

20141143520

## АГЕНЦИЈА ЗА ХРАНА И ВЕТЕРИНАРСТВО

Врз основа на член 49 став (4) Законот за ветеринарно здравство („Службен весник на Република Македонија“ бр. 113/07, 24/11, 136/11 и 123/12 ), директорот на Агенцијата за храна и ветеринарство донесе

### П Р А В И Л Н И К ЗА ДОПОЛНУВАЊЕ НА ПРАВИЛНИКОТ ЗА СУЗБИВАЊЕ И ИСКОРЕНУВАЊЕ НА ОДРЕДЕНИ БОЛЕСТИ КАЈ ВОДНИТЕ ЖИВОТНИ (\*)

#### Член 1

Во Правилникот за мерки за сузбивање и искоренување на одредени болести кај водните животни („Службен весник на Република Македонија“ број 185/11), во членот 22 по ставот (3) се додава нов став (4) кој гласи:

„ (4) Лабораторијата од ставот (1) на овој член во лабораториската дијагностика за откривање и потврдување на вирусна хеморагична септикемија (ВХС) и инфективна хематопоемска некроза (ИХН) кај пастрмките ги користи дијагностичките методи и постапки дадени во Прилог 4 кој е составен дел на овој правилник.“

#### Член 2

Овој правилник влегува во сила наредниот ден од денот на објавувањето во „Службен весник на Република Македонија“.

Бр. 02-4894/3  
22 јули 2014 година  
Скопје

Агенција за храна и  
ветеринарство  
Директор,  
Дејан Рунтевски, с.р.

---

(\*) Со овој правилник се врши усогласување со Дел 2 од прилогот од Одлуката на Советот 2001/183/ЕЗ од 23 Фебруари 2001 година која пропишува планови за надзор и дијагностички методи за откривање и потврда на одредени болести кај рибите, и ја повлекува одлуката 92/532/ЕЕЦ, Целекс број 32001D0183.

**ДИЈАГНОСТИЧКИ МЕТОДИ И ПОСТАПКИ ЗА ОТКРИВАЊЕ И ПОТВРДА НА  
ВИРУСНА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИКЕМИЈА (ВХС) И ИНФЕКТИВНА  
ХЕМАТОПОЕТСКА НЕКРОЗА (ИХН) КАЈ ПАСТРМКИТЕ**

**Глава I: Дијагностички методи за вирусна хеморагична септикемија (ВХС) и  
инфективна хематопоетска некроза (ИХН)**

**Дел I: Подготвување на мострите за вирусолошко испитување**

**1. Хомогенизација на органи**

Ткивата од епруветите кои пристигнуваат во лабораторија мора да бидат целосно хомогенизирани (стомахирани, блендирани, истолчени со стерилен песок) и потоа суспендирани во оригиналниот транспортен медиум.

Доколку мострата се состои од цели риби кои се пократки од 4 cm, прво се отстранува задниот дел од телото зад аналниот отвор а потоа рибите цели се сецкаат со стерилни ножици или скалпел.

Ако мострите опфаќаат риби со должина на телото помеѓу 4 cm и 6 cm се земаат внатрешните органи и бубрегот.

Ако мострите опфаќаат цели риби со должина на телото повеќе од 6 cm примероците од ткиво треба да бидат земени како што е опишано во точка 1.1.3. Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура. Ткивата се сечат со стерилни ножици или скалпел и хомогенизираат како што е опишано погоре и суспендираат во транспортен медиум.

Односот помеѓу ткивните примероци и транспортниот медиум во лабораторија мора да се постави во размер 1:10.

**2. Центрифугирање на хомогенатот**

Хомогенатот се центрифугира во ладна центрифуга на температура 2 до 5°C на брзина 2000 до 4000 x g 15 минути и супернатантот се собира и третира или 4 часа на 15°C или преку ноќ на 4°C со антибиотици. Во оваа фаза може да се користи антибиотик гентамицин 1 mg/ml.

Доколку транспортниот медиум во кој се транспортира мострата веќе содржи антибиотик обработувањето на супернатантот со антибиотик може да се изостави.

Обработката со антибиотици е наменета за контрола на бактериска контаминација на мострите така да не е потребна филтрација преку мембрански филтри.

Ако собраниот супернатант е складиран на температура од  $-80^{\circ}\text{C}$  во текот на 48 часа по земањето на мострите, може само уште еднаш да се употреби за вирусолошко испитување.

Во случај на практични потешкотии (дефект на инкубатор, проблеми со културите на клетки и др.) со што е оневозможено инокуирање на клетките во текот на 48 часа по земањето на мострите од ткива, супернатантот може да се замрзне на температура од  $-80^{\circ}\text{C}$  и вирусолошкото испитување да се направи во текот на 14 дена.

Пред инокуирање на клетките супернатантот се меша со еднакви делови од соодветно разредени пулови на антисеруми од локални серотипови од вирусот на инфективната некроза на панкреасот кај пастрмките (ИПН) и се инкубира најмалку еден час на температура од  $15^{\circ}\text{C}$  или најмногу 18 часа на температура од  $4^{\circ}\text{C}$ . Титарот на антисерумот мора да биде најмалку 1/2000 во 50% тест на неутрализација на плакови.

Третманот на сите инокуланти со антисерум на ИПН вирусот (вирус кој во делови од Европа се појавува во 50% од мострите од риба) има за цел да го спречи цитопатогениот ефект (ЦПЕ) во однос на ИПН вирусот. Со ова ќе се намали времетраењето на вирусолошкото испитување. Бројот на случаи во кои појавувањето на ЦПЕ се смета како потенцијален индикатор во ВХС или ИХН.

Во случаи кога мострите потекнуваат од производни единици кои се слободни од ИПН третманот за инокулација со антисерум на ИПН вирусот може да биде испуштени.

## **Дел II: Вирусолошко испитување**

### **1. Култура на клетки и медиум**

BF-2 или RTG-2 и EPC или FHM клетките се размножуваат на температура од 20 до  $30^{\circ}\text{C}$  во соодветен медиум, на пр. Eagle's MEM (или негови модификации), збогатен со 10% фетален бовин серум и антибиотици во стандардни концентрации.

Ако клетките се размножуваат во затворени садови се препорачува пуферирање со бикарбонат. Медиумот кој се користи за култура на клетки во отворени садови може да се пуферира со Tris-HCL (23 mM) и Na-bikarbonat (6 mM). Ph мора да биде  $7,6 \pm 0,2$ .

Културите на клетки кои се користат за инокуирање со ткивен материјал треба да бидат млади (стари 4 - 48 часа и при инокуирањето треба да бидат во фаза на активен раст без прераснување).

### **2. Инокулација на културите на клетки**

Културите на клетки се инокуират со суспензијата на органите третирана со антибиотици во две разредувања. Основно/примарно разредување и дополнително разредување од 1:10 од основното, што води до финално разредување на ткивниот материјал во медиум на култура на клетки од 1:100 и 1:1000 соодветно (за да се спречи хомологно мешање). Мора да се инокуираат најмалку две клеточни линии (согласно точка 1 од овој дел). Односот помеѓу големината на инокулот и волуменот/количината на медиумот за култура на клетки треба да биде 1:10.

За секое разредување и секоја клеточна линија се употребуваат најмалку околу 2 cm<sup>2</sup> клеточна површина што одговара на едно дупче (микротитарски отвор) на 24-титарска плоча за култура на клетки. Се препорачува користење на титрациски плочи, но прифатливи се и други садови со слична или поголема површина за раст на клетките.

### 3. Инкубација на културата на клетки

Инокулираните култури на клетки се инкубираат 7 до 10 дена на температура од 15°C. Ако бојата на медиумот на културите на клетки се промени од црвена во жолта што укажува на закиселување на медиумот, мора да се направи прилагодување на pH со помош на стерилен раствор на бикарбонат или супстанца еквивалентна на него за да се обезбеди осетливост на клетките на вирусна инфекција.

Најмалку секои шест месеци или доколку постои сомневање на намалена осетливост на клетките се прави титрација со замрзнати резерви на вирусите на ВХС и ИХН за да се потврди осетливоста на културата на клетки на инфекција. Постапката која се препорачува е опишана во Глава IV од овој прилог.

### 4. Микроскопирање

Инокулираните култури на клетки треба редовно да се прегледуваат, најмалку три пати неделно на појава на цитопатоген ефект (ЦПЕ) при зголемување од 40 до 150 пати.

### 5. Субкултивирање

Во случај ако по примарната инкубација од 7 до 10 дена не се развие ЦПЕ, се врши субкултивирање на свежи клеточни култури со користење на површина на клетки како во примарната култура.

Аликвотите од медиум (супернатант) од сите дупчиња кои ја сочинуваат примарната култура се пулираат според клеточните линии од 7 до 10 дена по инокулацијата. Пулираните примероци добиени на овој начин се инокулираат на хомологна култура на клетки неразредени и разредени во однос 1:10 (при што се добива конечно разредување на супернатантот во однос 1:10 односно 1:100) како што е опишано во точка 2 од овој дел. Втората можност е аликвотите со 10% медиум кој е составен дел на примарната култура да се инокулираат директно во микротитарските отвори со свежа култура на клетки (субкултивирање од еден во друг микротитарски отвор). На инокулацијата и претходи преинкубација на разредувањето со антисерум за вирусот на ИПН во соодветно разредување како што е опишано во Дел 1 точка 3 од оваа глава.

Инокуирните култури се инкубираат 7 до 10 дена на температура од 15°C и се набљудуваат како што е опишано во точка 4 од овој дел.

Ако во текот на првите три дена од инкубацијата се појави токсичен ЦПЕ, во оваа фаза може да се спроведе/направи субкултивација, но клетките потоа мора да се инкубираат 7 дена и потоа повторно да се субкултивираат со дополнителни седум дена на инкубација. Ако токсичниот ЦПЕ се развие по три дена, клетките може еднаш да се стават во пасажа и инкубираат додека не поминат вкупно 14 дена од примарната инокулација. Во последните седум дена на инкубација не смеат да се јават знаци на токсичност.

Ако и покрај обработката со антибиотици дојде до бактериска контаминација, при субкултивирањето треба да се изврши центрифугирање на 2000 до 4000 x g 15 - 30 минути на температура 2 - 5°C и/или филтрирање на супернатантот низ филтер од 0,45 µm (мембрана со ниска способност за врзување на протеини). Постапката на субкултивација понатаму е иста како и при токсичен ЦПЕ.

### Дел III: Вирус идентификација

#### 1. Тестови за идентификација на вирусот

Ако во културата на клетки се утврди постоење на ЦПЕ, медиумот (супернатантот) се собира и испитува со една или повеќе од следните методи: неутрализација, IF, ELISA. Ако со овие дијагностички методи не може со сигурност да се идентификува вирусот во временски период од една недела, супернатантот треба да се испрати во ЕУ референтната лабораторија за болести на риби за да може да се направи идентификација на вирусот.

#### 2. Неутрализација

Од собраниот супернатант се отстрануваат клетките со центрифугирање (2000 до 4000 x g) или со мембранско филтрирање низ филтри со мембрана (0,45 µm) со ниска апсорпција на протеини и разредување на супернатантот 1:100 и 1:10000 во медиум за култура на клетки.

Аликвотите на две разредувања на супернатантот се помешуваат и одвоено се инкубираат 60 минути на температура од 15°C со еднакви делови на следните реагенси:

– серум кој содржи групно специфични антитела против вирусот на ВХС во разредување 1:50 (vol:vol)\*<sup>i</sup>

– серум кој содржи групно специфични антитела против вирусот на ИХН во разредување 1:50 (vol:vol)\*<sup>ii</sup>

– групен примерок на антисерум за локални серотипови на вирусот на ИПН во разредување 1:50 (vol:vol)\*<sup>iii</sup>

– само медиум (позитивна контрола).

За секоја вирусна супернатант - серум мешавина, најмалку две клеточни линии се инокулираат со 50µl и се инкубираат на температура од 15°C. Развојот на ЦПЕ се проверува како што е опишано во дел 2 точка 4 од оваа глава.

Некои соеви на вирусот на ВХС не реагираат на тест на неутрализација. Ваквите изолати ќе треба да се идентификуваат со IF или ELISA метода.

Може да се употребат и други тестови на неутрализација кои се докажани како ефикасни.

#### 3. Имунофлуоресценција (IF)

За секој изолат на вирусот кој треба да се идентификува, најмалку 8 покривни стакленца или нивен еквивалент треба да се насадат со клетки со густина од 60% до 90%-тна конфлуенција по 24 часа од култивирањето. За оваа цел се препорачуваат ЕРС клетки бидејќи имаат голема способност за прилепување на стаклото но и други линии на клетки како BF-2, RTG-2 или FHM може исто така да се користат.

Откако клетките ќе се наталожат на стаклената површина (отприлика 1 час по насадувањето) или откако културите ќе бидат инкубирани во период од 24 часа, се инокулира вирусот кој треба да биде идентификуван. Четири култури се инокулираат со волумен во размер 1:10 а четири култури во размер 1:1000. Овие потоа се инкубираат 20 до 30 часа на температура од 15°C.

По инкубацијата културите два пати се испираат со Eagle's MEM без серум, се фиксираат со 80%-тен ледено ладен ацетон и потоа се бојат со двослоен IFAT. Првиот слој на реагенсот се состои од поликлонални или моноклонални антитела со референтен квалитет. Вториот слој на реагенсот е флуорохром коњугиран антисерум за имуноглобулинот кој се користи во првиот слој. За секое тестирање на антисерумот најмалку една висока доза и најмалку една ниска доза на инокулирани култури треба да бидат обоени. Соодветна негативна и позитивна контрола треба да бидат вклучени во тестот. Се препорачуваат FITC и TRITC флуорохроми.

На обоените култури се нанесува физиолошки раствор со додаток на глицерол. Се прегледуваат под ултравиолетово светло. Се набљудуваат со окулари со зголемување од 10x или 12x и објективи со зголемување 25x или 40x со нумеричка апертура > 0,7 и >1,3 соодветно.

Гореопишаната постапка на имунофлуоресценција (IF) е наведена како пример и наместо неа може да се користат и други постапки на имунофлуоресценција со докажана ефикасност (во зависност од културите на клетки, фиксирање и антитела со референтен квалитет).

#### 4. ЕЛИСА (ELISA)

Отворите на микротитрациската плоча се полнат од вечер со препорачани разредувања на прочистени фракции со имуноглобулински антитела со референтен квалитет.

По испирање/плакнење на отворите со пуфер PBS-Tween-20, во нив се додава вирусот кој треба да биде идентификуван и тоа во серии со двократно или четворократно разредување и се оставаат да реагираат со абсорбираните антитела 60 минути на температура од 37°C. По испирањето со пуферот PBS-Tween-20, се додаваат антитела обележани со биотин и нивната специфичност одговара на специфичноста на адсорбираните антитела и се оставаат да реагираат 60 минути на температура од 20°C. Се прави уште едно испирање како што е опишано погоре и потоа се додава стрептавидин коњугиран со хрен пероксидаза (HRP) и се остава да реагира еден час на температура од 20°C. По последното испирање со употребата на соодветен ЕЛИСА супстрат (ОПД или друг) врзаните ензими стануваат видливи.

Горе опишаната верзија на метода на ЕЛИСА која се заснова на примена на биотин и авидин е наведена само како пример. Може да се користат и други методи на ЕЛИСА кои се покажани како ефикасни (OPD или други).

## **Глава II: Дијагностички методи за потврдување на ВХС и ИХН во случај на појава на сомнеж на болестите**

За дијагностицирање на ВХС и ИХН се применуваат една или повеќе од следните методи:

- Конвенционално изолирање на вирусот на кое следи серолошка идентификација (дел I од оваа глава.)
- Изолација на вирусот со паралелна серолошка идентификација (дел II од оваа глава.)
- Други методи на дијагностика – IFAT, ELISA (дел III од оваа глава)

Потврда на прв случај на ВХС и/или ИХН во одгледувалишта сместени во одобрена зона не смее да биде заснована само на методи од дел III од оваа глава. Треба да се применат и методите од дел I и II од оваа глава.

Во некои случаи покрај материјал од ткиво за вирусолошко испитување треба да се приложи и друг материјал за бактериолошко, паразитолошко, хистолошко или друго испитување заради диференцијална дијагностика.

### **Дел I Конвенционално изолирање на вирусот на кое следи серолошка идентификација**

#### **I.1. Избор/селекција на мостри-материјал за испитување**

За испитување треба да се земат најмалку 10 риби кои покажуваат знаци на ИХН или ВХС.

#### **I.2. Подготвување и испраќање на мострите риба**

Се постапува како што е пропишано во Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

#### **I.3. Земање на дополнителен материјал за дијагностичко испитување**

Се постапува како што е пропишано во Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

#### **II. Подготвување на материјалот/мострите за вирусолошко испитување**

Се постапува како што е пропишано во Глава I дел I од овој прилог.

#### **III. Вирусолошко испитување**

Се постапува како што е пропишано во Глава I дел II од овој прилог.

#### IV. Идентификација на вирусот

Се постапува како што е пропишано во Глава I Дел III од овој прилог.

#### **Дел II. Изолација на вирусот со паралелна серолошка идентификација**

##### I.1. Избор/селекција на мостри-материјал за испитување

Се постапува како што е пропишано во Дел I. точка I.1 од оваа глава.

##### I.2. Подготвување и испраќање на мострите риба

Се постапува како што е пропишано во Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

##### I.3. Земање на дополнителен материјал за дијагностичко испитување

Се постапува како што е пропишано во Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

##### II.1. Хомогенизација на органите

Се постапува како што е пропишано во Глава I, дел I, точка 2 од овој прилог.

##### II.2. Центрифугирање на хомогенатот

Хомогенатот се центрифугира на 2000 до 4000 x g 15 минути во ладна центрифуга на 2 - 5°C, по што супернатантот се одлева и се третира со антибиотици на пр. гентамицин 1 mg/ml четири часа на 15°C или се филтрира низ мембрана (0,45 µm) со ниска способност за врзување на протеини.

##### II.3. Обработка на супернатантот со дијагностички антисерум

Суспензијата на органите обработена со антибиотици или филтрирана низ мембрански филтер се разредува во однос 1:10 и 1:1000 во медиум за култура на клетки, аликвотите се мешаат и инкубираат 60 минути на температура од 15 °C со еднакви делови на реагенс наведени во Глава I, дел III точка 2 од овој прилог.

##### III.1. Клеточни култури и медиум

Се постапува како што е пропишано во Глава I, дел II, точка 1 од овој прилог.

##### III.2. Инокулација на култура на клетки

Од секоја мешавина на вирус и серум (припремени како што е опишано во точка 2.3 од овој пододдел) се инокулираат по најмалку по две култури на клетки по клеточна линија секоја со по 50µl.

### III.3. Инкубација на култура на клетки

Се постапува како што е пропишано во Глава I, дел II од овој прилог.

### III.4. Микроскопирање

Инокулираните култури на клетки секојдневно се прегледуваат на ЦПЕ при зголемување од 40 до 150 пати. Ако еден од користените антисеруми го спречи настанувањето на ЦПЕ, може да се потврди дека вирусот е идентификуван.

Доколку ЦПЕ не е спречен со нитуеден од антисерумите треба да се започне со идентификација на вирусот со постапки како што е опшано во Глава I, дел III.

### III.5. Субкултивирање

Доколу по 7 до 10 дена не се појави ЦПЕ треба да се започне со субкултивирање со култури инокулирани со супернатант и медиум (Глава II, дел II точка II.3) во согласност со Глава I, дел III, точка 5 од овој прилог.

## **Дел III Други дијагностички методи**

Супернатантот кој е припремен како што е опишано во Глава I, дел I точка 1 од овој прилог може да се испита со дијагностичките методи IFAT или ELISA во согласност со Глава I, дел III, точка 3 или глава I дел III точка 4 од овој прилог. Овие брзи методи треба да се дополнат со вирусолошко испитување во согласност со дел I или дел II од оваа глава. Од овој дел во рок од 48 часа од земањето на примероците ако:

(а) се добие негативен резултат, или

(б) се добие позитивен резултат од материјалот кој претставува прв случај на ИХН или ВХС во одобрена зона.

Материјалот сочинет од ткива може да се испита и со други дијагностички методи, како RT-PCR, IF на замрзнати секции, имунохистохемија на мостра од ткиво фиксирана со формалин. Наведените постапки мора секогаш да се дополнат со инокулирање со нефиксиран материјал од ткиво на култура на клетки.

### Глава III

#### **Насоки и критериуми за официјални контроли на здравствената состојба и евидентирање и документирање на одсуство на ВХС и/или ИХН во зони или одгледувалишта во неодобрени зони**

1. Официјалните контроли на здравствената состојба може да започнат:

– откако ќе се спроведе официјално искоренување на ВХС и/или ИХН односно целата риба од одгледувалиштето нештетно ќе се отстрани, ќе се спроведе чистење, дезинфекција и ќе помине одредено време до повторно населување на одгледувалиштето со риба која потекнува од одобрени одгледувалишта или

– доколку во одгледувалиштето историски во минатиот период не е докажана инфекција со вируси на ВХС или ИХН.

2. Надзорот треба да се темели на клинички прегледи и лабораториско испитување.

3. Надзорот треба да вклучува клинички преглед два пати годишно во согласност со насоките кои се дадени во Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура.

4. Во текот на еден од прегледите кои се споведуваат најмалку еднаш годишно од секое одгледувалиште мора да се земат 30 примероци на ткиво од риба и/или оваријална течност. Изборот на мострите, подготовката на истите е во согласност со Прилог 6 од Правилникот за условите за ставање во промет на аквакултура, нејзината намена, како и начинот на вршење на официјални контроли при ставање во промет на аквакултура, а лабораториското испитување е во согласност со Глава I, II и IV од овој прилог.

5. Здравствени прегледи се спроведува најмалку четири години на сите одгледувалишта во одобрената зона односно на одгледувалиштата во не-одобрена зона која треба да биде одобрена.

6. За да се добие официјално одобрување на надзорот не смее да се добие позитивен наод на ниту еден случај на ВХС или ИХН (било клиничка инфекција, било изолација на вирусот).

## Глава IV

### Постапка на титрација за проверка на осетливост на културите на клетки на инфекција

Препорачаните постапки на титрација наведени во Глава I, дел II точка 3 од овој прилог се следни:

Треба да се користат најмалку два изолати на вирусот на ВХС и еден изолат на вирусот на ИХН. Изолатите треба да претставуваат збир од вируси кои се присутни на територијата на ЕУ на пример за вирусот на ВХС потребно е да се одбере еден патоген изолат кој потекнува од виножитна пастрмка од слатка вода и еден изолат кој е патоген за ромбот од морска вода, а за вирусот на ИХН треба да се одбере еден европски сој кој е патоген за виножитната пастрмка. Потребно е да се користат добро дефинирани изолати кои потекнуваат од земји членки на Европската унија. Референтните изолати можат да се добијат од ЕУ референтната лабораторија за болести на риби.

Серијата на вируси со ниска пасажа се размножуваат во BF-2 или RTG-2 културите на клетки за вирусот на ВХС, и на EPC или FHM културите на клетки за вирусот на ИХН. Потребно е да се користи медиум за култура на клетки со најмалку 10% серум. За инокулација потребно е да се користи низок MOI ( $< 1$ ).

Кај целосен ЦПЕ вирусот се собира со центрифугирање на супернатантот на култура на клетки на 2000 x g во времетраење од 15 минути, се стерилизира со филтрирање низ мембрански филтер од 0.45µm и потоа се распоредува во означени криоепрувети. Вирусот се чува на -80°C.

По една недела од замрзнувањето, во ладна вода се растопуваат по три епрувети од секој вирус и се титрираат на соодветни клеточни линии. Најмалку секои 6 месеци или доколку постои сомневање на намалена осетливост на клеточните линии, секој изолат на вирусот треба да се растопи и титрира.

Постапките на титрација мора да бидат детално опишани и секој пат мора да се применува иста постапка.

Титрирање со разредување до завршна точка вклучува најмалку шест повторувања во секоја фаза на разредување. Титрите се споредуваат со претходно добиените титри. Ако титарот на било кој од трите изолата на вирусот падне под фактор од 2 log или повеќе во однос на почетниот титар, клеточната линија не би требало повеќе да се користи за цел на надзор.

Доколку во лабораторијата се држат различни клеточни линии, секоја клеточна линија треба да се испитува одвоено.

Евиденцијата треба да се чува најмалку 10 години.

## Глава V

### Акроними и кратенки

BF-2	Клеточна линија од подмладокот на <i>Lepomis macrochirus</i>
ЦПЕ	Цитопатоген ефект
ELISA	Имуноензимски тест
ЕРС	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (линија на клетки)
ФНМ	<i>Pimephales promelas</i> (линија на клетки)
FITC	Fluorescein izotiocijanat
Нeпeс	N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etan сулфонска киселина
HRP	ен-пероксидаза
IF	Имунофлуоресценција
IFAT	Индиректен флуоресцентен тест за докажување на антитела
ИХН	Инфективна хематопоемска некроза
ИПН	Инфективна некроза на панкреас
MEM	Минимален есенцијален медиум
MOI	Однос на инфекцијата (размер на бројот на инфективни вирусни честички додадени на познат број на клетки во културата)
OPD	Orto-fenilendiamin
PBS	Физиолошки раствор пуфериран со фосфатен пуфер
RTG-2	Гонади на виножитна пастрмка (линија на клетки)
RT-PCR	Полимераза верижна реакција со реверзна транскрипција
Tris-HCl	Tris-(hidroksimetil)-aminometan – HCl
TRITC	Tetrametil-rodamin-izotiocijanat
VXC	Вирусна хеморагична септикемија

<sup>i</sup> Или како што е специфицирано од референтна лабораторија имајќи ја во предвид можноста за цитотоксичност на антисерумот.

<sup>ii</sup> Или како што е специфицирано од референтна лабораторија имајќи ја во предвид можноста за цитотоксичност на антисерумот.

<sup>iii</sup> Или како што е специфицирано од референтна лабораторија имајќи ја во предвид можноста за цитотоксичност на антисерумот.