliņu preparātus ar gaisa plūsmu nožāvē, fiksē metilspirtā vai absolūtajā spirtā un nokrāso, saskaņā ar ražotāja norādījumiem izmantojot kādu no tirdzniecībā pieejamajiem asins preparātu krāsošanas reaģentu komplektiem, konkrētāk, tādu kā Diff-Quik®/Hemacolor®. Kad stikliņi krāna ūdenī noskaloti un nosusināti, tiem ar piemērotas sintētiskas gumijas palīdzību uzliek segstiklu. Priekšmetstikliņus vispirms novēro palielinājumā x200 un pēc tam – iegremdētus eļļā palielinājumā x1000.

Pozitīvs rezultāts būs mazu (2 līdz 5 μm platu) lodveida vai olveida organismu klātbūtne hemocītos. Tomēr parazīta klātbūtne iespējama arī ārpus šūnām. Šiem organismiem citoplazmā vērojami bazofilie leikocīti un kodolā – eozinofilie leikocīti (krāsa var atšķirties atkarībā no krāsošanas līdzekļa) un, tā kā uz priekšmetstikliņa tie izplūst, uz nospiedumiem tie var izskatīties platāki nekā histoloģiskā izmeklēšanā. Var būt novērojamas daudzkodolu šūnas. Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

2.2. Histoloģija

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas un gremošanas dziedzeris, vismaz 24 stundas fiksē Davidson fiksatīvā, pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai un krāso, piemēram, ar hematoksilīnu un eozīnu. Novērojumus veic arvien augstākā palielinājumā līdz ×1000.

Pozitīvs rezultāts ir parazītu klātbūtne, kas izpaužas kā ļoti mazas, 2 līdz 5 μm platas šūnas, kuras novērojamas hemocītos vai atsevišķi žaunu, zarnu un mantijas epitēlija saistaudos vai dobumos un bieži vien saistās ar spēcīgu iekaisuma reakciju. Lai izslēgtu jebkādas šaubas un uzstādītu pozitīvu diagnozi, vajadzīgs, lai parazīts būtu novērots hemocītā. Šis paņēmiens izmantojams jebkādām parazītu sugām.

3. Molekulārie paņēmieni

3.1. DNS ekstrahēšana

DNS ekstrahē saskaņā ar standartprocedūrām.

Drīkst izmantot tirdzniecībā pieejamos DNS ekstrahēšanas komplektus, ar kuriem iegūstama augsti kvalitatīva DNS, kas piemērota izmantošanai turpmāk aprakstītajos *PCR* protokolos.

3.2. Polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*)

Izstrādāti un publicēti ir vairāki *PCR* protokoli.

Var izmantot divus *PCR* protokolus, kuros mērķrajons ir rDNS mazā apakšvienība:

(a) pirmais ir parastā *PCR*, ar kuru amplificē vairākus *Haplosporidia* pārstāvjus, arī *Bonamia* spp. Praimeri, ko apzīmē kā *Bo* un *Boas*, ir attiecīgi 5’-CAT-TTA-ATT-GGT-CGG-GCC-GC-3’ un 5’-CTG-ATC-GTC-TTC-GAT-CCC-CC-3’, un to amplifikācijas produkts ir 300 bp. *PCR* maisījumi satur buferšķīdumu (500 mM KCl, 100 mM *Tris*/HCl [pH 9 25 °C temperatūrā] un 1 % *Triton*® X-100), 2,5 mM MgCl2, 0,2 mM dNTP maisījuma, 1 μM tiešā un atgriezeniskā praimera, 0,02 vienības μl–1 *Taq* DNS polimerāzes, un 0,2 ng μl–1 DNS veidnes kopējā apjomā 50 μl. Vispirms paraugus DNS amplifikatorā ar 94 °C 5 min denaturē, pēc tam ar tiem veic 30 ciklus (94 °C viena min, 55 °C viena min, 72 °C viena min), pēc tam 10 minūtes 72 °C temperatūrā veicot galīgo paplašināšanu.

Pozitīvie kontrolparaugi ir no stipri inficēta saimniekorganisma iegūta genomiskā DNS vai plazmīdu DNS, kurām ir mērķrajons.

Negatīvo kontrolparaugu sastāvā ietilpst no neinficētiem saimniekorganismiem iegūts genomiskais DNS un *PCR* reaģenti bez mērķa DNS.

Pozitīvs rezultāts ir pozitīva *PCR* amplifikācija sagaidāmajā izmērā (proti, 300 bp), visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un visiem pozitīvajiem kontrolparaugiem – pozitīviem;

(b) otrais *PCR* protokols ir *SYBR*® *Green* reāllaika *PCR*. Ar tā palīdzību ir iespējams specifiski noteikt *B. ostreae* (aprakstīts zemāk) un to var kombinēt ar *SYBR*® *Green* reāllaika *PCR*, kas dod iespēju specifiski noteikt *B. exitiosa* (*Ramilo et al.* 2013).

Praimeri *BOSTRE-F* (5’- TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3’) un *BOSTRE-R* (5’- TCGCGGTTGAATTTTATCGT-3’) amplificē 208 bp produktu. *PCR* maisījumi satur *SYBR*® *Green Master Mix* (1X), 0,3 μM tiešā un atgriezeniskā praimera un 200 ng ekstrahētas DNS. Paraugus vispirms ar 95 °C 10 minūtes denaturē reāllaika detektēšanas sistēmā, pēc tam ar tiem izpilda 35 ciklus (ar 95 °C 30 sekundes, ar 55 °C 45 ssekundes un ar 72 °C viena min). Ar temperatūras paaugstināšanās soli 0,5 ºC/s analizē kušanas temperatūras līkni, to sākot 55 ºC temperatūrā un beidzot 95 ºC temperatūrā un pie katras temperatūras maiņas fiksējot fluorescenci.

Pozitīvie kontrolparaugi ir no stipri inficēta saimniekorganisma iegūta genomiskā DNS vai plazmīdu DNS, kurām ir mērķrajons.

Negatīvo kontrolparaugu sastāvā ietilpst no neinficētiem saimniekorganismiem iegūts genomiskais DNS un *PCR* reaģenti bez mērķa DNS.

Visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un visiem pozitīvajiem kontrolparaugiem esot pozitīviem, pozitīvs rezultāts ir pozitīva *PCR* amplifikācija ar unikālu kušanas temperatūras maksimumu (ar nosacījumiem, kādus 2013. gadā publicējis *Ramilo et al.* – 78,25 ± 0,25 °C).

3.3. *In situ* hibridizācija (*ISH*)

Ir izstrādāti un publicēti vairāki *ISH* protokoli.

Izmanto provi, kuras mērķrajons ir rRNS gēnu kompleksa mazā apakšvienība. Ir pierādījumi, ka tā krusteniski reaģē ar dažiem citiem pie *Haplosporidia* dzimtas piederīgiem organismiem.

Audu griezumus, kuros ietilpst žaunas un gremošanas dziedzeris, vismaz 24 stundas fiksē *Davidson* fiksatīvā un pēc tam parastajā veidā apstrādā ar parafīnu histoloģiskai izmeklēšanai. Nogriež 5 μm biezus griezumus, ko novieto uz priekšmetstikliņiem ar aminoalkilsilāna pārklājumu un pēc tam uz nakti karsē 40 °C karstā krāsnī. Griezumus atvasko, uz 10 minūtēm iegremdējot ksilēnā. Šo soli vienreiz atkārto un pēc tam atbrīvojas no šķīdinātāja, griezumus divreiz pēc kārtas uz 10 minūtēm iegremdējot absolūtā spirta peldēs. Pēc tam griezumus rehidratē, tos mērcējot dilstoša stipruma etilspirtā. Griezumus pie 37 °C 30 minūtes apstrādā ar proteināzi K (100 μg ml–1) TE buferšķīdumā (*Tris* [50 mM], *EDTA* [10 mM]). Stikliņus atūdeņo, tos mērcējot augoša stipruma etilspirtā, pēc tam ar gaisu nožāvē. Griezumus inkubē ar 100 μl hibridizācijas buferšķīduma (4× *SSC* [citrāta fizioloģiskā standartšķīduma], 50 % formamīda, 1× Denhardta šķīduma, 250 μg ml–1 rauga tRNS, 10 % dekstrāna sulfāta), kas satur 20 ng (2 μl *PCR* reakcijas, kas sagatavota, kā aprakstīts šīs nodaļas 3.2. apakšpunktā, izmantojot praimerus *Bo* un *Boas*) proves, kas marķēta ar digoksigenīnu. Griezumus pārsedz ar *in situ* tipa plastmasas segstikliņiem, un uz piecām minūtēm novieto uz karstumbloka 95 °C temperatūrā. Pirms stikliņus 42 °C temperatūrā uz nakti atstāj hibridizēties mitrā kamerā, tos uz ledus vienu minūti atdzesina. Griezumus divreiz pa piecām minūtēm istabas temperatūrā skalo 2× SSC un vienreiz 10 minūtes 42 °C temperatūrā skalo 0,4× SSC. Konstatēšanas soļus izpilda saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Pēc tam stikliņus skalo sterilā destilētā ūdenī (dH2O). Griezumu krāsu neitralizē ar *Bismarck Brown Yellow*, skalo ar dH2O un, izmantojot pārklājbarotni uz ūdens bāzes, uzliek segstikliņus.

Pozitīvie un negatīvie kontrolparaugi attiecīgi ir griezumi no zināmiem inficētiem un neinficētiem saimniekorganismiem.

Visiem negatīvajiem kontrolparaugiem esot negatīviem un pozitīvajiem esot pozitīviem, pozitīvs rezultāts ir hemocītos novērojami iekrāsoti parazīti.

3.4. Sekvenēšana

Sekvenēšanu veic kā vienu no apstiprinošas diagnosticēšanas galīgajiem soļiem. Mērķrajoni ir rDNS mazā apakšvienība un ITS1.

**XI. Laboratoriskās diagnostikas metodes *Bonamia ostreae* infekcijasuzraudzībai**

**un slimības diagnozes apstiprināšanai**

Lai īstenotu uzraudzības programmas un apstiprinātu *Bonamia ostreae* klātbūtni vai izslēgtu aizdomas par inficēšanos ar to, izmanto diagnostikas metodes un attiecīgas procedūras, kas noteiktas turpmāk tabulas vadlīnijās.

**Vadlīnijas par diagnostikas metožu izmantošanu uzraudzības programmās un *Bonamia ostreae* infekcijas apstiprināšanai vai aizdomu izslēgšanai par inficēšanos ar *Bonamia ostreae***

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| N.p.k. | Metode | Mērķorientēta uzraudzība | Prezumptīvā diagnoze | Apstiprinošā diagnoze |
| 1. | Sirds vai žaunu audu nospiedumi | X | X | X vai |
| 2. | Histopatoloģija | X |  | X vai |
| 3. | *In situ* hibridizācija |  | X un |  |
| 4. | *PCR* | X | X | X un |
| 5. | Sekvenēšana |  | X |  |

**XII. Laboratoriskās diagnostikas metodes vēžu baltplankumu slimības apstiprināšanai**

1.Šajā nodaļā aprakstītās metodes un procedūras ir pielāgotas no akreditētā ISO 17025 testa, ko izmanto vēžveidīgo slimībās specializētā Eiropas Savienības references laboratorija. Var izmantot alternatīvas pieejas, kurās izmanto līdzvērtīgus nosacījumus, vai komplektus, kurus ražojuši citi ražotāji, bet kuri piedāvā šajā daļā aprakstītajiem testiem līdzvērtīgu jutīgumu un specifiskumu. Visos gadījumos polimerāzes ķēdes reakcijā amplificēto produktu sekvenē, lai apliecinātu, ka tas identisks vēžu baltplankumu sindroma vīrusam.

2. Paraugu ņemšanas procedūra

No vēžveidīgajiem iegūtus vīrusu saturošus audus (vēderkājas un žaunas) var glabāt etilspirtā, RNAlater vai strauji −80 oC temperatūrā sasaldēt. Stadijas, kas nepieciešamas vēžu baltplankumu slimības vīrusa identificēšanai no audu paraugiem, ir šādas: audu homogenizēšana, DNS ekstrahēšana, vēžu baltplankumu slimības vīrusa DNS īpatnējā amplificēšana ar PCR, amplificētā produkta vizualizācija uz gela, DNS attīrīšana un sekvenēšana.

3. Audu homogenizēšana

Audu saārdīšanai un homogenāta sagatavošanai piemērotā buferšķīdumā izmanto audu saārdītāju FastPrep un Lysing Matrix A mēģenes (MP Biomedicals). Audus nosver, ievieto Lysing Matrix A mēģenēs, piemērotā buferšķīdumā (lietošanai ar DNS audu komplektu (Qiagen) – G2 un 10 μl K proteināzes) atšķaida, līdz masa/tilp. ir 1/10 vai kā norādījis ražotājs, un divas minūtes homogenizē ar homogenizētāju FastPrep 24. Homogenizētus paraugus inkubē 56 oC vismaz četras stundas vai pa nakti. Paraugus apstrādā virpuļmikserī, divas minūtes centrifugē ar 9000 rpm un 50 μl centrifugāta vai apjoma, kas līdzvērtīgs 5 mg audu (ekstrahēšanas komplektam optimāls audu svars), pievieno DNS ekstrahēšanai paredzētā parauga mēģenē un ar G2 buferšķīdumu apjomu palielina līdz 200 μl.

4. DNS ekstrahēšana

Kopējo DNS ekstrahē saskaņā ar ražotāja norādījumiem, izmantojot DNS audu ekstrahēšanas komplektu un EZ1 Advanced XL Biorobot (Qiagen). Katrai paraugu partijai apstrādā ekstrahēšanas kontrolparaugu (Calf Thymus DNS) un negatīvo kontrolparaugu (G2 buferšķīdums). DNS eluē 50 μl tilpumā. Lai nodrošinātu, ka ekstrahēšana beigusies sekmīgi, ar NanoDrop aparāta palīdzību nosaka DNS koncentrāciju visos paraugos un kontrolparaugos. Ja ekstrahētā DNS nav tūlīt nepieciešama, to sasaldē −20 oC temperatūrā.

**Polimerāzes ķēdes reakcija (*PCR*), ar ko konstatē *vēžu baltplankumu slimības vīrusu***

*WSSV* konstatēšanai izmantojamā metode ir divsoļu atgriezeniskās transkriptāzes *PCR* un kurā pirmajā un otrajā *PCR* raundā amplificē rRNS gēna 18s 1447 bp un 848 bp amplikonu.

Pirmā raunda *PCR* reakcijai jāsagatavo 50 μl tilpums, kurā galīgajās koncentrācijās ir 1 x *GoTaq Buffer* (*Promega*), 5mM MgCl2, 1 pmol/μl *WSSV* praimera 146 F1, 1 pmol/μl *WSSV* praimera 146 R1, 0,25 mM dNTPs, 1,25 U *Taq* polimerāzes un 2,5 μl DNS. Reakciju ar visiem paraugiem izpilda dublikātā kopā ar negatīvu ekstrahēšanas kontrolparaugu, negatīvu *PCR* kontrolparaugu (DNS vietā pievienoti 2,5 μl H2O) un pozitīvu kontrolparaugu. Pozitīvais kontrolparaugs ir atšķaidīts *vēžu baltplankumu slimības vīrusa* plazmīds, kas saražots un validēts lietošanai attiecīgajā laboratorijā (pieejams no *EURL*).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| N.p.k. | Otrā raunda *WSSV PCR* reakciju sagatavo tāpat kā pirmā raunda reakciju, taču izmanto *WSSV* 146 F2/R2 praimeru komplektu un vēl vienu pozitīvu kontrolparaugu, ar kura palīdzību pārliecinās, vai šis *PCR* posms ir izdevies.  Praimeris | Sekvence |
| 1. | *WSSV* 146 F1 | ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG |
| 2. | *WSSV* 146 R1 | TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA |
| 3. | *WSSV* 146 F2 | GTAACTGCCCCTTCCATCTCCA |
| 4. | *WSSV* 146 R2 | TACGGCAGCTGCTGCACCTTGT |

*PCR* produktus izgulsnē, izmantojot paņēmienu ar nātrija acetātu, kur 10 μl NaAc, 70 μl H2O un 250 μl etilspirta pievieno 20 μl DNS, apstrādā virpuļmikserī un ar 13 000 rpm 20 minūtes centrifugē, centrifugātu izņem un stobriņu skalo ar 200 μl absolūtā spirta, piecas minūtes centrifugējot ar 13 000 rpm. Stobriņu piecas minūtes žāvē pie 37 oC. Stobriņos pievieno 25 μl *Hi-Di* formamīda, divas minūtes uzkarsē līdz 95 oC un labi apstrādā virpuļmikserī. Paraugus atbilstoši ražotāja norādījumiem sekvenē ar analizatora *ABI*3130xl *Avant Genetic* palīdzību. Sekvenēšanas rezultātus analizē, izmantojot sekvenēšanas programmatūru *Sequencher* un sekvences ar sekvencēm salāgo, izmantojot *BLAST* funkciju *NCBI* datubāzē.

Zemkopības ministrs Jānis Dūklavs

08.02.2017. 13:27

11047

O.Vecuma-Veco

67027551, Olita.Vecuma-Veco@zm.gov.lv