

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ
BIOMEDICINE**

Aleksandra Grilc Fajfar

**UPORABNOST NEKATERIH VIROLOŠKIH
METOD V DIAGNOSTIKI INFEKCIOSNE
HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI (IHN)
TER MOLEKULARNA OPREDELITEV SLOVENSKIH
IZOLATOV VIRUSA IHN**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2011

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA
INTERDISCIPLINARNI PODIPLOMSKI ŠTUDIJ
BIOMEDICINE**

UDK 578.2:616.98–079:578.824:597.552.512(043.2)

Aleksandra Grilc Fajfar, dr. vet. med.

**UPORABNOST NEKATERIH VIROLOŠKIH METOD V
DIAGNOSTIKI INFEKCIOSNE HEMATOPOETSKE
NEKROZE POSTRVI (IHN) TER MOLEKULARNA
OPREDELITEV SLOVENSКИH IZOLATOV VIRUSA IHN**

Doktorska disertacija

**APPLICATION OF SOME DIAGNOSTIC METHODS FOR
INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHN)
DISEASE AND MOLECULAR DETERMINATION OF
SLOVENE IHNV ISOLATES**

Doctoral thesis

Ljubljana, 2011

Aleksandra Grilc Fajfar

**UPORABNOST NEKATERIH VIROLOŠKIH METOD V DIAGNOSTIKI
INFEKCIOSNE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI (IHN) TER
MOLEKULARNA OPREDELITEV SLOVENSКИH IZOLATOV VIRUSA IHN**

Doktorska disertacija je zaključek Interdisciplinarnega podiplomskega študija biomedicine, s področja veterine. Delo je bilo opravljeno v viroloških laboratorijih na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani.

Mentor: izr. prof. dr. Peter Hostnik
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in
parazitologijo

Somentorica: izr. prof. dr. Darja Barlič Maganja, Inštitut za varovanje
zdravja
Republike Slovenije

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jože Grom
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za
mikrobiologijo in
parazitologijo

Članica: prof. dr. Vlasta Jenčič
Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za
zdravstveno
varstvo in gojitev divjih živali, rib in čebel

Član: prof. dr. Zdravko Petrinc

Univerza v Zagrebu, Veterinarski fakultet Sveučilišta u
Zagrebu, Zavod za
Biologiju i patologiju riba i pčela

Datum zagovora: _____

Izjavljam, da je predložena doktorska disertacija rezultat lastnega
raziskovalnega dela.

Doktorandka: Aleksandra

Grilc Fajfar

KAZALO VSEBINE

Kazalo vsebine	VI
Kazalo slik	XI
Kazalo tabel	XV
Kazalo prilog	XVI
Okrajšave in simboli	XVII
Izvod	XX
Abstract	XXII
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE.....	3
1.2 HIPOTEZE	6
2 PREGLED LITERATURE.....	7
2.1 EVOLUCIJA RIB	7
2.2 SALMONIDNE VRSTE RIB	8
2.2.1 Postrvi – <i>Salmo trutta</i> , Linnaeus 1758	8
2.2.2 Salmonidne vrste rib v Sloveniji	10
2.2.2.1 Soška postrv – <i>Salmo marmoratus</i> , Cuvier 1817	10
2.2.2.2 Šarenka ali ameriška postrv (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , tudi <i>Salmo gairdneri</i> Richardson, 1836)	12
2.3 ZGODOVINSKI PREGLED RAZISKAV INFEKCIJSKE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI (IHN)	13
2.4 VIRUS INFEKCIJSKE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI.....	15
2.4.1 Taksonomska uvrstitev	15
2.4.2 Morfološke značilnosti in fizikalno-kemijske lastnosti viriona IHN	17
2.4.3 Struktura genoma	18
2.4.4 Virusne beljakovine	20
2.4.5 Razmnoževanje virusa IHN	23
2.4.6 Ekspresija virusnih genov	25
2.5 EPIZOOTIOLOŠKE ZNAČILNOSTI VIRUSA IHN	25
2.6 MOLEKULARNA EPIZOOTIOLOGIJA	27
2.7 VRSTE RIB, KI SO DOVZETNE ZA OKUŽBO Z VIRUSOM IHN	30
2.8 KLINIČNA SLIKA BOLEZNI IHN	32
2.9 PATOHISTOLOŠKE SPREMEMBE	33
2.10 IMUNSKI SISTEM IN IMUNSKI ODGOVOR PRI RIBAH	35
2.10.1 Imunski odgovor rib na okužbo z virusi	41
2.11 DIAGNOSTIČNE METODE	43
2.11.1 Neposredne metode dokazovanja virusa IHN.....	44
2.11.1.1 Izolacija virusa na celični kulturi.....	44
2.11.1.2 Imunoperoxidazni test	44
2.11.1.3 Molekularne metode	45
2.11.1.3.1 Verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo	45
2.11.1.3.2 RT-PCR v realnem času	46
2.11.2 Posredne metode dokazovanja virusa IHN	47

2.11.2.1 Dokaz protiteles proti virusu IHN v serumu rib	48
2.12 BIOLOŠKI POSKUS, PATOHISTOLOŠKA IN IMUNOHISTOKEMIČNA PREISKAVA	49
2.13 PRIMARNA CELIČNA KULTURA	50
3 MATERIALI IN METODE	52
3.1 NEPOSREDNE METODE	52
3.1.1 Metode klasične virologije	52
3.1.1.1 Klinični material	52
3.1.1.2 Transportno gojišče	52
3.1.1.3 Vzorci organov ter semenske in ovarialne tekočine.....	53
3.1.1.4 Izolacija virusa na celični kulturi.....	53
3.1.1.4.1 Celična linija EPC (Epithelioma pappulosum cyprini).....	53
3.1.1.4.2 Priprava celične kulture.....	54
3.1.1.4.3 Razmnoževanje celične linije EPC.....	54
3.1.1.4.4 Sestava rastnega gojišča za celično linijo EPC s 5 % fetalnega govejega seruma, 5 % FBS) (FBS, angl. fetal bovine serum).....	55
3.1.1.4.5 Celična kultura EPC za izolacijo virusa IHN v celični kulturi.....	55
3.1.1.4.6 Ocena viabilnosti celic.....	56
3.1.1.4.7 Virusi.....	56
3.1.1.4.7.1 Referenčni sev N61.....	56
3.1.1.4.7.2 Slovenski izolat 1654/08.....	56
3.1.1.4.7.3 Namnoževanje referenčnega seva N61 in virusnih izolatov virusa IHN v celični kulturi EPC.....	57
3.1.1.5 Postopek izvedbe metode izolacije virusa IHN na celični kulturi.....	57
3.1.1.6 Imunoperoksidazni test.....	58
3.1.1.6.1 Postopek izvedbe imunoperoksidaznega testa.....	58
3.1.2 Molekularne metode.....	60
3.1.2.1 Začetni oligonukleotidi in sonda.....	60
3.1.2.2 Osamitev celokupne RNA iz vzorcev organov ali semenske in ovarialne tekočine z reagentom TRIzol® in QIAamp Viral RNA Mini Kit.....	60
3.1.2.2.1 Osamitev celokupne RNA z reagentom TRIzol® (Invitrogen®).....	61
3.1.2.2.2 Osamitev celokupne RNA s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA (QIAGEN®).....	61
3.1.2.3 Pomnoževanje nukleinske kisline virusa IHN z metodo RT-PCR.....	63
3.1.2.3.1.1 Pomnoževanje odseka v genu za glikoprotein (ORF4)	63
3.1.2.3.1.2 Pomnoževanje odseka v genu za nukleokapsidni protein (ORF1) ...	64
3.1.2.3.1.3 Pomnoževanje odseka v genu za protein NV (ORF5)	64
3.1.2.4 Analiza produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu.....	64
3.1.2.5 Sekvenciranje produktov RT-PCR.....	65
3.1.2.5.1 Izbira začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo.....	65
3.1.2.5.2 Sekvenčna reakcija.....	65
3.1.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja.....	66
3.1.2.7 Analiza nukleotidnih zaporedij.....	67
3.1.2.8 Preverjanje virusne nukleinske kisline z metodo RT-PCR v realnem času.....	68
3.1.2.8.1 Enostopenjski RT-PCR v realnem času za pomnoževanje odseka v genu za glikoprotein (ORF4).....	68
3.2 POSREDNE METODE.....	70
3.2.1 Klinični material.....	70
3.2.2 Dokazovanje protiteles proti virusu IHN z virus nevtralizacijskim testom (VNT). 70	
3.3 BIOLOŠKI POSKUS.....	72

3.3.1 Gojišče za gojenje primarne celične kulture srčnega tkiva (kardiomiocitov) šarenke in soške postrvi.....	72
3.3.2 Raztopina za pripravo primarne kulture srčnega tkiva (kardiomiocitov).....	72
3.3.3 Določanje občutljivosti soške postrvi (<i>Salmo marmoratus</i>) na okužbo z virusom IHN.....	73
3.3.4 Obdelava tkiv za patohistološko in imunohistokemično preiskavo.....	74
3.3.4.1 Barvanje s hematoksilinom in eozinom.....	74
3.3.4.2 Postopek imunohistokemične preiskave za dokazovanje prisotnosti virusnega antigena virusa IHN.....	75
3.3.5 Dokaz občutljivosti šarenke in soške postrvi na okužbo z virusom IHN – primarna celična kultura srčnega tkiva (kardiomiocitov).....	75
4 REZULTATI.....	78
4.1 NEPOSREDNE METODE.....	78
4.1.1 Klasične virološke tehnike.....	78
4.1.1.1 Izolacija virusa na celični kulturi.....	78
4.1.1.2 Imunoperoksidazni test.....	81
4.1.2 Molekularne metode.....	83
4.1.2.1 Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR v odseku gena za nukleokapsidni protein (ORF1), glikoprotein G (ORF4) in protein NV (ORF5).....	83
4.1.2.2 Določanje nukleotidnega zaporedja odseka v genu za glikoprotein G (ORF4).....	88
4.1.2.3 Filogenetska analiza ORF4.....	91
4.1.2.4 Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR v realnem času.....	93
4.1.2.5 Primerjava občutljivosti metode izolacije virusa na celični kulturi z metodo RT-PCR v realnem času.....	98
4.1.2.6 Primerjava molekularnih metod za izolacijo in dokazovanje RNA referenčnega seva N61.....	98
4.1.2.6.1 Metoda RT-PCR.....	99
4.1.2.6.2 RT-PCR v realnem času.....	100
4.2 POSREDNE METODE.....	101
4.2.1 Serološke preiskave.....	101
4.3 BIOLOŠKI POSKUS.....	105
4.3.1 Rezultati testiranja občutljivosti šarenke in soške postrvi na okužbo z virusom IHN.....	105
4.3.1.1 Rezultati testne skupine A pri vrsti »šarenka«.....	106
4.3.1.2 Rezultati testne skupine B pri vrsti »šarenka«.....	107
4.3.1.3 Rezultati testne skupine A pri vrsti »soška postrv«.....	107
4.3.1.4 Rezultati testne skupine B pri vrsti »soška postrv«.....	108
4.3.1.5 Tabelarni prikaz rezultatov za obe testni skupini šarenk in soških postrvi.....	109
4.3.2 Imunohistokemično dokazovanje virusnega antigena virusa IHN v tkivnih rezinah.....	110
4.3.3 Statistična obdelava rezultatov biološkega poskusa.....	115
4.3.3.1 Statistična obdelava rezultatov biološkega poskusa – dokazovanje virusa z metodo IVCK.....	116
4.3.3.1.1 Rezultati hi-kvadrat testa.....	116
4.3.3.2 Statistična obdelava rezultatov biološkega poskusa – dokazovanje virusa z metodo RT-PCR.....	117
4.3.3.2.1 Rezultati hi-kvadrat testa.....	118
4.3.3.3 Analiza korelacij (Pearsonov koeficient) med spremenljivkami.....	119
4.4 PRIMARNA CELIČNA KULTURA.....	120

4.4.1 Testiranje občutljivosti primarne kulture kardiomiocitov na okužbo z virusom IHN z metodo izolacije virusa na celični kulturi	123
4.4.2 Dokaz virusa IHN z imunoperoksidaznim testom.....	125
5 RAZPRAVA.....	127
6 SKLEPI	144
7 POVZETEK (SUMMARY).....	147
7.1 POVZETEK.....	147
7.2 SUMMARY.....	151
8 ZAHVALA.....	155
9 VIRI.....	157
Northwest Alliance for Computational Science & Engineering.....	177
Swiss Institute of Bioinformatics. Viralzone.....	182
http://expasy.org/viralzone/all_by_species/76.html (28.1.2010).....	182
http://wfrc.usgs.gov/fieldstations/hq/ihn.html (28.1.2010).....	183
10 PRILOGE.....	186

Kazalo slik

Slika 2-1: Soška postrv (http://www.ribiska-druzina-tolmin.si/ribe.php).....	11
Slika 2-2: Šarenka (http://www.ribiska-druzina-tolmin.si/ribe.php).....	13
Slika 2-3: Posnetek virionov IHN z EM.....	16
Slika 2-4: Shematski prikaz zgradbe viriona IHN.....	17
Slika 2-5: Shematski prikaz organizacije genoma IHNV. Pod sliko je prikazana dolžina posameznega odseka v nukleotidih. (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/76.html).....	19
Slika 2-6: Geografska razporeditev 3 glavnih genskih skupin (U, M in L) na zahodni obali Severne Amerike. Povzeto po: Kurath in sod. (2003).....	30
Slika 2-7: Zarod šarenke, ki je bil eksperimentalno izpostavljen virusu IHN. Med značilne klinične znake bolezni IHN prištevamo temnejše obarvanje kože in eksoftalmijo, kar je opazno pri mladici v spodnji polovici slike (http://wfrc.usgs.gov/fieldstations/hq/ihn.html). ..	32
Slika 2-8: Pseudofeces. Povzeto po: Matras in sod. (2006).....	33
Slika 2-9: Enostranski eksoftalmus in petehialne krvavitve okoli očesa pri mladici postrvi.....	33
Slika 3-10: Celična linija EPC. Slikano pri 100-kratni povečavi (Eclipse TS100, Nikon).....	54
Slika 3-11: Soška postrv.....	76
Slika 3-12: Soška postrv ob raztelesbi.....	77
Slika 3-13: Srce soške postrvi.....	77
Slika 4-14: Nepoškodovan, porasel sloj EPC (levo, 200-kratna povečava) in pojav CPE na celični liniji EPC po 48 urah po inokulaciji virusa IHN (desno, 100-kratna povečava).....	79
Slika 4-15: Pojav citopatskega efekta, značilnega za virus IHN na celični liniji EPC, 48 ur po inokulaciji virusa IHN (200-kratna povečava).....	79
Slika 4-16: Slovenske regije, v katerih smo v letih 1997–2010 dokazali prisotnost virusa IHN. Vir: Statistični urad Republike Slovenije.....	80
Slika 4-17: Negativen rezultat imunoperoksidaznega testa na celični liniji EPC (levo, 200-kratna povečava) in značilno rdeče obarvanje citoplazme celic v primeru pozitivne reakcije (desno, 200-kratna povečava) in dokaza virusa IHN.....	81
Slika 4-18: Geografska lega ribogojnic, v katerih smo v letih 2005–2010 dokazali virus IHN. Vir: Statistični urad Republike Slovenije.....	83
Slika 4-19: Dokazovanje produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Na sliki vidimo 532 bp velik odsek gena za glikoprotein G, ki smo ga dobili s pomnoževanjem tarčnega zaporedja na ORF4 z začetnima oligonukleotidoma E1 in E3n.....	84
Slika 4-20: Dokazovanje produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Na sliki vidimo 252 bp velik odsek gena za nukleokapsidni protein, ki smo ga dobili s pomnoževanjem tarčnega zaporedja na ORF1 z začetnima oligonukleotidoma N-f in N-r.....	84
Slika 4-21: Dokazovanje produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Na sliki vidimo 714 bp velik odsek gena za protein NV, ki smo ga dobili s pomnoževanjem tarčnega zaporedja na ORF5 z začetnima oligonukleotidoma NV-f in NV-r.....	85
Slika 4-22: Slovenske regije, v katerih smo v letih 1997–2010 dokazali prisotnost virusa IHN.	86
Slika 4-23: Geografska lega ribogojnic, v katerih smo v letih 2005–2010 dokazali virus IHN. Vir: Statistični urad Republike Slovenije.....	88
Slika 4-24: Nekoreninjeno filogenetsko drevo sorodnosti med slovenskimi izolati virusa IHN in 43 referenčnih izolatov virusa IHN. Slovenski izolati virusa IHN so označeni krepko.....	92
Slika 4-25: Rezultat titracije referenčnega izolata N61 virusa IHN z metodo RT-PCR v realnem času.....	94

Slika 4-26: Standardna linearna regresijska krivulja pri RT-PCR v realnem času za določanje virusa IHN pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov (IHN-V-Tf / IHN-V-Tr) 500 nM	95
Slika 4-27: Rezultati RT-PCR v realnem času.....	97
Slika 4-28: Produkti RT-PCR iz serije sedmih desetkratnih razredčin celokupne RNA (prikazane so log ₁₀ vrednosti virusnih razredčin N61, od -1 do -7) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Celokupno RNA smo iz referenčnega izolata N61 izolirali z reagentom TRIzol®.....	99
Slika 4-29: Produkti RT-PCR iz serije sedmih desetkratnih razredčin celokupne RNA (prikazane so log ₁₀ vrednosti razredčin N61, od -1 do -7) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Celokupno RNA smo iz referenčnega izolata N61 izolirali s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit.....	100
Slika 4-30: Grafični prikaz rezultatov prvega testiranja serumskih vzorcev z VNT.....	101
Slika 4-31: Grafični prikaz rezultatov drugega testiranja serumskih vzorcev z VNT.....	102
Slika 4-32: Grafični prikaz rezultatov tretjega testiranja serumskih vzorcev z VNT.....	102
Slika 4-33: Grafični prikaz rezultatov četrtega testiranja serumskih vzorcev z VNT.....	103
Slika 4-34: Grafični prikaz rezultatov petega testiranja serumskih vzorcev z VNT.....	103
Slika 4-35: Grafični prikaz rezultatov šestega testiranja serumskih vzorcev z VNT.....	104
Slika 4-36: Kontrolna plošča pri VNT.....	104
Slika 4-37: Testna plošča. Rezultati VNT.....	105
Slika 4-38: Dinamika poginov pri šarenki v testni skupini A.....	106
Slika 4-39: Dinamika poginov pri šarenki v testni skupini B.....	107
Slika 4-40: Dinamika poginov pri soški postrvi v testni skupini A.....	108
Slika 4-41: Dinamika poginov pri soški postrvi v testni skupini B.	109
Slika 4-42: Vranica, šarenka. Difuzna in močna pozitivna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN v vranici. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (slika levo: 100-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).....	111
Slika 4-43: Ledvica, šarenka. Močna pozitivna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN v intersticiju sredice ledvic. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (slika levo: 100-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).....	111
Slika 4-44: Srce, šarenka. Pozitivna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN v miokardu. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (200-kratna povečava).....	113
Slika 4-45: Ledvice, soška postrv. Negativna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (200-kratna povečava).	113
Slika 4-46: Vranica, soška postrv. Negativna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (100-kratna povečava).	114
Slika 4-47: Srce, soška postrv. Negativna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (200-kratna povečava).....	114

Slika 4-48: Ledvice šarenke. Ledvice šarenke. Značilne vnetne spremembe v intersticiju skorje ledvic. HE, 200-kratna povečava.....	115
Slika 4-49: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke (100-kratna povečava).....	121
Slika 4-50: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke (200-kratna povečava).....	121
Slika 4-51: Primarna kultura vranice, šarenka (100-kratna povečava).....	122
Slika 4-52: Primarna kultura vranice, šarenka (200-kratna povečava).....	122
Slika 4-53: Primarna kultura kardiomiocitov, soška postrvi (200-kratna povečava).....	123
Slika 4-54: CPE na primarni kulturi kardiomiocitov šarenke (200-kratna povečava).....	123
Slika 4-55: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke. Test IP, negativna reakcija (200-kratna povečava).	124
Slika 4-56: CPE na primarni kulturi kardiomiocitov šarenke (200-kratna povečava).....	124
Slika 4-57: Primarna kultura kardiomiocitov soške postrvi. Test IP, negativna reakcija (100-kratna povečava).	125
Slika 4-58: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke. Test IP, pozitivna reakcija (slika levo: 100-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).	125
Slika 4-59: Primarna kultura kardiomiocitov soške postrvi. Test IP, pozitivna reakcija (slika levo: 200-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).	126

Kazalo tabel

Tabela 3-1: Začetni oligonukleotidi.....	63
Tabela 3-2: Začetni oligonukleotid in sonda za RT-PCR v realnem času.....	68
Tabela 4-3: Številčna in časovna opredelitev pozitivnih ribogojnic na prisotnost virusa IHN po slovenskih regijah. Vzorci so bili odvzeti v obdobju od leta 2005 do 2010.	82
Tabela 4-4: Številčna in časovna opredelitev pozitivnih ribogojnic na prisotnost virusa IHN po slovenskih regijah. Vzorci so bili odvzeti v obdobju od leta 1997 do 2010.	87
Tabela 4-5: Regijska in časovna razporeditev vzorcev pozitivnih na virus IHN, ki smo jih obdelali v filogenetski analizi.	89
Tabela 4-6: Podatki o izolatih virusa IHN, vključenih v filogenetsko analizo odseka ORF4. Okrajšave: neob., neobjavljeno; n.p., ni podatka; t.š., ta študija.....	90
Tabela 4-7: Rezultati RT-PCR v realnem času.	96
Tabela 4-8: Primerjava rezultatov metod dokazovanja virusa IHN.....	97
Tabela 4-9: Rezultati testiranih vzorcev šarenke z metodo izolacije virusa na celični kulturi EPC in molekularno metodo RT-PCR.....	109
Tabela 4-10: Rezultati testiranih vzorcev soške postrvi z metodo izolacije virusa na celični kulturi EPC in molekularno metodo RT-PCR.....	110
Tabela 4-11: Testiranje občutljivosti šarenke in soške postrvi pri metodi izolacije virusa na celični kulturi (IVCK).....	116
Tabela 4-12: Rezultati hi-kvadrat testa (ocena statistične povezanosti).....	117
Tabela 4-13: Testiranje občutljivosti šarenke in soške postrvi pri metodi izolacije virusa z molekularno metodo RT-PCR.....	118
Tabela 4-14: Rezultati hi-kvadrat testa (ocena statistične povezanosti).....	119
Tabela 4-15: Korelacija med populacijo šarenk in soških postrvi pri metodi izolacije virusa na celični kulturi (IVCK).....	119
Tabela 4-16: Korelacija med populacijo šarenk in soških postrvi pri metodi dokaza virusa IHN z metodo RT-PCR.....	120

Kazalo prilog

Priloga A: Izvirni znanstveni članek, ki je bil objavljen v reviji *European Association of Fish Pathologists* (Bull Eur Ass Fish Pathol), 31(2) 2011, 47-57.

Okrajšave in simboli

AEC	peroksidazni substrat, 3-amino-9-etilkarbazol
BF-2	angl. Bluegill Fry
BHQ	nefluorescenčni dušilec (angl. Black hole quencher)
BLAST	iskalnik podobnih zaporedij v genski zbirki (angl. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
cDNA	komplementarna DNA
CHSE-24	angl. Chinook Salmon Embryo
CPE	citopatski efekt
C _t	točka, v kateri signal fluorescence poročevalske molekule bistveno naraste in prečka linijo fluorescenčnega praga (angl. Cycle threshold)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
Da	enota atomske mase
DEPC	dietilpirokarbonat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E	učinkovitost pomnoževanja z RT-PCR v realnem času (angl. Efficiency)
EGF	epidermalni rastni faktor
EHN	epizootska hematopoetska nekroza
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
ELISA	encimsko imunski test (angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EM	elektronski mikroskop
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i>
FAM	6-karboksi-fluorescein
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo pri OZN
FBS	fetalni goveji serum »fetal bovine serum«
FHM	angl. Fat Head Minnow
FRET	fluorescenčni resonančni prenos energije
HE	hematoksilin, eozin
IFAT	indirektni imunofluorescenčni test
IgM	imunoglobulin M
IHN	infekciozna hematopoetska nekroza postrvi

IL	interlevkin
i/p	intraperitonealno
IP	imunoperoksidazni test
IPN	nalezljiva nekroza trebušne slinavke postrvi
JRt	genska skupina, kamor so uvrščeni azijski izolati virusa IHN
log ₁₀	desetiški logaritem
M	genska skupina, kamor so uvrščeni evropski izolati virusa IHN
mid-G regija	variabilna regija znotraj glikoproteinskega gena G
MGB	organska molekula, ki se veže v mali žleb dvojne vijačnice DNA (angl. minor groove binder)
mRNA	informacijska RNA
MoAb	monoklonsko protitelo
N	protein nukleokapside virusa IHN
NCBI	angl. National Centre for Biotechnology Information
NFQ	nefluorescenčni dušilec (angl. non-fluorescing quencher)
NK	naravna celica ubijalka (angl. natural killer cell)
nm	nanometer (10 ⁻⁹)
nt	nukleotid
obr	obrat
OIE	Mednarodna organizacija za zdravje živali (Office International des Epizooties)
ORF	bralni okvir (angl. open reading frame)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PFU	plakotvorna enota (angl. plaque-forming unit)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
ΔRn	razlika v jakosti normalizirane fluorescence
R2	koeficient linearne regresije
Rn-	normalizirana fluorescenca ozadja
Rn+	normalizirana fluorescenca med pomnoževanjem
Rn	normalizirana fluorescenca na pasivno referenčno barvilo
RNA	ribonukleinska kislina
ROX	pasivno referenčno barvilo 5-(ali 6-)karboksi-X-rodamin

RTG-2	angl. Rainbow Trout Gonadal cells
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (angl. reverse transcription-polymerase chain reaction)
SYBR Green I	asimetrično cianinsko barvilo
TAE	raztopina Trisa, acetata in EDTA
TAMRA	6-karboksi-tetrametil-rodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCID ₅₀	50-odstotna infektivna doza (angl. tissue culture infective dose 50 %)
TNF	tumor nekrotizirajoči faktor
Vero	celična linija iz levičnega epitela afriških zeleni opic (angl. african green monkey kidney)
VHS	virusna hemoragična septikemija
S	žveplo, kemijski element
UV	ultravijolična svetloba
VNT	virus nevtralizacijski test
χ^2	hi-kvadrat test

UPORABNOST NEKATERIH VIROLOŠKIH METOD V DIAGNOSTIKI INFEKCIOSNE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI (IHN) TER MOLEKULARNA OPREDELITEV SLOVENSКИH IZOLATOV VIRUSA IHN

Izveček

Ključne besede: Ribe; bolezni – virologija; Rhabdoviridae infekcije – virologija – diagnostika; virus infekciozne hematopoetske nekroze postrvi – izolacija in čiščenje – genetika – patogenost; reverzna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo – metode; celična kultura; biološki poskus; filogenija; postrvi

Infekciozna hematopoetska nekroza postrvi (IHN) je akutna virusna bolezen salmonidnih vrst rib. Dovzetnost posameznih vrst postrvi na okužbo z virusom IHN je različna. Najdovzetnejša vrsta pri nas je šarenka (*Oncorhynchus mykiss*), medtem ko na seznamu dovzetnih vrst ni avtohtone vrste, soške postrvi (*Salmo marmoratus*).

Stopnja obolevnosti in smrtnosti rib pri tej bolezni je odvisna od starosti rib, temperature vode, virulence virusa, sekundarnih bakterijskih okužb in nenazadnje tudi od vzrejnih pogojev. Preživele ribe v visokem odstotku ostajajo prenašalci virusa, v krvi prebolelih rib pa so še leto po okužbi prisotna specifična protitelesa. Rezervoar virusa so prikriti prenašalci virusa pri gojenih ali prostoživečih ribah, pri katerih lahko pride do reaktivacije in izločanja virusa ob spolni zrelosti, v času drsti.

V raziskavi smo z metodo dokazovanja virusa na celični kulturi pregledali 1781 vzorcev rib in pri vzorcih, ki so na celični kulturi EPC povzročili CPE, opravili identifikacijo virusa z imunoperoksidaznim testom. Pri pozitivnih vzorcih smo z metodo RT-PCR uspešno pomnožili tri odseke virusnega genoma (ORF1, ORF4 in ORF5) in v laboratorijsko diagnostiko bolezni uvedli še metodo RT-PCR v realnem času. Občutljivost metode RT-PCR v realnem času smo primerjali z izolacijo virusa na celični kulturi in klasično metodo RT-PCR. Metode so se izkazale za enako občutljive in zanesljive.

S filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij genskega odseka ORF4 smo ugotovili homogenost med slovenskimi izolati virusa IHN. Ugotovili smo, da so vsi slovenski izolati virusa IHN uvrščeni v gensko skupino M. Znotraj genske skupine M, ki jo delimo na dve genski podskupini, M-Eur-1 in M-Eur-2, so slovenski virusni izolati razporejeni neodvisno.

S testom virusne nevtralizacije smo pregledali 197 serumskih vzorcev šarenk. Uporabili smo ga kot presejalno metodo za dokaz okužbe z virusom IHN v obdobju, ko bolezen klinično ni bila več zaznavna (pri temperaturi vodotoka nad 18 °C).

V biološkem poskusu smo proučevali občutljivost šarenke in soške postrvi pri eksperimentalni okužbi z virusom IHN. Vzorce poginjenih in žrtvovanih testnih skupin šarenk in soških postrvi smo pregledali z metodo izolacije virusa na celični kulturi in metodo RT-PCR. Rezultate smo statistično ovrednotili. Domnevo, da je soška postrv odpornejša na okužbo z virusom IHN in klinično ne zboli, smo dokazali tudi z negativnim rezultatom imunohistološke preiskave organov rib v poskusu. Z modificirano metodo objavljene tehnike priprave kulture primarnih eksplantov smo pripravili primarno celično kulturo srčnega tkiva šarenke in soške postrvi. Uporabili smo jo kot detekcijski, *in vivo* model, na katerem smo opazovali degenerativne spremembe na celicah po eksperimentalni okužbi z virusom IHN in jih primerjali z degenerativnimi spremembami celičnega sloja celične linije EPC. V primerjavi infektivnosti referenčnega izolata N61 virusa IHN na EPC celični liniji in na primarni kulturi srčnega tkiva smo dokazali večjo občutljivost celic šarenke v primerjavi s celicami soške postrvi. Da se virus IHN razmnožuje tudi v celicah soške postrvi, smo dokazali z imunoperoksidaznim testom.

APPLICATION OF SOME DIAGNOSTIC METHODS FOR INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS VIRUS (IHN) DISEASE AND MOLECULAR DETERMINATION OF SLOVENE IHNV ISOLATES

Abstract

Key words: Fish diseases – virology; Rhabdoviridae infections – diagnosis – virology; infectious hematopoietic necrosis virus – isolation and purification – genetics – pathogenicity; reverse transcriptase polymerase chain reaction – methods; cell culture; biological assay; phylogeny; trout

Infectious hematopoietic necrosis (IHN) is an acute systemic disease of salmonid fish species. The susceptibility of salmonid fish to IHN virus (IHNV) infection varies.

Several species of *Salmo* have shown different levels of susceptibility to IHNV infection and disease. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is thought to be the most susceptible fish species to infection in geographical range of Slovenia. Marble trout (*Salmo marmoratus*) has not been listed as a susceptible species to IHNV infection.

Morbidity and mortality of fish has been found to vary with age, species, water temperature, virulence of a pathogen, subsequent bacterial infections and breeding conditions in hatchery. The survivor fish frequently become lifelong carriers of infection. In neutralizing antibodies to virus IHN in the fish from such population a year of post-infection can be detected.

Reservoirs of IHNV are clinically infected fish and covert carriers among cultured or wild fish. IHNV may be entering a latent state and virus reactivation occurs only as fish mature sexually, until spawning.

1781 samples of visceral organs and samples of ovarian and seminal fluids were examined using method of virus isolation in cell culture. When CPE occurred, confirmatory identification by use of immunoperoxidase assay was achieved.

For positive samples, RT-PCR as confirmatory method was used and successful determination of nucleotide sequences of the ORF1, ORF4 and ORF5 was done. As laboratory diagnostic method, a real-time RT-PCR method was introduced. Sensitivity comparison of real-time RT-PCR and virus isolation and RT-PCR was done. Similar sensitivity and reliability using described methods were obtained.

Phylogenetic analysis of the ORF4 genome region showed that all Slovene isolates were homogenous. Their evolution correlates with the time and their geographical site of isolation.

All Slovene IHNV isolates cluster together with other European IHNV isolates in two subgroups (M-Eur1 and M-Eur2) within genogroup M, independently.

Using the virus neutralisation test as a reliable diagnostic tool for the assessment of health status of fish population, we examined 197 serum samples. The utility of virus neutralisation test supports this technique as a screening method in case when clinical signs of disease were no longer detectable (water temperatures above 18 °C).

In the biological experiment, sensitivity of rainbow trout and marble trout to an experimental IHNV infection was studied. Samples of dead and sacrificed fish populations tested were examined by the method of virus isolation in cell culture followed by the RT-PCR method.

Results for both methods were compared. The assumption that marble trout is resistant to IHN virus infection and lacks clinical signs of IHN disease was also proved by a negative immunohistochemical reaction for virus antigen.

Primary cell culture of rainbow trout and marble trout cardiac tissue was obtained using modified direct explant technique. The cell culture was used as a detection, *in vivo* model. The investigation of degenerative changes in primary culture cells after experimental infection with IHN virus in connection with degenerative changes in the cell layer of the EPC cell line was done. We demonstrated increased sensitivity of rainbow trout cells compared with marble trout cells when the comparison of the reference isolate N61 infectivity in the EPC cell line and primary culture of cardiac tissue was done. That IHN virus replicates in the cells of the marble trout, we demonstrated by immunoperoxidase assay.

1 UVOD

Akvakulturo lahko opredelimo kot znanost, posel in navsezadnje kot umetnost, ki ji je osnovna dejavnost gojenje in izlov morskih in sladkovodnih rib ter školjk za prehrano pod bolj ali manj nadzorovanimi pogoji. Ekstenzivna akvakultura, vzreja in predvsem intenzivno ribogojstvo v sladkih vodah so se v zadnjih tridesetih letih močno razmahnila predvsem zaradi potreb prehranske industrije in zaradi znatnega zmanjšanja prostoživečih, divjih populacij rib. Izmed evropskih držav v ribogojstvu prednjačijo Norveška, Francija, Španija in Italija, medtem ko so izmed neevropskih držav vodilne Kitajska, Tajska, Indonezija in Južna Amerika (Hill, 2005). Osnovna zahteva pri vseh dejavnostih v akvakulturi je zdravje rib. To je pomembno ne samo zaradi velikih ekonomskih izgub, ki lahko nastanejo ob izbruhih bolezni, ampak predvsem zaradi nadzora nad boleznijo in osnovno higieno, ki sta obvezna vidika vseh dejavnosti v ribogojstvu (González Laxe, 2004). Brez dvoma je za dober zdravstveni status akvakulture potrebno konstantno raziskovanje in nadgrajevanje znanja ter konstanten razvoj. Potrebni so tudi ustrezni mehanizmi nadzora, ki so rezultat dela in strokovne usposobljenosti osebja, njegove organiziranosti, vse pa je povezano z visokimi stroški. Dosledno spremljanje zdravstvenega stanja akvakulture je bistveno za učinkovito preprečevanje novih okužb in pri zmanjševanju smrtnosti okužene jate ob izbruhu bolezni.

Virusne bolezni povzročajo v ribogojstvu veliko ekonomsko škodo (OIE, 2009).

Infekcijska hematopoetska nekroza postrvi (IHN, angl. *Infectious haematopoietic necrosis*) je akutna virusna bolezen salmonidnih vrst rib, ki v okviru Pravilnika o boleznih živali, spada med obvezno mednarodno prijavljive bolezni (Uradni list RS, št.81/2007).

Občutljivost posameznih vrst postrvi na okužbo z virusom IHN je različna. IHN se pojavlja predvsem pri šarenkah, atlantskem lososu in pacifiških lososih.

Bolezen je bila najprej ugotovljena med divjimi anadromnimi salmonidi na zahodni obali Severne Amerike, kjer je danes enzootsko razširjena, od tam pa se je najverjetneje s prometom okuženih iker in rib razširila na Japonsko in v Evropo (Winton, 1991). Na podlagi dosedanjih podatkov je IHN zelo razširjena tudi v Sloveniji. Prvi primer virusa IHN v Sloveniji so leta 1993 dokazali v Italiji, ker v Sloveniji še nismo imeli vpeljanih diagnostičnih metod dokaza virusa IHN. V našem laboratoriju smo virus IHN prvič dokazali leta 1996 (Jenčič in Hostnik, 1998).

V našem geografskem področju najdovzetnejšo vrsto za okužbo predstavlja šarenka, medtem ko na seznamu dovzetnih vrst ni avtohtone vrste, soške postrvi.

Kako se je virus IHN vnesel na geografsko področje Slovenije, danes še ni pojasnjeno. Najverjetneje so virus v Slovenijo vnesli leta 1993, ko je zaradi hude suše primanjkovalo mladice in konzumnih rib (Seničar, 2002). Takrat se je promet s šarenko, vrsto ribe, ki ji je kvaliteta hitri prirast (Povž in Sket, 1990), močno povečal in veliko pošiljk je bilo pripeljanih iz sosednjih držav (Seničar, 2000).

Veliko podatkov, ki temeljijo zgolj na ustnem izročilu in jih uradno ni bilo moč potrditi, opisuje nekontrolirano trgovanje z ribami iz rej nepreverjenega epizootiološkega statusa. Glede na opravljene ankete med ribogojci jih je veliko domnevalo, da so virus v rejo vnesli z vlaganjem z virusom IHN okuženih mladice ali konzumnih rib. Težavo so predstavljali predvsem manjši ribogojci. Zaradi pomanjkanja rib za prodajo so le-te nabavljali pri najugodnejšem ponudniku, ne glede na zdravstveni status ribogojnice. Ribe iz reje z zdravstvenimi težavami so imele prav zaradi slabše kondicije toliko nižjo prodajno ceno.

Pri ribah v okviru letne Odredbe o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali spremljamo stanje bolezni IHN in izvajamo preventivne ukrepe. Ti ukrepi se nanašajo zgolj na plemenske jate postrvi in lipanov in na ribogojnice, ki se ukvarjajo s trgovanjem iker. Dolžnost vsakega nosilca dejavnosti je, da vsak povečan pogin ali kakršno koli odstopanje, ki kaže na morebitno prisotnost bolezni v ribogojnici, nemudoma javi strokovnemu delavcu Nacionalnega veterinarskega inštituta (NVI) ali pristojnemu Območnemu uradu VURS (OU VURS).

Družino *Rhabdoviridae*, v katero uvrščamo virus IHN, sestavljajo štirje rodovi. Virus IHN pripada rodu *Novirhabdovirus* (Leong in Kurath, 2001).

Bolezen IHN se klinično izraža predvsem pri zarodu, mladica in enoletnicah, ko je temperatura vode med 8 °C in 15 °C. Stopnja obolevnosti in smrtnost rib pri tej bolezni sta odvisni od starosti rib, temperature vode, virulence virusa, sekundarnih bakterijskih okužb in ne nazadnje tudi od vzrejnih pogojev. V akutni fazi bolezni je lahko smrtnost pri mladica in dovoljenih vrst rib tudi 100-odstotna, pri odraslih ribah pa od 30- do 70-odstotna. Preživele ribe v visokem odstotku ostajajo nosilke virusa, v krvi prebolelih rib pa lahko dokažemo specifična protitelesa, ki jih lahko zaznamo od 3 do 6 tednov po okužbi in so lahko v krvi prisotna do 12 mesecev (Fregeneda-Grandes in Olesen, 2007; Vestergaard Jorgensen in sod., 1991; OIE, 2009). Oshima je s sodelavci (1996) v svojem raziskovalnem delu dokazal prenos imunosti s plemke na njen zarod, saj je bil po eksperimentalni izpostavitvi okužbe z virusom IHN odstotek preživetja tega zaroda mnogo večji.

Bolezen se prvenstveno prenaša horizontalno, torej z bolnimi in poginulimi ribami, z vodo, v kateri živijo te ribe, z ribojedimi ptiči in drugimi vretenčarji, ki pridejo v stik z bolnimi ribami, ter z opremo in priborom iz okužene ribogojnice (Bootland in Leong, 1999; Jenčič in sod., 2002). Poleg horizontalnega širjenja okužbe z virusom IHN je pomemben tudi vertikalni način širjenja virusa, z okuženih plemenk na zarod, a ga je težko dokazati (Mulcahy in Pasho, 1985), površinsko razkuževanje iker z jodovimi pripravki pa vertikalnega načina širjenja bolezni ne more povsem preprečiti (OIE, 2009). Rezervoar virusa so klinično bolne ribe in prikriti nosilci virusa pri gojenih ali prostoživečih ribah, pri katerih ostane virus latenten do spolne zrelosti in do priprave na drst. Po podatkih v literaturi je mogoče virus izolirati le v času klinične manifestacije bolezni in v času drsti pri ribah, ki so okužbo z virusom IHN preživele. Tej trditvi v prid govorita dve teoriji. Prva zagovarja dejstvo, da virus po klinični manifestaciji bolezni pri preživelih ribah preide v latentno fazo in ga je mogoče dokazati ponovno v času spolne zrelosti, ob drsti (Amend, 1975), ko stres oslabi imunski sistem rib in povzroči reaktivacijo virusa IHN (Mulcahy in sod., 1984). Druga teorija zagovarja dejstvo, da se ob koncu bolezni iz preživelih rib virus izloči na drstiščih. Te se ob vrnitvi na drstišča ponovno reinficirajo (Bootland in Leong, 1999).

V času infekcije se virus namnoži v ledvicah, vranici, možganih in prebavnem traktu, najbolj prizadete pa so ledvice in vranica, kjer najdemo nekrotične spremembe (OIE, 2009).

Bolezen je klinično zaznavna, ko se virus namnoži v endotelnih celicah krvnih kapilar, hematopoetskem tkivu in ledvičnih celicah, kar vodi v pojav edemov in hemoragij, značilnih za to bolezen (Bootland in Leong, 1999).

1.1 CILJI DOKTORSKE NALOGE

Pričakujemo, da bomo na podlagi rezultatov opravljenih preiskav dobili pregled nad razširjenostjo okužb z virusom IHN v obdobju med letoma 1997 in 2010, na osnovi opravljenih molekularnih preiskav pa pregled nad izolati virusa IHN, ki so prisotni na področju Slovenije. Genetske značilnosti izolatov virusa IHN bomo med seboj primerjali. V primerjavo bomo vključili tudi izolate iz drugih evropskih držav.

V raziskavi bomo v obdobju 2005–2010 z metodo dokazovanja virusa na celični kulturi pregledali večje število vzorcev. Pri vzorcih, ki bodo na celični kulturi EPC povzročili CPE, bomo opravili identifikacijo virusa z imunoperoksidaznim testom.

V predlagano doktorsko nalogo bomo vključili tudi izolate virusa IHN, izolirane v Sloveniji v letih 1997–2004. Z molekularnimi metodami bomo vse vzorce rib, pri katerih se je v testu izolacije virusa na celični kulturi na občutljivi celični liniji pojavil CPE, preiskali na prisotnost virusne nukleinske kisline. Dokazovali jo bomo s pomnoževanjem treh odsekov virusnega genoma (ORF1, ORF4 in ORF5), dobljenim produktom bomo določili nukleotidna zaporedja. Zaporedja bomo med seboj primerjali. V primerjavo bomo vključili tudi nukleotidna zaporedja virusnih izolatov IHN iz drugih držav, ki jih bomo poiskali v podatkovni zbirki nukleotidnih zaporedij GeneBank.

Študije posameznih izbruhov bolezni IHN na molekularnem nivoju, ki so jih opravili v Severni Ameriki, so pokazale na velike evolucijske spremembe virusa IHN. S sekvenčno analizo variabilne regije znotraj gena G (v nadaljevanju mid-G regija) so virusne izolate razvrstili v 3 glavne genske skupine, ki so jih označili z U (angl. *upper*), M (angl. *middle*) in L (angl. *lower*) in ki sovpadajo z njihovim geografskim položajem v Severni Ameriki (Kurath in sod., 2003). V dosedanjih raziskavah so ugotovili, da so vsi evropski izolati virusa IHN uvrščeni v gensko skupino M. Znotraj te skupine so virusni izolati uvrščeni glede na njihov izvor na dve genski podskupini, M-Eur-1 in M-Eur-2. V M-Eur1 so uvrščeni izolati virusa, ki naj bi izhajali iz Francije, v M-Eur-2 pa virusni izolati, ki izvirajo iz Italije (Enzmann in sod., 2005).

S filogenetsko analizo dobljenih nukleotidnih zaporedij bomo ugotavljali genetsko heterogenost virusnih izolatov in evolucijsko povezanost med geografsko in časovno oddaljenimi sevi.

Filogenetska analiza predstavlja nepogrešljivo molekularno-epidemiološko orodje vsakega sodobnega virološkega laboratorija, s katerim lahko izsledimo izvor povzročitelja bolezni in ugotovimo razsežnost okužbe na globalni ravni.

V raziskavi bomo primerjali zanesljivost in učinkovitost metode dokazovanja virusa IHN na celični kulturi in metode reverzne transkripcije z verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR; angl. *reverse transcription – polymerase chain reaction*). Razvili bomo tudi metodo RT-PCR v realnem času, ki je bolj občutljiva kot starejše izvedbe metod na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR; angl. *polymerase chain reaction*) in nam omogoča hitro obdelavo velikega števila vzorcev. Metoda izolacije virusa na celični kulturi še vedno velja za »zlati standard« med laboratorijskimi metodami za dokazovanje živega infektivnega virusa, vendar pa so vzorci, ki do prihoda v laboratorij niso bili pravilno hranjeni, lahko toksični za celično kulturo in zato neprimerni za preiskavo. V takih primerih je metoda RT-PCR bolj zanesljiva in tudi

veliko hitrejša, saj lahko virusno nukleinsko kislino dokažemo že v nekaj urah. Z načrtovano nalogo bomo tako poskušali potrditi pomen molekularne diagnostike, ki je postala nepogrešljiva pri dokazovanju okužb z virusom IHN.

V diagnostiko bolezni IHN bomo uvedli test virusne nevtralizacije in z njim poskušali določiti titer protiteles v serumskih vzorcih rib. Predpostavljamo, da je test virusne nevtralizacije primeren za spremljanje okužbe z virusom IHN v posamezni jati rib in bi ga lahko uporabili kot presejalno metodo za dokaz okužbe z virusom IHN v obdobju, ko bolezen klinično ni več zaznavna (pri temperaturi nad 18 °C).

Doslej je bila v literaturi objavljena le ena preliminarna študija o občutljivosti soške postrvi (*Salmo marmoratus*) za okužbo z virusom IHN in virusom, ki povzroča virusno hemoragično septicemijo (VHS) (Borghesan in sod., 2004).

Na osnovi rezultatov avtorji poročajo, da je soška postrv odpornejša na okužbo z virusom VHS, zelo malo pa je podatkov o dovzetnosti te vrste na okužbo z virusom IHN (Borghesan in sod., 2004). V biološkem poskusu, ki ga bomo v okviru našega dela opravili, bomo proučevali občutljivost šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) in soške postrvi po eksperimentalni okužbi z virusom IHN.

Vzorci poginjenih in žrtvovanih testnih skupin šarenk in soških postrvi bomo pregledali z metodo izolacije virusa na celični kulturi in metodo RT-PCR. Rezultate bomo statistično ovrednotili in pri obeh metodah dokaza virusa IHN ugotavljali, ali obstaja statistično značilna povezanost med vrsto rib in občutljivostjo rib na okužbo z virusom IHN.

Potrditi želimo domnevo, da je soška postrv odpornejša na okužbo z virusom IHN in klinično ne zboli, lahko pa po okužbi z virusom IHN ostane prikriti prenašalec virusa in tako v naravi predstavlja nevarnost za širjenje virusa IHN v okolje. Domnevo, da je soška postrv odpornejša na okužbo z virusom IHN in klinično ne zboli, bomo poskušali dokazati tudi z imunohistokemično reakcijo na virusni antigen.

Predvidevamo, da primarna celična kultura kot laboratorijski model zelo dobro ponazarja dejansko stanje, funkcije in zveze med celicami v organizmu. Zato bomo z modificirano metodo objavljene tehnike priprave kulture primarnih eksplantov pripravili primarno celično kulturo srčnega tkiva šarenke in soške postrvi. Uporabili jo bomo kot detekcijski *in vivo* model, na katerem bomo opazovali degenerativne spremembe na celicah po eksperimentalni okužbi z virusom IHN in jih primerjali z degenerativnimi spremembami celičnega sloja celične linije EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*). V ta namen bomo primerjali infektivnost referenčnega izolata N61 virusa IHN na celični liniji EPC in na primarni kulturi srčnega tkiva.

Opravili bomo imunoperoksidazni test, s katerim bomo potrdili našo domnevo, da se virus IHN razmnožuje tudi v celicah soške postrvi.

1.2 HIPOTEZE

V raziskavi bomo preverjali naslednje delovne hipoteze:

1. Slovenski izolati virusa IHN so genetsko homogeni.
2. Sorodnost med posameznimi izolati virusa IHN je povezana s prometom rib in iker med posameznimi ribogojnicami.
3. Metoda RT-PCR v realnem času je bolj občutljiva kot metoda izolacije virusa na celični kulturi.
4. Prisotnost okužbe z virusom IHN v določeni jati rib je mogoče dokazati tudi s serološkimi preiskavami (test virusne nevtralizacije) in ne le z virološkimi.
5. Soška postrv je odpornejša na okužbo z virusom IHN v primerjavi s šarenko in je lahko prenašalec virusne okužbe.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 EVOLUCIJA RIB

Ribe predstavljajo heterogeno zbirko preko 28.000 identificiranih vrst, torej več kot šteje celotna preostala populacija vretenčarjev skupaj (Nelson, 1994). Živeče ribe delimo v razred hrustančnic (*Chondrichyes*), ki imajo hrustančno ogrodje, in razred kostnic (*Osteichthyes*), ki imajo koščeno ogrodje. Kostnice delimo v dva podrazreda: *Actinopterygii* (žarkoplavutarice), med katere uvrščamo večino rib, in *Sarcopterygii* (mesnatoplavutarice). Prave kostnice, nadred žarkoplavutaric, pa predstavljajo predstavniki nadrazredov *Teleostei* in *Chondrostei*.

Vse naše sladkovodne ribe (izjema so jesetrovke) imajo koščeno ogrodje.

Pri klasifikaciji oziroma uvrščanju rib predstavljajo prednosti kot tudi omejitve njihova sposobnost odražanja drastičnih razlik v obliki telesa, velikosti, načinu življenja in življenjskem prostoru ter fiziološkem odgovoru na številne vplive okolja, v katerem živijo. Filogenijo rib so donedavna razlagali na osnovi pridobljenih podatkov evolucijskih analiz z morfološkega vidika ter z analizo fosilnih primerkov v tako imenovani postgenomski dobi. Z analizo velikega števila vzorcev različnih primerkov in izbiro ustreznih genetskih markerjev so bile opravljene obsežne in večplastne filogenetske analize. Kljub temu da je danes naše znanje o značilnostih in posebnostih genoma pri številnih vrstah rib še vedno pomanjkljivo, pa lahko na osnovi že opravljenih analiz posameznih vrst povzamemo, da je ekološka raznolikost, ki zajema obdobje preko 550 milijonov let, analogna različnosti genoma posamezne vrste. Velikost ribjega genoma variira med 0,32 milijarde in 133 milijardami baznih parov. Genom predstavlja vrstno specifično ogrodje ali snov, ki se v okolju, polnem nenehnih sprememb, odziva zelo fleksibilno, se prilagaja. Primerjalna filogenetska analiza, ki je bila nedavno opravljena na mitohondrijskih sekvencah DNA pri več kot 50 reprezentativnih predstavnikih zelo starih kot tudi filogenetsko mlajših predstavnikih kostnic (Inoue in sod., 2003; Miya in sod., 2003), še vedno ostaja odprta tema, kljub intenzivnemu vzorčenju in natančnosti pri primerjalnih anatomskih in morfoloških študijah.

To hkrati pomeni nezanesljivost informacij, pridobljenih na podlagi opravljenih primerjalnih genskih analizah o vplivu evolucijskih razmerij pri številnih modelnih primerkih rib podrazreda žarkoplavutaric (*Actinopterygii*), ki predstavljajo zelo raznoliko populacijo. Pri razumevanju in razlagi filogenetskih razmerij moramo omeniti tudi interspecifične odnose pri ribah, ki predstavljajo neke vrste sinergijo v filogenetski analizi, opravljeni na osnovi molekularnih in morfoloških podatkov (Miya in sod., 2003).

2.2 SALMONIDNE VRSTE RIB

Salmonidi tvorijo družino *Salmonidae*, za katero je značilno, da imajo vsi njeni predstavniki tolsto plavut ali tolščenko, ki leži med hrbtno in repno plavutjo (Povž in Sket, 1990).

Družino *Salmonidae* sestavljajo tri poddružine, in sicer *Coregoninae* (ozimice), *Thymallinae* (lipani) in *Salmoninae*, ki naseljujejo severno zemeljsko poloblo. Poddružina *Salmoninae* zajema osem priznanih rodov, ki vsebujejo približno 30 vrst. Najbolj znani rodovi so *Hucho* (sulci), *Salvelinus* (zlatovčice), *Oncorhynchus* (paciški lososi in pacifiške postrvi) in *Salmo* (atlantski losos in postrvi), ki so relativno napredni salmonidi. Ostali štirje rodovi *Brachymystax*, *Platysalmo*, *Salmothymus* (mehkoustna postrv) in *Acantholingua* (beluška) so morfološko primitivnejši, zato je njihova uvrstitev v taksonomski sistem precej otežena (Stearley in Smith, 1993; Phillips in Oakley, 1997; cit. v Jug, 2002).

Napredni salmonidi (*Hucho*, *Salvelinus*, *Oncorhynchus* in *Salmo*) tvorijo dve filogenetski liniji. Eno predstavljajo zlatovčice in sulci, drugo pa atlantski in pacifiški lososi ter postrvi. Izraza postrv in losos se ne nanašata na naravni filogenetski skupini, temveč na način življenja posameznih skupin. Postrvi v veliki večini stalno živijo v rekah in sladkovodnih jezerih, lososi pa se selijo v morje. Zato so v rodova *Salmo* in *Oncorhynchus* uvrščeni postrvi kot tudi lososi, v rod *Salmo* postrvi in lososi iz atlantskega in drugih evropskih povodij, v rod *Oncorhynchus* pa postrvi in lososi iz pacifiškega povodja (Stearley in Smith, 1993; cit. v Jug, 2002).

Poudariti je treba, da taksonomija salmonidov še zdaleč ni dorečena in da različni avtorji pogosto navajajo drugačno uvrstitev salmonidov v taksonomski sistem. Kottelat (1997) opisuje kar štirinajst različnih vrst, uvrščenih v rod *Salmo* (Jug, 2002).

2.2.1 Postrvi – *Salmo trutta*, Linnaeus 1758

Za postrvi (*Salmo trutta*), uvrščene v rod *Salmo*, je značilen vretenast, bočno rahlo stisnjen trup. Glava je srednje velika, gobec sega nazaj čez zadnji očesni rob. Pri spolno zrelih samcih je spodnja čeljust kavljasto zakrivljena navzgor. Zobe imajo v čeljustih, na ralniku, jeziku in nebnicah (Povž in Sket, 1990). Zaradi različnega načina življenja se predstavniki te vrste med seboj po videzu precej razlikujejo, vendar bi jih lahko opisali kot sivkastozelene z olivnim, rjavkastim ali črnim odtenkom. Po telesu imajo črne in/ali rdeče svetleje obrobljene pege, ki so različno velike in različno nameščene po telesu. Njihovo število ni stalno, so pa pogostejše na zgornjem delu telesa. Temne pege prevladujejo po hrbtu, rdeče in oranžne pa po pobočnici

in pod njo. Rdeč pigment je lahko viden tudi na tolščeni in škržnem poklopcu (Povž in Sket, 1990).

Naravno naseljitveno področje postrvi zavzema Evrazijo in severno Afriko, razteza se od severne Norveške in Rusije na severu do gorovja Atlas v severni Afriki na jugu in od Islandije na zahodu do Aralskega morja na vzhodu (Bernatchez in sod., 1992; cit. v Jug, 2002). Ljudje so jo kasneje vnesli še v reke najmanj štiriindvajsetih držav Amerike, Avstralije, Afrike in preostalega dela Azije (Laikre in sod., 1999; cit. v Jug, 2002).

Postrvi kažejo izjemno fenotipsko raznolikost, kar povzroča precejšnje težave pri razvrščanju različnih skupin populacij v taksone. V zadnjih dvesto letih so današnjo vrsto *Salmo trutta* opredeljevali z več kot petdesetimi različnimi vrstami. Potočne postrvi lahko glede na njihove ekološke oblike razdelimo na rečno obliko, jezersko obliko in morsko obliko.

Zaradi različnih ekoloških oblik prihaja v slovenskem jeziku do težav pri poimenovanju postrvi. Da bi se izognili težavam, danes za potočne postrvi v širšem pomenu besedne zveze *Salmo trutta* uporabljamo izraz »postrvi«.

Ker so postrvi genetsko ena najbolj deljenih vretenčarskih vrst, jih je Bernatchez s sodelavci (1992, 1995, 2001) razdelil na pet filogenetskih linij, ki se ujemajo z geografskimi oblikami:

- atlantska oblika – zajema populacije atlantskega bazena,
- donavska oblika – zajema populacije bazenov Črnega, Kaspijskega in Aralskega morja,
- sredozemska oblika – zajema populacije zahodnega dela sredozemskega bazena,
- jadranska oblika – zajema populacije vzhodnega dela sredozemskega bazena vključno z jadranskim povodjem,
- oblika *marmoratus* – zajema populacije jadranskega bazena in predstavlja soško postrv (Bernatchez, 2001; cit. v Jug, 2002).

2.2.2 Salmonidne vrste rib v Sloveniji

V Sloveniji živijo skoraj vsi predstavniki družine *Salmonidae*, v podrobnejšem opisu predstavnikov se bomo omejili le na dva predstavnika poddružine *Salmoninae*, in sicer avtohtono donavsko obliko in vneseno atlantsko obliko postrvi.

2.2.2.1 Soška postrv – *Salmo marmoratus*, Cuvier 1817

Soška postrv ali glavatica (tudi jadranska ali marmorirana postrv), slovenski nacionalni ribiški ponos, je svoje znanstveno ime *Salmo trutta marmoratus* dobila po značilnih marogah oziroma marmoriranem vzorcu na koži. Soška postrv je za sulcem največja postrvja vrsta v Evropi. Zraste lahko do 140 cm in tehta nad 25 kg. Je endemična riba jadranskega porečja in obenem tudi ena njegovih najbolj ogroženih sladkovodnih rib.

Ogrožene vrste postrvi v Evropi so navedeni v seznamu ogroženih živali, imenovanem Rdeči seznam IUCN 1996 (The World Conservation Union). V njem je kot ogrožena vpisana tudi soška postrv iz slovenskega območja. Iz našega območja sta na Rdeči seznam uvrščeni še dve donavski obliki postrvi, in sicer *Salmo trutta* forma *fario* kot občutljiva in *Salmo trutta* forma *lacustris* kot ogrožena (Laikre in sod., 1999).

Predstavniki vrste *Salmo marmoratus* imajo valjasto, bočno rahlo stisnjeno telo. V gobcu imajo v čeljustih številne zobe, od postrvi se razlikujejo po številu in namestitvi zob na ralniku. Tudi pri njih imajo spolno zreli samci zakrivljeno spodnjo čeljust. Soške postrvi so precej večje in težje od postrvi in imajo izrazit marmoriran vzorec. Njihova osnovna barva je olivno rjava ali olivno zelena, preko katere se razpreda temnejši marmoriran vzorec v olivno zeleni in bakreni barvi. Marmoriranost velikokrat sega pod pobočnico, trebuh pa je vedno belkast ali rumenkast. Na hrbtni plavuti so temne pike, ostale so enobarvne, sivkasto zelene ali rjave. Tolščenska je rjavkasta in pogosto ima na zgornjem robu rdečo liso (Povž in sod., 1996).



Slika 2-1: Soška postrv (<http://www.ribiska-druzina-tolmin.si/ribe.php>).

Za nekatere avtorje je znak čistosti soške postrvi popolna odsotnost rdečega pigmenta (Giuffra in sod., 1994), drugi pa dopuščajo prisotnost rdečih pik na pobočnici (Povž in sod., 1996; Berrebi in sod., 2000). Živi v vodah jadranskega porečja in je razširjena od Italije do Albanije. Najštevilnejša je v Soči in njenih pritokih ter v severnoitalijanskih rekah, ki se izlivajo v Jadransko morje.

V Sloveniji je soška postrv prvotno živela v Soči in njenih pritokih, Nadiži, Notranjski reki in Rižani. V Notranjski reki je izginila zaradi onesnaženja, v Rižani pa zaradi odvzema vode, onesnaženja in vlaganja drugih postrvi. V potokih se ne zadržuje.

Soška postrv je bila verjetno edina postrv v Soči in njenih pritokih do leta 1906, ko so začeli vlagati donavske in atlantske oblike postrvi. Vnesene ribe so izvirale iz rek v Bosni in Hercegovini, Italiji, na Danskem in iz slovenskih rek donavskega porečja (Povž in sod., 1996).

Nekateri avtorji jo uvrščajo v sistem kot vrsto *Salmo marmoratus*, drugi pa kot podvrsto potočne postrvi *Salmo trutta* f. *marmoratus* (Skaala in Solberg, 1997). Danes soško postrv poimenujemo kot samostojno vrsto, kot je bilo poimenovanje *Salmo marmoratus* tudi najprej opisano (Cuvier, 1817) in se kasneje ni uradno spremenilo.

Poleg onesnaženosti in regulacije vodotokov v širšem pomenu, ki ogrožajo živalstvo in rastlinstvo nasploh, je populacijo soške postrvi najbolj prizadelo nepretrgano in množično naseljevanje sorodne potočnice (*Salmo trutta* m. *fario*) od začetka dvajsetega stoletja dalje. Najbolj nazoren prikaz sinergije takega delovanja in hkrati tudi prvi in najboljši primer njenega reševanja je prav reka Soča. Največje naseljevanje je potekalo po prvi svetovni vojni, med katero se je zaradi podvodnih eksplozij granat in pretiranega izlova na drstiščih močno zmanjšala ribja populacija. Po vojni so ribiči, da bi nadomestili izgubo ribjega bogastva, pol

stoletja, leto za letom vlagali v Sočo potočno postrv, ne da bi se zavedali posledic, ki jih bo utrpela že močno prizadeta avtohtona vrsta. Vlaganje rib, gojenih v ribogojnicah ali prinešenih iz drugih lokacij, namreč povzroča izginjanje genov, značilnih za divjo populacijo (Laikre in sod., 1999). Potočna postrv, ki prej nikoli ni živela v povodju Jadrana, se je na novo okolje odlično prilagodila in se s soško postrvjo uspešno križala. To pa je bilo za slednjo skoraj pogubno. Njuni potomci, katerih barvitost in vzorec pigmentacije sta zelo različna, so namreč plodni in s tem soško postrv počasi, a vztrajno izrivajo. Raziskave ob koncu prejšnjega stoletja so pokazale, da so čiste linije marmorirane postrvi skoraj povsem izginile, našli so jih le v nekaj pritokih reke Soče, ki so bile z naravnimi skalnatimi zaprekami ločene od matične reke in s tem fizično zaščitene pred tujerodno vrsto (Jug in sod., 2002). Ribiške družine v Posočju in ribiška stroka sta skupaj z Zavodom za ribištvo Ljubljana in tujimi strokovnjaki iz Francije s projektom revitalizacije soške postrvi (Crivelli in sod., 2000) v Sloveniji od leta 1993 pa do danes popolnoma obnovili populacijo soške postrvi v zgornjem delu reke Soče. Z vzrejo plemenskih jat genetsko čistih soških postrvi v ribogojnicah omogočajo proizvodnjo zadostnega števila zaroda in mladice te endemične vrste, kar bo zadostilo potrebam repopulacijskega poribljanja soškega porečja. To bo ob hkratni prepovedi vnašanja neavtohtone potočne postrvi v Sočo in njene pritoke zmanjšalo ogroženost soške postrvi in povečalo njeno populacijo, saj značilna nizka genetska variabilnost že sama po sebi predstavlja nevarnost za viabilnost potomstva te vrste (Fumagalli in sod., 2002).

2.2.2.2 Šarenka ali ameriška postrv (*Oncorhynchus mykiss*, tudi *Salmo gairdneri* Richardson, 1836)

Šarenka je avtohtona vrsta na področju Severne Amerike, kjer živi v rekah, ki se izlivajo v Tihi ocean. V Evropo so jo vnesli okoli leta 1880 iz Kalifornije in se je do danes razširila po vseh evropskih porečjih. Tudi v Sloveniji naseljuje skoraj vse vodotoke. Njeno populacijo umetno vzdržujejo ribiči, ki jo vlagajo za športni ribolov. V svoji domovini v Severni Ameriki, kjer živi v jezerih zahodno od Skalnega gorovja in v rekah, ki se izlivajo v Tihi ocean, se v času drsti seli iz morja v sladke vode ali pa preživi vse življenje v sladkih vodah. Pri nas se ne seli in vse življenje ostane tam, kjer se naravno razmnožuje.

Po obliki je podobna potočni postrvi, ki ima značilno oblikovano vretenasto, bočno rahlo stisnjeno telo, srednje veliko glavo s končnimi usti. Močne zobe ima na ralniku, v čeljustih, na jeziku in na nebnicah. Hrbet je temnejši, sivo do rjavo zelenkast, boki svetlejši, trebuh pa

svetlo siv do belkast. vzdolž pobočnice poteka od glave do repa rdeča proga, ki postane ob drsti izrazito mavrično obarvana, zato jo imenujejo tudi mavrična postrv. Po vsem trupu in po plavutih ima posejane drobne črne pege.



Slika 2-2: Šarenka (<http://www.ribiska-druzina-tolmin.si/ribe.php>).

Spolno dozori v drugem do tretjem letu starosti. Drsti se od februarja do aprila, v ribogojnicah pa že decembra ali celo prej. Samica odloži od 1600 do 2000 iker na kilogram telesne teže. Ikre so velike, v premeru merijo okoli 4,5 mm. V področju ameriškega severozahoda se plemenke selijo na drst v morja, pri nas pa živi šarenka le v sladkih vodah.

Zaradi hitre rasti je gospodarsko najpomembnejša riba, ki jo intenzivno vzrejujejo po vsej Sloveniji. Za športni ribolov je zanimiva zaradi svoje požrešnosti, saj prijema ob vseh delih dneva in ni izbirčna pri vabi (Povž in Sket, 1990). Je močan tekmelec lipanu in potočni postrvi, ker zaseda njuna drstišča in prehranjevalne niše (Povž in sod, 1998).

2.3 ZGODOVINSKI PREGLED RAZISKAV INFEKCIOZNE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI (IHN)

IHN je akutno sistemsko virusno obolenje, ki se pojavlja pri prostoživečih, še pogosteje pa pri mladih postrveh in pacifiških lososih v intenzivni vzreji v priobalnem pasu severozahodne Amerike, v Kanadi in na Japonskem. IHN se je prvotno pojavila pri rdečih lososih (*Oncorhynchus nerka*), gojenih v plavajočih kletkah na zahodni obali Severne Amerike. Obstajajo tudi zapisi o izbruhih bolezni pri prostoživečih, divjih populacijah rib. Prvi zapisi o tej resni epizootiji, ki se nanašajo na IHN, so bili zapisani v poznih štiridesetih in petdesetih letih prejšnjega stoletja (Rucker in sod., 1953). Poročali so o stoodstotnih izgubah pri prizadeti populaciji rib (Wolf, 1988).

Leta 1953 so objavili prvo poročilo o virusni bolezni, ki se je pojavila pri rdečem ali pacifiškem lososu v ribogojnicah Winthrop in Leavenworth v zvezni državi Washington (Rucker in sod., 1953). Da je to bolezen z virusno etiologijo, je dokazal Watson (1954), ko je v poskusu s filtratom homogeniziranih organov bolnih rib okužil dovzetno populacijo rib, povzročitelj obolenja pa je bil odporen tudi na terapijo z antibiotiki. Žal danes več ne razpolagamo z izvirnim materialom, saj so omenjeni virusni izolat zavrgli.

Leta 1958 so poročali o izbruhu bolezni s podobnimi kliničnimi znaki in visoko stopnjo smrtnosti pri mladiceh rdečega lososa v ribogojnici Willamette River Salmon Hatchery v zvezni državi Oregon (Wingfield in sod., 1969). Virus so osamili iz organov obolelih rib, opravljena je bila fizikalno-kemijska karakterizacija izolata (Wingfield, 1968).

V letu 1958 se je v eni izmed kalifornijskih ribogojnic pojavila okužba pri zarodu kraljevega lososa (*Oncorhynchus tshawytscha*). Nekaj mesecev kasneje so poročali še o enem izbruhu bolezni, in sicer v ribogojnici Sacramento River Hatchery v Kaliforniji (Ross in sod., 1960; Parisot in Pelnar, 1962). Bolezen so poimenovali »Sacramento River Chinook Disease«, po gostiteljski vrsti rib in po mestu, kjer so virus dokazali. Pri tej virusni bolezni je bila naravna gostiteljska vrsta rib rdeči losos. Za okužbo s filtratom homogeniziranih organov okuženih rib sta bila dovzetna tudi prvotno zdrava kraljevi losos in klarkov losos, ki sta se z njim kasneje tudi okužila (*Oncorhynchus clarkii*) (Wingfield in Chan, 1970).

Leta 1967 so v Britanski Kolumbiji v Kanadi izolirali dva identična virusa pri šarenki (*Oncorhynchus mykiss*) in rdečem lososu (Amend in sod., 1969). Zaradi značilne in izrazite nekroze hematopoetskega tkiva ledvic in vranice, ki ga virus povzroča, je Amend s sodelavci (1969) bolezen poimenoval »infekcijska hematopoetska nekroza«. Amend in Chambers (1970) sta leto kasneje predlagala, da bi vse do tedaj dokazane viruse »British Columbia Virus«, »Oregon sockeye salmon virus« in virus »Sacramento River chinook disease« poimenovali s skupnim imenom »virus infekcijske hematopoetske nekroze« (IHNV). Predlog je temeljil na dejstvu, da so bili vsi trije virusi, ki so jih določili z elektronsko mikroskopijo, strukturno enaki, podobnih dimenzij, vsi trije so na celični kulturi tudi povzročali podobne citopatske spremembe.

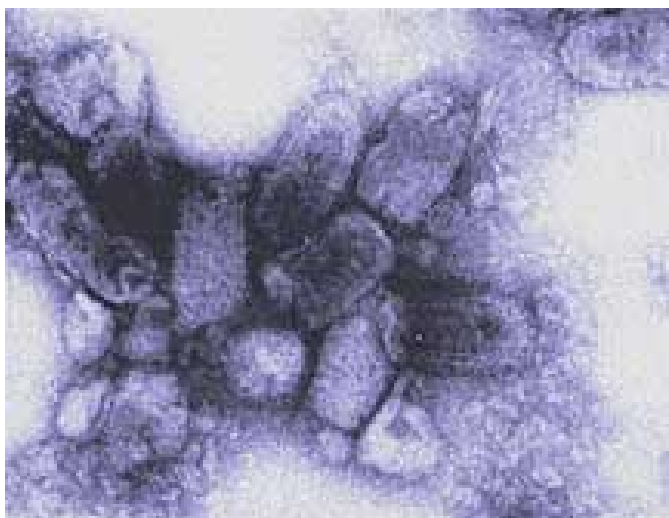
2.4 VIRUS INFEKCIJSKE HEMATOPOETSKE NEKROZE POSTRVI

2.4.1 Taksonomska uvrstitev

Družino *Rhabdoviridae* sestavlja več rodov virusov, ki jim je skupna baciliformna oblika patogena. Spadajo med najbolj razširjene viruse v naravi. Okužbe s predstavniki rabdovirusov lahko najdemo tako pri vretenčarjih kot nevretenčarjih in tudi pri rastlinah. Predstavnike družine so do pred kratkim uvrščali v 5 rodov (*Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, *Ephemerovirus*, *Cytorhabdovirus* in *Nucleorhabdovirus*), v Sedmem poročilu mednarodnega združenja za taksonomijo virusov pa so na listo dodali še rod *Novirhabdovirus*. Številni virusi ostajajo predvsem zaradi njihove antigenske različnosti taksonomsko neuvrščeni. To so virus Gossas, virus Klamath, virus Navarro in ribji rabdovirusi, o katerih je, razen virusov pri ribah, znanega zelo malo (De Bishnu in Banerjee, 1999). Medtem ko lahko sesalske in ptičje rabdoviruse gojimo v laboratoriju na najpogostejše uporabljenih celičnih linijah, kot sta BHK-21 (angl. *Syrian hamster kidney fibroblast*) in celice Vero (angl. *African green monkey kidney cells*), ribje rabdoviruse gojimo na celičnih linijah ribjega izvora, kot je na primer EPC (Fijan in sod., 1983).

Rabdovirusi, ki so patogeni za ribje vrste, so zanimivi predvsem zaradi različnosti habitatov, v katerih živijo za virus dovzetne, torej gostiteljske vrste rib. Gostiteljske vrste so zelo različne: lososi, postrvi, trske, krapji, ščuka, ostriži in še mnoge druge. Sprva so predstavnike ribjih rabdovirusov delili v pet različnih elektroferotipov na osnovi razlik v molekularni teži G in N proteinov (Hsu in sod., 1986). Spoznali so, da je taka uvrstitev neustrezna in so v Šestem poročilu mednarodnega združenja za taksonomijo virusov (ICTV, angl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) omenjene viruse uvrstili v dve kategoriji: v prvi kategoriji so bili taksonomsko neuvrščeni virusi (znani kot predstavniki rodu *Lyssavirus*), v drugo kategorijo pa so bili uvrščeni »vesiculo-like« oziroma virusi, podobni vezikulovirusom, znani kot predstavniki rodu *Vesiculovirus*. Navedeni predstavniki taksonomsko neuvrščenih ribjih rabdovirusov so bili v poročilu virus IHN, virus VHS in rabdovirus hirame (HIRRV), predstavniki vezikulovirusom podobnim ribjih rabdovirusov pa virus spomladanske viremije krapov (SVCV) in rabdovirus, ki povzroča velike izgube pri zarodu ščuke (PFV, angl. *pike fry rhabdovirus*). Zasledili smo lahko tudi neuradno klasifikacijo virusov, ki je temeljila na vrsti gostitelja, v tem primeru gre za salmonidne vrste (IHNV, VHSV) ali nesalmonidne vrste virusov (SVCV, PFV). Vsi naštetih virusi pomenijo resno grožnjo in velik ekonomski problem

predvsem zaradi hitrega napredovanja in širjenja bolezni ter visoke smrtnosti (De Bishnu in Banerjee, 1999).



Slika 2-3: Posnetek virionov IHN z EM.
(http://www.research.noaa.gov/spotlite/archive/spot_fishvaccine.html)

Raziskovalci in znanstveniki iz številnih laboratorijev so si bili sprva edini pri imenovanju omenjenih povzročiteljev bolezni in so predlagali ime *Aquarhabdovirus*, kar sovпада z njihovim izvorom oziroma gostiteljskimi vrstami. To je bila tudi edina razlika med njimi in drugimi rabdovirusi, ki jih lahko identificiramo pri sesalcih. V Sedmem poročilu mednarodnega združenja za taksonomijo virusov (Walker in sod., 2000) so odločili, da je zaradi prisotnosti gena NV najustrežnejše poimenovanje roda *Novirhabdovirus*. Predpona novi- je akronim, ki sestoji iz dveh zlogov (angl. **non-virion**). Z njo označujemo specifičnost virusov rodu *Novirhabdovirus*. Tako imajo vse vrste, uvrščene v rod *Novirhabdovirus*, med genoma G in L lociran dodatni gen NV, njihova nukleotidna zaporedja pa so značilna in se razlikujejo od drugih rodov. Gen NV kodira nestrukturni protein, ki so ga dokazali samo v fazi pomnoževanja v okuženih celicah (Schütze in sod., 1996).

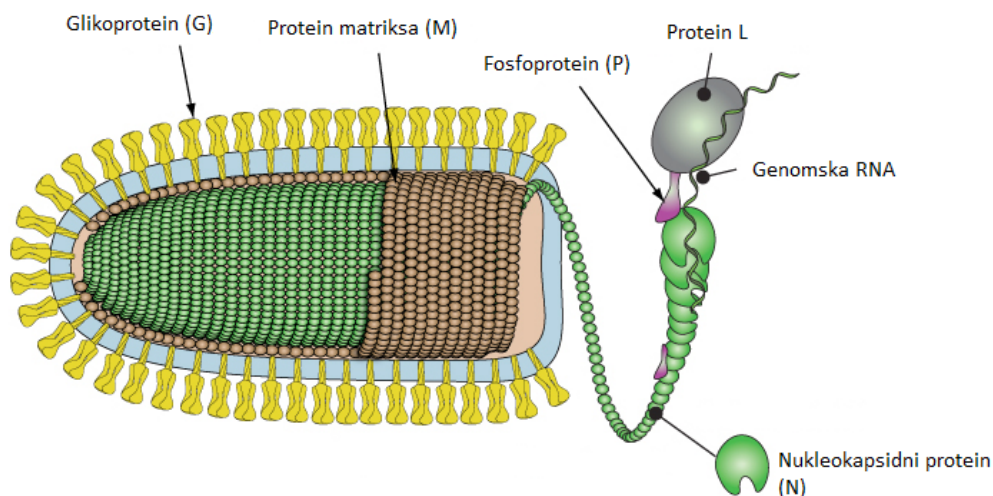
Funkcija proteina NV do danes še ni popolnoma znana. Thoulouze je s sodelavci (2004) v raziskavi potrdila vlogo gena NV pri virusni replikaciji v celični kulturi in njegov vpliv na stopnjo virulence virusa IHN pri postrvih. Po njihovih izsledkih naj bi imel gen NV v genomu virusa IHN vlogo strukturnega *spacerja* za optimalno procesiranje virusne polimeraze med virusno transkripcijo in replikacijo. Produkt gena NV ima tudi biološki vpliv na rast IHN v celični kulturi, dokazali so tudi znatno znižanje titra IHN v odsotnosti gena NV.

Različni rodovi in različne vrste rib, pri katerih se virusi rodu *Novirhabdovirus* pojavljajo, ter ohranjen bralni okvir virusnega genoma kažejo na njegovo pomembno biološko vlogo.

Za razliko od ostalih rabdovirusov, rabdovirusi pri ribah povzročajo okužbe in obolenja pri znatno nižjih temperaturah (12 °C–15 °C), kar je posledica prilagajanja na hladnejše vodno okolje. V laboratoriju te viruse gojimo na standardnih celičnih linijah, predpisanih v pravilniku Mednarodne organizacije za zdravje živali (OIE; fr. *Office international des épizooties*, angl. *World Organisation for Animal Health*). Za gojenje virusov IHN in SVC sta najustreznejši poikilotermni celični liniji EPC in FHM (angl. *Fat Head Minnow*), za virus VHS pa celični liniji RTG-2 (angl. *rainbow trout gonadal cells*) ali BF-2 (angl. *Bluegill Fry*). Za vse omenjene celične linije velja, da je optimalna temperatura za rast in stabilnost virusa med 12 °C in 14 °C (De Kinkelin in LeBerre, 1979).

2.4.2 Morfološke značilnosti in fizikalno-kemijske lastnosti viriona IHN

Virion ima značilno obliko izstrelka. Kratke, na enem koncu ošiljene paličke, v premeru merijo 65–75 nm in v dolžino 150–190 nm (Bootland in Leong, 1999). Virusni delec IHN kemično sestavljajo: 3 % ribonukleinska kislina (RNA), 74 % beljakovine, 20 % lipidi in 3 % ogljikovi hidrati (Coll, 1995). Spiralno zvito cilindrično nukleokapsido, ki v premeru meri približno 50 nm, obdaja lipoproteinska ovojnica. Ta je delno gostiteljskega izvora, njena sestava pa je odraz sestave celične membrane gostiteljske celice (Murphy in sod., 1995). Njena naloga je, da ščiti genom virusa pred celičnimi nukleazami (Monath in Heinz, 1996).



Slika 2-4: Shematski prikaz zgradbe viriona IHN.
(http://expasy.org/viralzone/all_by_species/76.html)

Virus IHN je občutljiv za višjo temperaturo. Inaktivira se po 15 minutah pri 60 °C, pri 32 °C po 8 urah, pri 27 °C pa so infektivne virione detektirali še po 1 tednu (Pietsch, 1977). Inaktivirajo ga tudi kisline in eter. V odprtih vodah virus preživi najmanj 1 mesec, uničijo pa ga kemikalije, kot so natrijev dodecil sulfat, neionski detergenti in lipidni solventi (OIE, 2009).

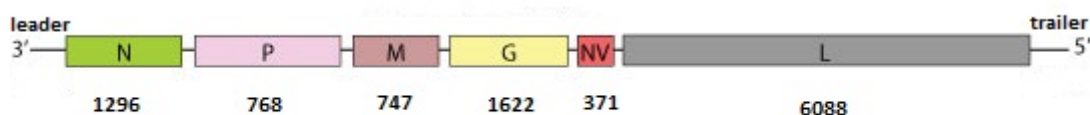
Virus je v slanem vodnem okolju manj odporen, ne glede na koncentracijo soli v vodi. V takem okolju preživi do 14 dni (Barja in sod., 1983).

Vstop virusa IHN je podobno kot pri številnih virusih z ovojnico pogojen z nizkim pH vsebine endocitotske vezikule. Glikoprotein G omogoča vezavo virusa na membranske celične receptorje in omogoča interakcijo med virusom in gostiteljsko celico. Odgovoren je za pritrditev virusa IHN na specifične membranske receptorje celice gostiteljice. pH območje med 6 in 8, ki je optimalno za vezavo virusa IHN, povzroči konformacijske spremembe glikoproteina G (Miller in sod., 2007).

Pri redukciji patogenov se je izkazalo za učinkovito kemično razkuževanje z jodovimi pripravki. Dokazali so virucidno delovanje jodoforov. Visoka vsebnost joda (od 25 do 100 mg/liter) v omenjenem pripravku se uporablja za površinsko razkuževanje iker in opreme v ribogojnici. Amend in Pietsch (1972) sta poročala, da že 12 mg joda v pripravku za razkuževanje popolnoma inaktivira virus IHN v 30 sekundah. Batts je s sodelavci (1991) v svoji raziskavi primerjal odvisnost učinkovitosti jodovih pripravkov za razkuževanje v primerjavi s stopnjo pH raztopine in potrdil manjšo učinkovitost razkužila pri višjem pH raztopine. V praksi to pomeni, da je v ribogojnici treba vodi, ki ima višji pH, dodati višjo koncentracijo joda v pripravku za inaktivacijo virusa IHN.

2.4.3 Struktura genoma

V primerjavi z ostalimi rabdovirusi so pri virusu IHN opisali 6 in ne 5 virusnih genov. V knjižnici cDNA (angl. *complementary DNA*, komplementarna DNA), v kateri so zbrane vse informacijske RNA (mRNA), prepisane v cDNA, ki so bile v določeni stopnji rasti in razvoja prisotne v celicah, je zbranih vseh šest virusnih genov. Šesti gen kodira do tedaj neznan virusni protein, imenovan »non-virion« protein (protein NV).



Slika 2-5: Shematski prikaz organizacije genoma IHNV. Pod sliko je prikazana dolžina posameznega odseka v nukleotidih. (http://expasy.org/viralzone/all_by_species/76.html).

Genom virusa IHN je sestavljen iz linearne, negativno polarne enojnovijačne molekule RNA. Sestavlja ga 11.137 nukleotidov in vsebuje 6 bralnih okvirjev (ORF, angl. *open reading frame*) ter kodira 6 genov za proteine v zaporedju 3'-N-P-M-G-NV-L-5'. Nekodirajoča 3' in 5' konca vijačnice RNA, ki ju imenujemo »leader« in »trailer« sekvenca, sta komplementarna, kar najverjetneje pomeni zaščito virusne RNA pred nastankom različnih strukturnih elementov, kot so lasnice in interne zanke, ki onemogočajo funkcijo polimeraze RNA in posledično prepisovanje gena (Banerjee in Barik, 1992).

Kratki nekodirajoči regiji na 3' koncu sledi prvi odprti bralni okvir ORF1 (175-1350 nt), ki nosi zapis za 391 aminokislin in kodira nukleokapsidni protein (N). Sledi mu drugi bralni okvir (ORF2), dolg 690 nukleotidov (1474-2166), ki nosi zapis za 230 aminokislin. Ta bralni okvir kodira virusni fosfoprotein (P ali M1). Na poziciji 2263-2850 nukleotidov se nahaja tretji bralni okvir (ORF3), katerega pozicija ustreza tudi ostalim rabdovirusom. V kodirajoči regiji 195 aminokislin nosi zapis za protein matriksa (M ali M2). Kodon ATG na poziciji 3007 predstavlja startni kodon za začetek translacije gena za glikoprotein G, ki se konča na poziciji 4533 in sestoji iz 1524 nukleotidov ter nosi zapis za 508 aminokislinskih ostankov v četrtem bralnem okvirju (ORF4). Peti bralni okvir (ORF5) kodira majhen protein, protein NV, lociran med 4319 in 4939 nukleotidi genoma, velikosti 111 aminokislin. Dva dodatna možna analoga startnega kodona za omenjeni protein se nahajata pri nukleotidu 4604 in 4631. Zapis za virusno polimerazo RNA (L), ki se nahaja v šestem bralnem okviru (ORF6), predstavlja največji kodirajoči segment genoma virusa IHN. Startni kodon za ORF6 se nahaja na poziciji 5025, konča pa se na poziciji 10985 in nosi zapis za 1986 aminokislin (Morzunov in sod., 1995).

Intergenska, nekodirajoča zaporedja, z ohranjenim zaporedjem 5' AGAYAG/C 3', ki mu sledi sedem adenzinskih ostankov, so prisotna na koncu vsakega kodirajočega genskega odseka genoma virusa IHN (Schütze, 1995). Najverjetneje nosijo zapis za sporočila, ki so pomembna za prepisovanje genov, podvojevanje in najverjetneje omogočajo kopičenje virusnih genskih odsekov v viroplazmi (citoplazmatske inkluzije) (Estes in Cohen, 1989).

Šest virusnih molekul mRNA so našli v celicah, okuženih z virusom IHN, njihove molekularne teže pa so bile ocenjene z elektroforezo na agaroznem gelu (Kurath in Leong, 1985). Ocenjena molekulska masa mRNA za virusno polimerazo je $2,26 \times 10^6$ Da, za virusni glikoprotein $5,63 \times 10^6$ Da, nukleokapsidni protein $4,48 \times 10^5$ Da, fosfoprotein $3,00 \times 10^5$ Da, protein matriksa $3,00 \times 10^5$ Da in protein NV $1,95 \times 10^5$ Da. Predpostavljajo, da je mRNA za nukleokapsidni protein prva mRNA, ki nastane med virusno replikacijo, medtem ko je nukleokapsidni virusni protein prvi, ki se sintetizira v okuženih celicah. Relativna koncentracija vsake izmed šestih virusnih molekul mRNA, izmerjena na vrhuncu virusne replikacije, je bila za nukleokapsidni protein 1,00, mRNA za fosfoprotein in protein matriksa $2,52 \pm 0,40$, mRNA glikoproteina $0,49 \pm 0,03$, mRNA proteina NV $0,41 \pm 0,14$ in mRNA virusne polimeraze $0,02 \pm 0,01$ (Kurath in Leong, 1985). Informacijske RNA pri predstavnikih družine *Rhabdoviridae* so monocistranske. Obstaja verjetnost, da ena virusna molekula mRNA kodira več kot samo en translacijski produkt. V virologiji so znani številni primeri različnih translacijskih produktov, ki so kodirani v različnih bralnih okvirih kot posledica premika bralnega okvirja, ali pa translacija poteče iz različnih start kodonov. Torej obstaja velika verjetnost, da obstajajo dodatni proteini, kodirani na IHNV genomu. Na primer pri paramiksovirusih in rabdovirusih je v genu za fosfoprotein v molekuli mRNA kodiranih več transkriptov za več kot samo en protein (Spiropoulou in Nichol, 1993). V celicah, okuženih z virusom IHN, je bil opisan tudi že sedmi protein, protein S (majhen, angl. *small*), molekularne teže 6,5 kDa (Chiou, 1996). Ni pa še povsem znano, ali protein S kodira eden izmed obstoječih prepisov že prej omenjenih mRNA virusnih molekul.

2.4.4 Virusne beljakovine

Pri translaciji in procesiranju virusnega genoma nastane 6 različnih proteinov: 5 strukturnih (N, P ali M1, M ali M2, G in L) (McAllister in Wagner, 1975) in 1 nestrukturni (NV) protein (Kurath in Leong, 1985; Schütze in sod., 1996). Strukturni proteini so gradbeni elementi viriona, nestrukturni pa nastajajo le v okuženih celicah (Kurath in Leong, 1985; Schütze in sod., 1996).

Proteini virusa IHN, ki je bil eden prvih biokemijsko analiziranih virusov pri ribah, predstavljajo 65–75 % teže virusa: nukleokapsidni protein (N), fosfoprotein, ki je sestavina virusne polimeraze (P ali M1), protein matriksa (M ali M2), glikoprotein (G), nevirusni gen

(NV), in virusna RNA polimeraza (L). Gen NV je edinstven in specifičen za družino *Novirhabdoviridae* (Kolodziejek in sod., 2008).

Nukleokapsidni protein (N) je v okuženih celicah z virusom IHN prisoten v najvišji koncentraciji. Je prvi virusni protein, ki se sintetizira v okuženi celici. V virionu je prisoten v fosforilirani obliki (McAllister in Wagner, 1975; Hsu in sod., 1985). Gen N kodira protein s 413 aminokislinami. Na svojih amino- in karboksilnih domenah je močno hidrofilen, hidrofobna regija pa se nahaja v srednji tretjini proteina. Domevajo, da je karboksiterminalni konec IHN virusnega proteina N vključen v vezavo proteina N na virusno RNA (Gilmore in sod., 1988). Pri predstavnikih rodu *Vesiculovirus* protein N igra ključno vlogo regulacije virusne transkripcije in replikacije. Ta protein je tudi glavna antigenska tarča za limfocite T pomagalke (Celis in sod., 1988).

Fosforiliran protein ali fosfoprotein (P ali M1) sestavlja 230 aminokislin s povprečno molekularno težo 25,6 kDa (McAllister in Wagner, 1975; Hsu in sod., 1985; Ormonde, 1995). S sekvenčno analizo gena, ki kodira protein P virusa IHN, je bilo dokazano, da aminokislinsko zaporedje vsebuje 45 potencialnih fosforilacijskih mest, ki jih predvsem najdemo v prvi polovici proteina (Ormonde, 1995). Protein M1 je bazični protein, katerega izoelektrična točka znaša 8,4 (Benmansour in sod., 1994; Ormonde, 1995). Sekvenčne analize M1 oziroma P proteinov različnih sevov IHNV kažejo na veliko podobnost, celo do 94-odstotno identičnost na aminokislinskem nivoju (Ormonde, 1995; Morzunov in sod., 1995). Sekvenčna analiza gena M1 pri različnih sevih IHNV indicira možnost obstoja dodatnega, delno prekrivajočega se bralnega okvirja, ki mu sledi in ki kodira visoko bazični protein, bogat z argininom, z izoelektrično točko pri 10.1-12.8. Ta bralni okvir se nahaja na poziciji 121 od konca poliadeniliranega zaporedja gena N, v dolžini 146 nukleotidov in kodira protein, ki ga sestavlja 42 aminokislin z molekularno težo 4,8 kDa. Ta protein je zelo podoben proteinu C, ki je opisan pri virusu VSV in je bogat z argininom. Sestavlja ga 55 aminokislin (Spiropoulou in Nichol, 1993). Protein C najdemo le v okuženih celicah, njegova funkcija pa je trenutno še neznana.

Protein matriksa (M), ki so ga v preteklosti označevali kot M2, je zelo podoben vsem že objavljenim rabdovirusnim proteinom matriksa (Ormonde, 1995). Protein M kodira zaporedje 585 nukleotidov, ki ga sestavlja protein z 195 aminokislinami, molekularne teže od 17,5 kDa do 21,8 kDa. Je zelo bazičen, z ocenjeno izoelektrično točko pri 10.08. Na aminoterminalni domeni proteina se nahaja veliko nabitih aminokislin. Take konce najdemo tudi pri vezikulovirusih, lisavirusih (Rose in Gallione, 1981; Bourhy in sod., 1993) in

paramiksovirusih (Chambers in sod., 1986). Pri vezikulovirusih prvih 51 aminokislin omogoča stabilno interakcijo s plazma membrano (Chong in Rose, 1994), sestavljanje virusnih delcev (Black in sod., 1993), kot možna se omenja tudi inhibicija transkripcije RNA (Ogden in sod., 1986). Še vedno ostaja nejasno, ali je ta odsek genoma pri novirabdovirusih tudi vključen v sestavljanje virusnih delcev, inhibicijo transkripcije in ali je potreben pri membranskih interakcijah. V primerjavi z drugimi rabdovirusi, pri virusu IHN lahko ugotovimo 37-odstotno–74-odstotno identičnost na aminokislinskem nivoju (Ormonde, 1995). Ohranjenost zaporedij je največja na N-terminalni regiji znotraj prvih 29 aminokislin, kjer se nahaja veliko število bazičnih reziduov.

Glikoprotein G je odgovoren za prepoznavanje novirabdovirusnih receptorjev na tarčnih celicah. Je glavna beljakovina virusne ovojnice, ki na površini zrelega viriona oblikuje velike peplomere (glikoproteinski izrastki, dolgi 5–10 nm in s premerom 3 nm) in kot taka sproži tvorbo nevtralizacijskih protiteles. Sproži glavni imunski odgovor.

Glikoprotein G sestavljajo naslednje strukturne domene: signalni peptid je dolg 20 aminokislinskih ostankov in se nahaja na N-terminalni domeni, sledi mu zunanja antigenska domena ali ektodomena (438 aminokislinskih ostankov), nato transmembranska domena (22 aminokislinskih ostankov) in na C-terminalni domeni citoplazemska ali endodomena (25 aminokislinskih ostankov) (Ammayappan in sod., 2010). Visoka ohranjenost gena se kaže z nizkim številom sinonimnih nukleotidnih zamenjav v tem delu genoma (Schütze, 1995).

»**Non-virion**« **protein (NV)** so prvič dokazali leta 1985 *in vitro* (Kurath in Leong, 1985). Izoelektrična točka proteina znaša 7, kljub dejstvu, da ima protein veliko število nabitih aminokislin (38 %) (Nichol in sod., 1995). Gen za protein NV je visoko ohranjen. V primerjalni študiji 13 izolatov virusa IHN iz Severne Amerike in enega iz Evrope so ugotovili 97-odstotno identičnost med izolati na aminokislinskem nivoju (Nichol in sod., 1995; Schütze in sod., 1995; Chiou, 1996; Kurath in sod., 1997). Vloga NV gena še vedno ostaja nedorečena. Rezultati opravljenih študij kažejo, da naj bi virusni NV protein ne imel vloge pri virusni transkripciji in replikaciji genoma. Z rezultati preiskav so dokazali tudi njegov vpliv na stopnjo virulence virusa IHN (Kurath in Leong, 1985; Thoulouze in sod., 2004).

Protein L, od RNA odvisna polimeraza RNA, kodira največje število nukleotidov v genomu in je protein z največjo molekulsko maso. Njegova funkcija je vezana na transkripcijo virusnega genoma, torej sintezo RNA, metilacijo in poliadenilacijo virusne RNA (Bootland in Leong, 1999).

Ocenjen je bil delež vsakega izmed proteinov virusa IHN v virionu (Leong in sod., 1983). Razmerje virusni protein: ribonukleinska kislina (RNA) je 21 : 1, zelo malo v primerjavi z virusom vezikularnega stomatitisa in virusa stekline, ki imata razmerje 92 : 1 oziroma 72 : 1 (Coslett in sod., 1980). Nizko razmerje protein : molekula RNA pri virusu IHN je najverjetneje odraz sprememb v membranski strukturi ribje in sesalske celične membrane (Moore in sod., 1976). V virionu IHN je ocenjeno število molekul proteina L 23–40, molekul glikoproteina 198–290, 560–774 je molekul nukleokapsidnega proteina, 391–514 molekul fosfoproteina in 874–1044 molekul je proteina M. Pomembno razliko opazimo v številu glikoproteinskih molekul viriona (Bootland in Leong, 1999).

2.4.5 Razmnoževanje virusa IHN

Razmnoževanje virusa je sestavljeno iz različnih stopenj, ki si sledijo: pritrjevanje na celico, vstopanje v celico, sproščanje virusne nukleinske kisline, sinteza virusnih beljakovin in pomnoževanje virusne nukleinske kisline, sestavljanje novih virusnih partiklov in izstopanje iz celice (Miller, 2007).

Kristina Miller je s sodelavci (2007) v obsežni študiji dokazala, da virus IHN podobno kot virus influence (Lakadamyali in sod., 2003) vstopi v celice gostitelja z receptorsko posredovano endocitozo in s pomočjo motoričnega proteina dineina, ki premika endosom vzdolž mikrotubulov.

V dosedanjih študijah je bilo dokazano, da je fibronektin, obsežen glikoprotein ekstracelularnega matriksa, celični površinski receptor za ribje rabdoviruse (Bearzotti in sod., 1999) in odgovoren za vezavo na površino celice ter posledično za vstop virusa v celico gostiteljico (Boudinot in sod., 1998). Količina virusnega receptorja fibronektina na celični membrani se povečuje tudi s pomočjo receptorja za urokinazni aktivator plazminogena (uPAR), ki proizvaja plazmin iz plazminogena in je tako vključen v polimerizacijo fibronektina in sestavljanje proteina matriksa (Monaghan in sod., 2004). Močno pozitivno regulacijo tega receptorja so v študijah opazili od 5. dneva po okužbi. Visoke vrednosti uPAR proteina spodbudijo interakcije med $\beta_5\beta_1$ integrini, kar vodi do formacije netopnih fibronektinskih fibril, ki se nahajajo na površini celične membrane (Aguirre-Ghiso in sod., 2001).

Virus vstopa v celico s pomočjo pH-odvisne endocitoze. Po vstopu virusa pride do zlivanja virusne membrane z membrano endocitotske vezikule, kar je pogojeno z nizkim pH vezikule. Zakislitev endocitotske vezikule sproži spremembo konformacije virusne proteinske ovojnice in posledično se v celično citoplazmo iz vezikule sprosti nukleokapsida. Sledi virusna transkripcija, ki se v celoti odvija v citoplazmi. Prepisovanje se začne s prepisom informacijskih mRNA iz genomske RNA s pomočjo virusne polimeraze RNA. Subgenomske mRNA se prepišejo iz virusne RNA z virusno transkriptazo. Obstaja le eno promotorsko mesto na 3' koncu virusnega genoma. Polimeraza se veže na tem mestu na genomsko RNA in se pomika po virusni RNA, na kateri ob vsakem novem zapisu za gen naleti na stop/start kodon. Le določeno število molekul polimeraze preskoči ta mesta in nadaljuje prepisovanje. Posledica tega mehanizma, ki se imenuje pojemajoče prepisovanje (angl. *attenuated transcription, stop/start transcription, stuttering transcription*), je, da se prepiše več mRNA z genov, ki so bližje 3' koncu genoma. Tako nastanejo največje količine strukturnih proteinov, kot je na primer nukleokapsidni protein, v primerjavi s proteinom L, katerega je najmanj (Murphy in sod., 1999).

Nukleoproteinske molekule se sintetizirajo na ribosomih in se vežejo na novonastale genomske molekule RNA ter s tem oblikujejo nukleokapsido (Madigan in sod., 2000; Murphy in sod., 1999). Glikoproteini se transportirajo do citoplazemske membrane, kjer nadomestijo proteine membrane gostiteljske celice. Nukleokapside potujejo proti področjem membrane, kjer so ti virusno specifični glikoproteini (Madigan in sod., 2000). S pomočjo proteina matriksa se nukleokapside vežejo na ta mesta (Murphy in sod., 1999), to pa vodi do ovijanja nukleokapside z membrano in do brstenja (Madigan in sod., 2000; Murphy in sod., 1999). Tako nastanejo virusi z ovojnico, katerih lipidi izvirajo od gostiteljske celice, proteini na njej pa so virusno kodirani (Madigan in sod., 2000).

Zorenje virusov poteka na membranah endoplazmatskega retikuluma. Virusni delci nato potujejo proti celični membrani po cisternah trans Golgijevega aparata in se z eksocitozo sprostijo iz celice (Heinz in Allison, 2003).

Virus IHNV se razmnožuje v endotelih celicah kapilar, hematopoetskega tkiva in nefronih. Povsem verjetno in možno je, da virus ob vstopu v celico in pri svojem razmnoževanju prevzame gostiteljeve mehanizme angiogeneze preko pozitivne regulacije proteina uPAR, kar pa istočasno poveča količino virusnega receptorja fibronektina na celični membrani (Miller in sod., 2007). uPAR je močan pozitiven regulator angiogeneze. Pri odgovoru na okužbo z

virusom IHN so od 5. dneva naprej dokazali še dva pozitivna regulatorja angiogeneze, in sicer ceruloplazmin in aminopeptidazo N (Bearzotti in sod., 1999).

Zaviralec serinske proteaze urokinaznega aktivatorja plazminogena (PAI-2) je negativni regulator angiogeneze, ki posledično morda lahko tudi zmanjša virulenco virusa (Miller in sod., 2007).

2.4.6 Ekspresija virusnih genov

Okužba celic lososa ali postrvi z virusom IHN ima za posledico inhibicijo celične sinteze proteinov, medtem ko celična sinteza proteinov po okužbi z virusom stekline ni inhibirana (Coslett in sod., 1980). To je značilnost, ki IHNV ločuje od drugih predstavnikov v družini *Rhabdoviridae*. Študije sinteze proteinov pri virusu stekline zahtevajo izpostavljenost hipertoničnemu šoku z namenom zmanjšanja ozadja gostiteljeve sinteze proteinov. Pri virusu IHN tako drastičnih posegov ni treba izvajati. V študijah, ki so jih opravili s ³⁵S-metioninom, je prvi virusni protein, ki se pojavi po 2–3 urah po infekciji, nukleokapsidni protein (Hsu in sod., 1985). Po 6–7 urah po infekciji lahko na avtoradiogramu zaznamo fosfoprotein in protein matriksa. Glikoprotein G je zaznaven po 9–10 urah po infekciji. Protein L je mogoče razlikovati od drugih proteinov gostitelja na avtoradiogramu šele po 15 urah po infekciji, ko je gostiteljeva celična proteinska sinteza popolnoma inhibirana. Sestavljanje virusnih delcev se začne 12 ur po infekciji (Leong in sod., 1981).

2.5 EPIZOOTIOLOŠKE ZNAČILNOSTI VIRUSA IHN

Virus infekcijske hematopoetske nekroze so sprva ugotovili pri salmonidnih vrstah rib le na severozahodni obali Tihega oceana v ZDA. O bolezni so prvič poročali pri rdečem lososu v zvezni državi Washington leta 1953 (Rucker in sod., 1953). Od takrat naprej se je virus širil s prometom z okuženimi ikrami in okuženim zarodom med številnimi salmonidnimi vrstami rib v ribogojnicah v zveznih državah Washington, Oregon in Idaho (Amend in Wood, 1972; Groberg in Fryer, 1983).

V zvezni državi Oregon so prvič poročali o bolezni IHN v ribogojnici Willamette River Salmon Hatchery leta 1958 (Wingfield in sod., 1969). Obstaja teza, da se je virus prenesel iz Washingtona v Oregon s termično neobdelanim odpadnim materialom lososa (drobovje), ki so ga uporabljali za prehrano mladice.

Leta 1960 so poročali o domnevnem virusnem povzročitelju sezonskih, ponavljajočih se primerov smrtnosti med mladimi kraljevega lososa (*Oncorhynchus tshawytscha*) v zvezni državi Severna Karolina (Ross in sod., 1960). V naslednjih 20 letih so poročali o virusnih okužbah salmonidnih vrst rib še v Sacramentu, na Aljaski, v Britanski Kolumbiji, epizootije so se pojavljale tudi v zveznih državah Minnesota, Montana, Južna Dakota, Idaho in leta 1973 v zvezni državi Zahodna Virginia. Velja prepričanje, da se je bolezen na ta geografska področja razširila z uvozom okuženih iker ali okuženih rib iz prvotno okuženih področij (Pilcher in Fryer, 1980a).

Leta 1975 se je v ribogojnici Wizard Falls, ki jo napaja reka Metolius, pojavila velika smrtnost pri šarenki in mladicih rdečega lososa. Kasneje so virus dokazali tudi v jezeru Suttle, in sicer pri juvenilnih predstavnikih rdečega lososa (*Oncorhynchus nerka*). V zimskih mesecih 1975–1976 so virus potrdili pri odraslih ribah kraljevega lososa v ribogojnici ob reki Elk na južni obali Oregona.

Leta 1977 so poročali o velikih izgubah šarenke v Idahu (Busch, 1983). V zgodnjih osemdesetih letih so virus IHN dokazali še pri drugih vrstah salmonidov. Izgube so dramatično naraščale. Do leta 1982 so IHN dokazali še v bazenu porečja reke Kolumbije pri klarkovem lososu (*Oncorhynchus clarkii*) (Groberg, 1983; Groberg in Fryer, 1983). Prvič so o epizootiji IHN pri zarodu atlantskega lososa (*Salmo salar*) poročali leta 1984 v Washingtonu (Mulcahy in Wood, 1986) in 1986 so virus prvič izolirali pri odrasli keti (*Oncorhynchus keta*) brez izrazite in značilne klinične slike (Hooper, 1987). V Idahu je v populaciji šarenk bolezen pridobila razsežnosti epizootije (Busch, 1983), izolirana je bila tudi pri odrasli jeklenoglavki (katadromna *Oncorhynchus mykiss*) in mladicih rdečega lososa (Groberg, 1983). Dandanes je bolezen IHN stalno prisotna pri salmonidnih vrstah v zveznih državah Oregonu, Washingtonu, Idahu, Kaliforniji, na Aljaski in v Britanski Kolumbiji. Predvsem velja za endemično virusno obolenje, ki se pojavlja na pacifiškem severozahodu Amerike (Pilcher in Fryer, 1980 a,b; Wolf, 1988).

Leta 1972 so prvič poročali o izbruhu bolezni in dokazu virusa IHN izven ZDA, in sicer na Japonskem, na otoku Hokkaido (Kimura in Awakura, 1977), od koder se je hitro razširila med številne vrste rib po celotnem področju države (Sano in sod., 1977). Domnevajo, da je bil virus prenesen na Japonsko z uvozom okuženih iker iz Aljaske leta 1968 (Wolf, 1988). Od tu se je leta 1985 s transportom okuženih iker prenesel še na severovzhod Kitajske (Niu in Zhao, 1988; Zhao in Niu, 1994) in na Tajvan (Chen in sod., 1985).

Posledica uvoza okuženih iker šarenke iz ZDA v Italijo leta 1987 je povzročila izbruh bolezni v vsaj šestih regijah znotraj države (Bovo in sod., 1987; Bovo in sod., 1991). O prvih izbruhih IHN so nato poročali še iz Francije (Laurencin, 1987; Hattenberger-Baudouy in sod. 1989, 1995), Belgije (Hill, 1992) in Koreje (Park in sod., 1993). Med avgustom in oktobrom leta 1992 so bolezen prvič ugotovili v Nemčiji, epizootiološka preiskava je pokazala, da so virus v državo vnesli z uvozom mladice iz Italije (Enzmann in sod., 1992).

Na podlagi dosedanjih podatkov je IHN zelo razširjena tudi v Sloveniji, kjer je bila prvič ugotovljena leta 1993. Razen v ribogojnicah za vzrejo šarenke smo virus IHN ugotovili tudi pri potočni postrvi v reki Savi (Jenčič in Hostnik, 1998). V študiji, ki jo je opravila Jenčičeva s sodelavci (2002), so v 4-letnem obdobju pregledali 166 matičnih jat in 130 vzorcev, pri katerih je bil postavljen sum bolezni. Pri matičnih jatah so okužbo z virusom IHN potrdili v 16 primerih, ob sumu bolezni pa so dokazali povzročitelja in potrdili okužbo v 24 primerih. Incidenca virusa IHN je v primeru pregledanih matičnih jat z začetnih 7 potrjenih primerov okužbe v letu 1997 padla na 4 potrjene primere okužbe v letu 2001. 1997 je bil sum bolezni potrjen v 11 primerih, leta 2001 pa le 1 primer.

V Sloveniji je bilo v obdobju od leta 1991 do julija 2002 diagnosticiranih 48 primerov IHN. Najpogosteje so bili pozitivni primeri IHN odkriti pri vzorcih, ki so bili odvzeti ob sumu bolezni (30 primerov), v 18 primerih pa so virus dokazali pri vzorcih ovarialne in semenske tekočine, odbrane ob smukanju plemenk. Razen enega primera v letu 1997, ko je bil virus IHN potrjen pri potočni postrvi v odprti vodi, so bili vsi pozitivni primeri potrjeni v ribogojnicah. Tako je bilo v letih 1997–2002 v Sloveniji odkritih 42 ribogojstev pozitivnih na IHN (Seničar, 2002).

2.6 MOLEKULARNA EPIZOOTIOLOGIJA

Različnost virusni populaciji omogoča, da se hitreje in bolj učinkovito prilagaja dinamiki okolja in razvija rezistenco na cepiva in protivirusna zdravila. V zadnjih tridesetih letih je razlago o genetski različenosti podkrepil Eigen s teorijo o nastanku kvazispecies, s katero razlaga evolucijo molekule RNA, tudi rabdovirusne. Kvazispecies so skupina različnih variant (mutant), ki so preko mutacij genetsko povezane, interagirajo kooperativno in kolektivno prispevajo h karakteristikam populacije (Eigen in sod., 1989).

Eigen je rast in koncentracijo podvajajočih se enot (replikonov) matematično izrazil. Spremenljivki (mutanti) sta odvisni od intenzivnosti replikacije, natančnosti podvajanja,

hitrosti razkroja, od že obstoječe koncentracije replikona, povratnih mutacij iz drugih replikonskih sevov in morebitnega pritoka ali odtoka tega replikona v sistem oziroma iz sistema. Najspodobnejši replikon vedno soobstaja z rojem lastnih neposrednih in posrednih mutant. Takemu skupku je Eigen nadel ime kvazispecies. Mutanta v takem skupku je tarča selekcije in evolucije. Vsaka mutanta v kvazispecies, ki ima višjo selekcijsko vrednost kot dosedanja glavna kopija, slednjo izselekcioniira. Sama boljša mutanta postane glavna kopija. Ta mehanizem zagotavlja, da se uveljavi že najmanjša prednost (Eigen in sod., 1989).

Virusi RNA se replicirajo z visoko stopnjo mutacij in izražajo značilno genetsko različnost. Za nekatere rabdoviruse avtorji poročajo o značilno visoki stopnji divergence. Nekateri podatki se nanašajo celo na od 0,03 do 2,0 % stopnjo divergence RNA virusnega genoma na nukleotidni ravni letno, medtem ko drugi avtorji zagovarjajo nižjo stopnjo divergence (0,014 % zamenjav nukleotidov virusnega genoma/leto). Razlog razhajanj v mnenjih je dejstvo, da vse ocene pogostosti baznih zamenjav niso bile podane za viruse »v naravi«, ampak je bila pri nekaterih virusih pogostnost mutacij ocenjena v »in vitro« pogojih, po številnih pasajah na celični kulturi.

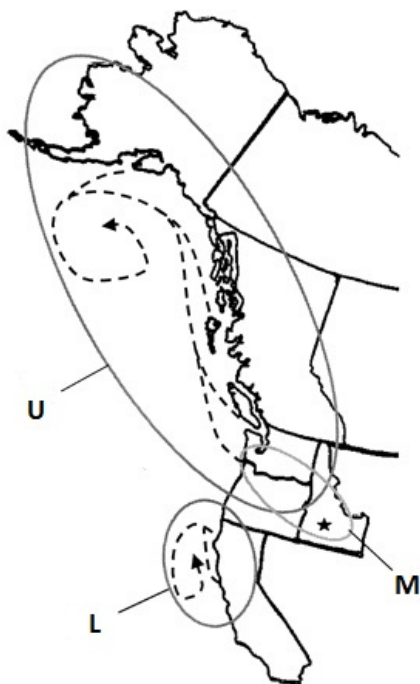
Največkrat so opisane točkaste mutacije, delecije in prerazporejanje genoma. Razlog naj bi bil v pomanjkljivi lastnosti encima RNA polimeraze, ki nima »proofreading« aktivnosti. Upoštevajoč inherenco »proofreading« aktivnosti RNA polimeraze in frekvence napak, skupaj z velikim številom virusnih replikacijskih ciklov na leto rezultira v visoki stopnji divergence.

Nukleotidna zaporedja virusnih izolatov IHN so bila osnova za filogenetsko analizo IHNV in evlucijsko primerjavo z ostalimi rabdovirusi (Morzunov in sod., 1995; Bjorklund in sod., 1996). S primerjalno analizo tarčnih odsekov genov za virusni glikoprotein, protein matriksa in protein L so dokazali obstoj treh različnih kladov v filogenetskem drevesu družine *Rhabdoviridae*. Predstavniki roda *Vesiculovirus* (*Vesicular stomatitis virus*, Piry virus in Chandipura virus) oblikujejo en klad, v drugi klad so razporejeni predstavniki rodu *Lyssavirus* (virus stekline, Mokola virus). Kot smo že omenili, je bil opisan tudi tretji, zelo dobro podprti klad, ki obsega ribje rabdoviruse (virus IHN, virus VHS in HIRRV) (Basurco in Benmansour, 1995; Kurath in sod., 1997).

Genetske analize in filogenetske študije virusa IHN so bile opravljene večinoma pri izolatih vzorcev rib, ki so bili izolirani na področju Severne Amerike (Nichol in sod., 1995). Do zdaj je bilo opravljenih le nekaj študij na virusnih izolatih IHN iz Azije in Evrope (Kolodziejek in sod., 2008; Emmenegger in sod., 2000, 2002; Enzmann in sod., 2005).

Rezultati so pokazali presenetljivo nizko stopnjo genetske raznolikosti znotraj gena G. 303 nukleotidov dolg odsek znotraj gena G, imenovan »mid-G« regija, ki predstavlja antigenske determinante, je najbolj informativna regija virusa IHN za filogenetsko analizo. Velja, da je različnost virusov IHN vezana na geografsko področje, kjer se je določen izolat virusa pojavil, in ni odvisna niti od vrste gostitelja niti od časa izolacije posameznega virusnega izolata. Omejenost pojava virusa IHN pri različnih gostiteljskih vrstah je v študiji opisal Kurath s sodelavci (Kurath in sod., 2003). Časovno je japonske izolate virusa IHN v študiji opredelil Nishizawa s sodelavci (Nishizawa in sod. 2006).

Nichol je s sodelavci (1995) opravil obsežno študijo, v kateri je bilo vključenih 323 izolatov virusa IHN iz celotnega področja Severne Amerike. S sekvenčno analizo variabilne regije znotraj glikoproteinskega gena G (mig-G regija) so virusne izolate razdelili na 3 glavne genske skupine, ki jih označujemo U (*upper* – zgornji), M (*middle* – srednji) in L (*lower* – spodnji) in sovpadajo z geografsko distribucijo izolatov virusa IHN v Severni Ameriki, ter dodatno četrto gensko skupino JRt, v katero so razvrščeni azijski izolati virusa IHN (Slika 2-6). Virusne izolate, uvrščene v gensko skupino M, so v večini dokazali pri šarenki (Troyer in Kurath, 2003; Troyer in sod., 2000). Nichol je s sodelavci (1995) na osnovi dobljenih rezultatov zaključil, da je stopnja genetske raznolikost virusov IHN v Severni Ameriki manj kot 5-odstotna. O podobnem odstotku genetske raznolikosti v rezultatih raziskave poroča tudi Emmeneggerjeva s sodelavci (2000). Nukleotidno zaporedje s 7,6-odstotno divergenco v mid-G regiji gena za glikoprotein je najvišja ugotovljena stopnja raznolikosti (Troyer in Kurath, 2003). Enzmann je v študiji (Enzmann in sod, 2005) dokazal le od 0-odstotno do 2,3-odstotno stopnjo različnosti nukleotidnega zaporedja gena G.



Slika 2-6: Geografska razporeditev 3 glavnih genskih skupin (U, M in L) na zahodni obali Severne Amerike. Povzeto po: Kurath in sod. (2003).

Na osnovi opravljenih filogenetskih analiz virusne izolate IHN iz Hagerman Valleyja (ZDA) uvrščamo v gensko skupino M (Kurath in sod., 2003). Pri virusnih izolatih IHN so v obdobju tridesetih let v Hagerman Valleyju dokazali višjo stopnjo različnosti kot pri katerem koli virusnem izolatu IHN znotraj večjih geografskih regij Severne Amerike, kjer so dokazali virus IHN. Na različnost virusnih izolatov naj bi vplivalo specifično okolje akvakulture v Hagerman Valleyju. Ob vsakoletni naselitvi nove neimune populacije rib je prišlo do pogoste replikacije virusa, ki je pozitivno vplivala na pogoje prilagajanja, tudi zaradi konstantne temperature okolja. Na različnost in hitro evolucijo virusa naj bi vplivalo tudi nekaj »hot spot« mest za nesinonimne mutacije v mid-G regiji (Troyer in Kurath, 2003).

Tudi Kolodziejek (2008) poroča le o 4,4-odstotni različnosti v nukleotidnem zaporedju mid-G regije gena za glikoprotein avstrijskih izolatov virusa IHN, kar samo potrjuje, da je bil genom virusa IHN izpostavljen le nekaj rekombinacijam.

2.7 VRSTE RIB, KI SO DOVZETNE ZA OKUŽBO Z VIRUSOM IHN

V obdobju zadnjih 10 let so virus IHN izolirali iz številnih novih vrst rib. Posledično se je število dovzetnih vrst za virus IHN tudi povečalo. Sprva so predvidevali, da je gostiteljska vrsta omejena le na rod *Oncorhynchus*. Bolezen IHN se najpogosteje pojavlja pri šarenki,

jeklenoglavki, rdečem lososu in njegovi juvenilni razvojni obliki, kraljevem lososu in keti (Wolf, 1988). Za okužbo z virusom IHN je dovzeten tudi klarkov losos (Parisot, 1962; Groberg, 1983) in atlantski losos (Mulcahy in Wood, 1986). Virus so dokazali tudi pri potočni zlatovčici (*Salvelinus fontinalis*) (LaPatra in sod., 1993c), čeprav veljajo predstavniki rodu *Salvelinus* za relativno odporne na okužbo z virusom IHN (Bootland in sod., 1994).

Pri vrstah srebrni losos (*Oncorhynchus kisutch*) in grbasti losos (*Oncorhynchus gorbuscha*) o epizootijah ne poročajo, v eksperimentalnih pogojih okužba z virusom visoke infektivnosti povzroča zgolj nizko smrtnost zaroda pri srebrnem lososu (Wingfield and Chan, 1970; Wingfield in sod., 1970; Chen in sod., 1990), pri grbastem lososu pa smrtnost ni bila dokumentirana (Follett in sod., 1997). Obe vrsti sta na seznamu dovzetnih vrst za okužbo z virusom IHN (EFSA, angl. *European Food Safety Authority*, 2008; Direktiva Sveta 2006/88/ES), saj so virus izolirali in dokazali pri odraslih ribah (LaPatra in sod., 1989; Eaton in sod., 1991) in pri zarodu pri naravni okužbi ter tudi pri ribah, ki so bile eksperimentalno izpostavljene okužbi z virusom IHN (Hedrick in sod., 1987; LaPatra in sod., 1989; Chen in sod., 1990).

Na seznamu občutljivih vrst za okužbo z virusom IHN ni najštevilnejše in najbolj razširjene vrste postrvi, potočne postrvi (*Salmo trutta fario*), ki jo najdemo skoraj v vseh slovenskih vodotokih in soške postrvi (*Salmo marmoratus*). LaPatra in Fryer (1990) poročata o zmerni občutljivosti potočne postrvi v opravljeni eksperimentalni študiji. Potočna postrv predstavlja največjo nevarnost kot asimptomatski prenašalec virusa, in kot taka predstavlja neposredno nevarnost okužbe za bolj dovzetne vrste (Enzmann in sod., 1993).

Kljub temu da lahko večina salmonidnih rib predstavlja vektor okužbe, med posameznimi vrstami rib in tudi znotraj posamezne vrste obstajajo velike razlike glede dovzetnosti rib za okužbo z virusom IHN. Izmed pacifiških salmonidnih vrst rib veljata za najbolj dovzetni vrsti rdeči losos in šarenka, sledita jima keta in grbasti losos in kot najmanj občutljiva vrsta izmed naštetih kraljevi losos (Traxler in Miller, neobjavljeni podatki). Virus IHN lahko občasno dokažemo tudi pri srebrnem lososu, ki načeloma velja za manj dovzetno vrsto rib za okužbo z virusom IHN (LaPatra in sod., 1989). Od vseh pacifiških lososov je najbolj dovzeten za okužbo atlantski losos (*Salmo salar*). Določeno stopnjo odpornosti proti virusu IHN so dokazali v opravljenih študijah pri šarenki (Rodriguez in sod., 2004) in atlantskem lososu (Miller in sod., 2004). Glede na rezultate omenjenih študij obstaja upanje, da bi s pomočjo selekcijske vzreje tudi pri atlantskem lososu po določenem obdobju stimulirali mehanizme odpornosti proti virusu IHN. Posebno dovzetne za okužbo so mladice, ki že po nekaj dneh

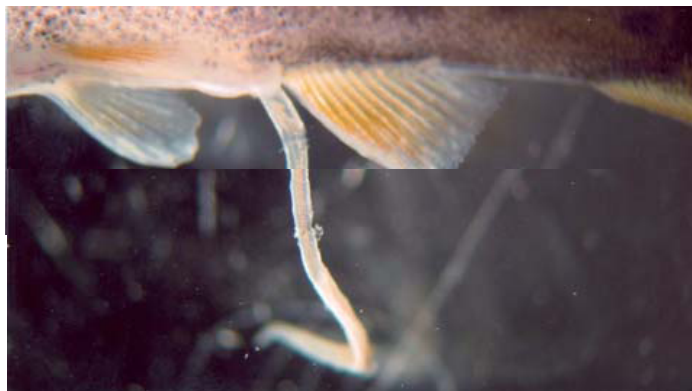
kažejo klinične znake obolenja IHN. Prvi pogini nastopijo 4–5 dni po okužbi, vrhunec dosežejo po 10 dneh, po 40 ali 50 dneh pa se smrtnost v populaciji rib zaradi okužbe z virusom IHN ne pojavlja več (Kim in sod., 1999).

2.8 KLINIČNA SLIKA BOLEZNI IHN

Klinični znaki in histopatologija bolezni IHN so dobro raziskani pri mladih salmonidih (Amend in sod., 1969; Amend, 1970; Amend in Smith, 1974; Yasutake, 1970; Pilcher in Fryer, 1980, a,b; Nicholson, 1982; Wolf, 1988). Za akutno obliko bolezni je značilna nenadna povečana smrtnost. V tej fazi obolenja ni izraženih kliničnih znakov in ribe poginejo brez očitnega vzroka. Ko ribe zbolijo, se pojavi letargija, slabotno plavanje pa se občasno izmenjuje z nenormalnimi akcijami vrtenja, plavanja vertikalno ali v krogih. Tako obnašanje običajno spremlja terminalno fazo bolezni. Pri moribundnih mladich lahko opazimo še temnejše obarvanje kože (Slika 2-7), razširjen abdomen, eksoftalmus, blede škrge, iz analne odprtine pa se običajno vleče belo obarvan pseudofeces (Slika 2-8).



Slika 2-7: Zarod šarenke, ki je bil eksperimentalno izpostavljen virusu IHN. Med značilne klinične znake bolezni IHN prištevamo temnejše obarvanje kože in eksoftalmijo, kar je opazno pri mladici v spodnji polovici slike (<http://wfrc.usgs.gov/fieldstations/hq/ihn.html>).



Slika 2-8: Pseudofeces. Povzeto po: Matras in sod. (2006).

Na bazi plavuti, ob straneh vzdolž telesa in občasno na škrgah, ustih, očeh, koži in mišičnini lahko opazimo petehialne krvavitve (Slika 2-9). Pri zarodu kraljevega lososa lahko opazimo subdermalno takoj za področjem glave hemoragična mesta (Yasutake, 1970; Amend in Smith, 1974).



Slika 2-9: Enostranski eksoftalmus in petehialne krvavitve okoli očesa pri mladici postrvi.
(<http://www.nacse.org/home/news/>)

Pri odraslih ribah so klinična znamenja bolezni manj izražena. Pri lososih so značilne hemoragije v neposredni bližini plavuti (Traxler, 1986), nenormalno plavanje, krvavitve po škrgah in na očeh, odebeljene in zlepljene škrgne lamele ter kutane lezije (Burke and Grischowsky, 1984).

Pri mladica so zaradi anemije, ki je splošno opazna pri sekciji, jetra, vranica in ledvice blede. Prisoten je lahko ascites, želodec pa je napolnjen z vsebino motno bele barve. V črevesju je vodena, rumenkasta vsebina. Pikčaste krvavitve opazimo po visceralnem maščevju, mezenteriju, peritoneju, ribjem mehurju, v meningah in na perikardu (Rucker in sod., 1953; Ross in sod., 1960; Wolf, 1988). Poginule odrasle ribe imajo prazen želodec, črevesje pa napolnjeno z mukozno, rumenkasto vsebino. Vidne so tudi lezije v mišičnini poleg ledvic (Traxler, 1986).

2.9 PATOHISTOLOŠKE SPREMEMBE

Pri mladica je najbolj prizadeto hematopoetsko tkivo ledvic in vranice. Je tudi prvo tkivo, na katerem so opazne obsežne nekroze (Amend in sod., 1969; Yasutake, 1970). V nedavnih

študijah, ki so bile opravljene pri šarenki, so po 24 urah po infekciji virus dokazali v epitelih celicah večine organov. Virus ima IHN izrazit tropizem za vezivno tkivo (Drolet in sod., 1994).

Pri lososu lahko virus IHN dokažemo v anteriornem delu ledvic približno en dan pred pojavom virusa v posteriornem delu ledvic (Yasutake in Amend, 1972). V anteriornem delu ledvic se najprej pojavijo majhna, svetla, omejena žarišča, v katerih se nahajajo makrofagi in degenerirane limfoidne celice. Ko bolezen napreduje, so tudi degenerativne spremembe na ledvicah bolj opazne. Število makrofagov poraste, v citoplazmi makrofagov se lahko pojavijo vakuole. Kromatin je zgoščen ob jedru (Klontz in sod., 1965; Yasutake in Amend, 1972). Opaziti je upad nediferenciranih blastnih celic, prisotne so lahko piknotične in nekrotične limfoidne celice. Omejena žarišča celic v vranici, pankreasu, jetrih, adrenalnem korteksu in črevesju kažejo na polimorfizem, kromatin je zgoščen, možna je tudi nekroza (Amend in sod., 1969; Wolf, 1988). Nekroza ledvic je lahko tako obsežna, da so opazni le še ostanki debrija (Wolf, 1988). Ekstenzivno nekrozo organov spremlja piknoza, karioheksa in karioliza (Yasutake in Amend, 1972). Za alimentarni trakt so patognomonične degeneracija in nekroza granularnih celic v *lamini proprii*, *stratum compactum* in *stratum granulosum* (Yasutake, 1970, Wolf, 1988). Pri lososih lahko v jetrih opazimo kopičenje ceroida (Wood in Yasutake, 1956; Yasutake, 1970). V končnem stadiju bolezni je nekroza prisotna tudi v glomerulih in tubulih ledvic (Wolf, 1988).

Pri enoletnicah ni opaziti tako obsežnih histopatoloških sprememb (Yasutake, 1978; Burke in Grischowsky, 1984; Traxler, 1986).

Pri rdečem lososu v času drsti ni bilo opaziti tako obsežnih nekrotičnih področij v hematopoetskem tkivu kot pri zarodu (Yamamoto in sod., 1989). V vranici so bila na periferiji ali ob celični membrani opazna majhna žarišča lezij. Podobne spremembe so bile opazne tudi na škregah, nekaj škržnih lističev pa je imelo infekcijo omejeno na nediferenciran celični sloj, pričvrščen na bazalno membrano epitelnega tkiva.

Hematološke spremembe, kot so levkopenija z degeneriranimi levkociti, nevtropenija in degenerirani trombociti, se pojavijo predvsem pri okuženi populaciji mladice. Močno naraste število nezrelih eritrocitov (Watson in sod., 1954; Wood in Yasutake, 1956; Holway in Smith, 1973; Amend in Smith, 1974; 1975). Amend (1973) je celo mnenja, da gre za normocitno aplastično anemijo. Nekrobiotična telesca in celični debrij, ki jih opazimo v krvnih razmazih ali odtisu ledvic, so patognomonični za bolezen IHN (Holway in Smith, 1973; Amend in Smith, 1974, 1975; Wolf, 1988). Pri okuženih ribah so se vrednosti hematokrita in vsebnost

hemoglobina, bikarbonatov, kalcija, fosforja, kloridov in bilirubina v krvi zmanjšane, zvišana pa je laktat dehidrogenaza (Amend in Smith, 1974).

2.10 IMUNSKI SISTEM IN IMUNSKI ODGOVOR PRI RIBAH

Področje imunologije rib je precej manj raziskano kot področje imunologije sesalcev in ptic. Izsledki kažejo, da sta zgradba in delovanje imunskega sistema pri ribah podobna kot pri sesalcih, vendar obstajajo nekatere zanimive razlike, ki jih bomo predstavili v nadaljevanju. Proučevanje obrambnih mehanizmov rib poteka v dveh smereh, v primerjavi s sesalci ter v povezavi z razvojem ribogojstva in njegovih potreb (Watts in sod., 2001).

Med vretenčarji kar 40 % vse populacije pripada ribam (Tort in sod., 2003). Tako kot pri ostalih vretenčarjih tudi pri ribah zaradi boljšega razumevanja delovanje omenjenih dveh obrambnih sistemov znotraj organizma delimo na celično obrambo in humoralno obrambo ter osrednje organe, ki so vključeni v mehanizme pridobljene imunosti (Zapata in sod., 1996).

Če odmislimo samo primerjavo med telesno strukturo rib in sesalcev ter organizacijo na celični ravni, je večina primarnih oziroma osrednjih in sekundarnih oziroma perifernih limfatičnih organov prisotnih tako pri sesalcih kot pri ribah, razen bezgavk (limfnih vozlov) in kostnega mozga, ki so pri ribah odsotni (Press in Evensen, 1999).

Nespecifičen imunski odgovor je prisoten pri vseh vrstah večceličnih organizmov. Njegovo delovanje sproži vsaka ohranjena molekularna struktura potencialnega patogena preko receptorjev, ki so kodirani v zarodni liniji (Medzhitov in Janeway, 1997). Tako je glavna prednost nespecifične imunske obrambe širok spekter obrambnih funkcij organizma, ki ima pri ribah še večjo vlogo kot pri sesalcih. Pri ribah se mehanizmi pridobljenega imunskega sistema sprožijo kasneje kot pri sesalcih, imunski odgovor organizma, ki temelji na imunskem spominu, pa je običajno slabo izražen (Nahm in sod., 1992; Pilstrom in Bengten, 1996). Razlog naj bi bil v temperaturi okolja (Bly in Clem, 1992).

Značilnost nespecifične imunosti so fizikalno-kemijski faktorji. Govorimo o inducibilnih faktorjih, kot so vnetni mediatorji in proteini akutne faze, ki sodelujejo v odgovoru organizma na vdor patogena (Secombes, 1996).

Med mehanizme zunanje naravne obrambe spada keratinska plast epitela kože in sloj sluzi, ki predstavljata mehanični oviri za večino kužnih klic. Dorson in Torhy (1993) sta dokazala pomembnost mehanizmov zunanje naravne obrambe, kamor štejemo predvsem zdravo in

nepoškodovano kožo. V raziskavi sta dokazala odsotnost repikacije virusa VHS v epidermalnem sloju kože pri šarenki, dokazan pa je bil v dermisu in stenah žil.

Pri ribah so bili opisani defenzini in prav mukozni sloj na površini kože je bogat vir antibakterijskih encimov (Manning in Nakanishi, 1994), ki predstavljajo prvo obrambno linijo tudi pri ikrah, saj varujejo embrio do razvoja mehanizmov specifične obrambe (Yousif in sod., 1991). Encim lizocim pri ribah zajema širši spekter protimikrobne obrambe, saj deluje tako proti Gram negativnim bakterijam, ki pri ribah predstavljajo večino populacije patogenov, kot proti Gram pozitivnim bakterijam (Yano, 1996; Grinde in sod., 1988). Pri nekaterih vrstah rib (atlantski losos, iverka) je prav količina lizocima, ki sodeluje v imunskem odgovoru, pokazatelj uspešne obrambe organizma (Yano, 1996).

Tudi fagocitna aktivnost je pri ribah dobro raziskana. Analogno vlogo naravnih celic ubijalk, ki so prisotne pri sesalcih, imajo pri ribah določeni levkociti, ki jih imenujemo naravne citotoksične celice (Secombes, 1996).

Izmed vnetnih mediatorjev, ki so bili opisani pri ribah in ki sprožajo izločanje serumskih proteinov oziroma proteinov akutne faze iz jeter, so najpogostejše omenjeni citokini, posebej interlevkin – 1 (IL – 1), interlevkin – 6 (IL – 6) in dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α) (Secombes in sod., 1999). Njihova naloga je onemogočiti razmnoževanja patogenov (npr. virusov) in tako preprečiti ali vsaj zmanjšati poškodbe na gostiteljski celici. Pri ribah so dokazali in opisali vpliv številnih serumskih beljakovin, kot so fibrinogen, haptoglobin, ceruloplazmin, α 1-antitripsin in α 2-makroglobulin, ki krepijo odpornost organizma (Yano, 1996; Ellis, 1999). Opisani so bili tudi C-reaktivni protein, serumski amiloid A in serumski amiloid P, vendar njihova funkcija v imunskem odgovoru pri ribah še ni popolnoma raziskana (Jensen in sod., 1997).

Limfatični organi pri ribah so ledvica, vranica in timus. Pri ribah predstavlja glavni imunski organ, ki je odgovoren za hematopoetske funkcije, anteriorni del ledvic (Meseguer in sod., 1995; Zapata in sod., 1996). Pri ribah so ledvice organ v obliki črke Y in ležijo vzdolž telesne osi (Tort in sod., 2003).

Naloge ledvic so fagocitoza (Danneving in sod., 1994), antigensko procesiranje (Kaattari in Irwin, 1985; Brattgjerd in sod., 1996), ustvarjanje protiteles in imunski spomin (Herraez in Zapata, 1986; Tsuji in Seno, 1990). Anteriorni del ledvic je tudi pomemben endokrini organ, homologen sesalskim adrenalnim žlezam, ki izločajo kortikosteroide in druge hormone. Je dobro oživčen organ, ki je preko simpatičnih živčnih vlaken povezan z možgani. Zato ta organ predstavlja pomemben organ s ključnimi regulatornimi funkcijami in predstavlja dober

model za analizo vplivov regulacijskih dražljajev (živčni in endokrini sistem) na imunski sistem (Tort in sod., 2003).

Ledvice, posebej prednji del – *pronephros*, predstavljajo pri ribah najpomembnejši hematopoetski organ, ki je izgubil sekretorno vlogo, ki pa jo imata še srednji in zadnji del ledvic. Za razliko od višjih vretenčarjev je *pronephros* pri ribah glavni organ, odgovoren za fagocitozo, predelavo antigena, produkcijo IgM in posledično razvoj imunskega spomina preko melanomakrofagnih centrov (Danneving in sod., 1994; Brattgjerd in Evensen, 1996; Kaattari in Irwin, 1985; Herraes in Zapata, 1986; Tsujii in Seno, 1990). Tkivo prednjega dela ledvic sestavlja retikularna osnova, preprejena s številnimi tankimi krvnimi žilami. Limfatično tkivo je razporejeno difuzno v skupkih okrog krvnih žil in sinusov. V prednjem delu ledvic je veliko število nediferenciranih celic kot tudi zrelih oblik: limfocitov, granulocitov, polimorfonuklearnih celic, makrofagov in melanomakrofagov. Je tudi zelo dobro oživčen organ.

Pronefros kot aktivni, imunski del, kjer dozorevajo limfociti B, opravlja ključne regulatorne funkcije in je centralni organ imuno-endokrinih interakcij in nevro-imuno-endokrinih povezav (Meseguer in sod., 1995).

Timus je pri ribah paren organ in leži na površini v epiteliju dorzolateralno v škržni votlini. Periferna skorja in sredica sta manj očitni kot pri sesalcih. Pri sesalcih timus obdaja tkivna kapsula, pri ribah pa je samo osrednja regija timusa obdana s kapsulo, preostalo tkivo timusa je v stiku s faringealnim epitelijem. Prisotnost različnih celic, tudi makrofagov, kaže, da je timus neposredno vključen v obrambni ustroj (Powell, 2000; Zapata in Amemiya, 1999). Je mesto, kjer dozorevajo limfociti T (Powell, 2000). Involucija timusa je pri ribah bolj odvisna od hormonalnega cikla in sezonskih variacij v okolju kot od starosti (Press in Evensen, 1999). Filtracija krvi in razgradnja eritrocitov se vršita v melanomakrofagnih centrih, ki so skupki nakopičenih makrofagov in elipsoidnih kapilar. V teh centrih se antigeni v obliki imunskih kompleksov zadržujejo daljši čas (Espenes in sod., 1995). Glede sestave celic je timus pri ribah enak timusu pri sesalcih vključno s timociti. Pri cebi, ribi iz družine krapovcev, ki je pogosto predmet znanstvenih raziskav, je timus sestavljen iz obsežne sredice in obsežnega področja skorje, v kateri se nahajajo nezreli limfociti (Trede in Zon, 1998). Limfociti so imunsko zmožne celice, ki v telesu specifično spoznajo in razločujejo različne epitope (antigenske determinante). V začetnem stadiju razvoja nimajo površinskih receptorjev in se zato ne odzivajo na spodbujanje z antigenom. Ko dozori, izražajo receptorje za antigen, postanejo odzivni na antigen in se razvijajo v funkcijsko različne razrede (Vozelj, 2000).

Omeniti moramo tudi T-celični receptor (TCR), receptor ali vezišče za antigen na celici T, ki prepozna peptidni antigen v povezavi z molekulami poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC). Raziskovalci so ugotovili tudi gen RAG, sicer značilen za nezrele celice B, ki spodbuja rekombinacijo imunoglobulinskih genov in je odločilen pri preurejanju imunoglobulinskih genov (Trede in Zon, 1998).

Naloga limfocitov B je pri ribah enaka kot pri sesalcih, to je ustvarjanje in izločanje protiteles. Z antigenom spodbujena aktivacija in diferenciacija zrelih celic B poteka v perifernih limfatičnih organih in v njih se razvije humoralni odziv. Ta posreduje odstranjevanje antigena, pa najsi gre za bakterije, toksine, celice, okužene z virusi, ali tumorske celice.

Zrele celice B, spodbujene z antigenom (aktivirane celice B), se razmnožujejo in diferencirajo v specifična protitelesa izločajoče plazmatke in spominske celice B, katerih stimulacija sproži sekundarni protitelesni odziv (Press in Evensen, 1999; Vozelj, 2000).

Ribe nimajo kostnega mozga (Corbel, 1975). Ekvivalentni organ kostnemu mozgu pri morskem psu in pri raži kot predstavnikoma podrazreda *Elasmobranchii*, ki v okviru znanstvene klasifikacije spada v razred hrustančnic (*Chondrichthyes*), predstavlja leydigov organ (Fänge in Mattisson, 1981). Je anatomsko posebnost, ki pa jo biologi odkrivajo pri vse več vrstah.

Prvič ga je leta 1685 omenil danski anatom Nicolaus Steno, in sicer pri predstavniku skatov (red *Rajiformes*), leta 1857 pa ga je nemški histolog Leydig, po katerem se organ imenuje, interpretiral kot limfni voz. Nahaja se med mišičnino in požiralnikom in zato ga imenujejo tudi ezofagealno limfomieloidno tkivo. S svetlobno in elektronsko mikroskopijo je bilo dokazano, da v njem nastaja veliko število granulocitov in limfocitov.

Leydigov organ sestoji iz dveh belkastih gmot, ki se nahajata dorzalno in ventralno ob požiralniku. Tkivo sestavljajo nezreli in zreli levkociti, vključeni v stromo veznega tkiva. Posamezne režnje, sestavljene iz tesno prilegajočih se celic, ločujejo neenakomerno razporejene žile. V režnje vstopajo majhne arterije. To tkivo – iz vidika histologije – nadomešča kostni mozeg, kot ga poznamo pri kopenskih vretenčarjih, kljub temu da ne ustvarja rdečih krvnih teles in ne vsebuje maščobnega tkiva.

Prevladujoče celice so granulociti (eozinofilni in heterofilni, ki jih glede na strukturne razlike v granulah delimo na tri tipe: tip A, B in C) in negranulirane celice z bazofilno citoplazmo (limfociti različnih velikosti, trombociti, plazmatke in monociti). Levkociti (največkrat blastne celice, eozinofilni granulociti in majhni limfociti) se pogosto združujejo v foliklom podobne strukture.

Pri nekaterih vrstah iz podrazreda *Elasmobranchii* je ta organ lahko zelo velik – dokumentirani so podatki o 1,6 kg leydigovem organu pri 1,8 m velikem morskem psu (*Hexanchus corinus*) – pri nekaterih vrstah iz podrazreda *Elasmobranchii* pa se namesto tega organa, pojavlja limfomioidno tkivo, združeno z gonadami. To združeno tkivo imenujemo epigonalni organ.

Večina vrst iz podrazreda *Elasmobranchii* ima oba organa, tako leydigov organ kot epigonalni organ (Mattisson in Fänge, 1982).

Predvidevajo, da so se pred 450 milijoni let pri nevretenčarjih in ribah brezčeljustnicah prvič pojavili zametki pridobljenega imunskega odgovora kot rezultat podvojevanja genov zarodne linije, ki naj bi ga sprožil retrovirus (Schluter in sod., 1999). Govorimo o komponentah, ki so homologne protitelesom, T-celičnim receptorjem in molekulam pglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa (Secombes in sod., 1983). Prave kostnice so prva skupina živali v filogenetskem drevesu, pri katerih so dokazali protitelesno aktivnost, ki jo predstavlja preprosta oblika protitelesa (Magnadottir in sod., 2005).

Pri ribah se protitelesa nekoliko razlikujejo od protiteles pri sesalcih. Pri ribah iz razreda žarkoplavutaric (*Actinopterygii*), kamor uvrščamo večino vrst rib, je bil dokazan samo en razred protiteles, ki ustreza protitelesom razreda M pri sesalcih. Določili so ga na osnovi analize molekulske teže teške verige. Pri sesalcih so IgM sestavljeni iz petih podenot, pri ribah pa so običajno tetramerne oblike. Vsaka od podenot sestoji iz dveh težkih in dveh lahkih verig, vse štiri pa so med seboj kovalentno povezane z disulfidnimi vezmi. Tetramerna struktura z osmimi vezavnimi mesti je pri vezavi antigena manj učinkovita kot pa pentamerni analog pri sesalcih (Lobb in Clem, 1981).

Miller je s sodelavci (1998) poročal o novem razredu protiteles, IgD, ki ga je opisal pri somu, dokazan je bil tudi pri atlantskem lososu in potočni postrvi (Hordvik in sod., 1999).

Protitelesa nevtralizirajo (npr. virus), pospešijo in olajšajo fagocitozo s pomočjo opsonizacije ter aktivirajo komplement po klasični poti (Vozelj, 2000).

Največ imunoglobulinskih molekul je v krvi, telesnih tekočinah in izločkih, na površini celic B pa deluje kot receptor antigena. Torej ločimo serumske in sekrecijske imunoglobuline (Vozelj, 2000).

Pri ribah hrustančnicah imunoglobulinske verige kodirajo številne skupine genov na različnih kromosomih. Pri genih za variabilno regijo (V_H in V_L) obstajajo minimalne razlike v sekvencah, medtem ko sta pri ribah kostnicah izbor genov in posledično sekvence zelo raznovrstni in podobni sesalskim. To je posledica genskih mehanizmov, kot sta preurejanje

DNA in cepljenje RNA. Pri sesalcih se z nekaterimi genskimi mehanizmi, kot so preurejanje genskih odsekov, različnost stikov, somatske mutacije in različnost povezovanja lahkih in težkih imunoglobulinskih verig, zagotavlja ustrezna raznovrstnost protitelesnih molekul (Bengten in sod., 1994).

Po imunizaciji z določenim antigenom se protitelesa pri ribah ne pojavljajo samo v krvi, ampak so jih dokazali tudi v sluzi in žolču (Craig in sod., 1981).

Čeprav so protitelesa parameter pridobljene imunosti, naravna protitelesa uvrščamo med komponente naravne imunosti.

Naravna protitelesa nastanejo v odsotnosti preurejanja genskih odsekov in brez očitne specifične antigenske stimulacije. Organizem jih tvori po ukazih genskega zapisa. So imunoglobulini v serumu pri različnih vrstah rib (Carroll in Prodeus, 1998). Pri ribah so naravna protitelesa dobro znana in dokazano je bilo, da igrajo pomembno vlogo tako v prirojeni kot v pridobljeni imunski obrambi (Gonzalez in sod., 1988).

Pri ribah je odgovor protiteles na določen antigen poliklonalen, kljub temu pa je število oziroma titer protiteles proti enemu antigenu občutno nižji kot pri sesalcih (Magnadottir, 2006).

Na imunski sistem vplivajo endogeni dejavniki kot tudi okoljski parametri, od katerih je najpomembnejša temperatura. Pri nižji temperaturi je sposobnost specifičnega odgovora organizma močno oslABLJENA, z razlikami med posameznimi vrstami rib. Drug pomemben dejavnik je prehrana, ki je lahko razlog za velike razlike znotraj ribje populacije v naravnem okolju (Watts in sod., 2001).

Tudi cela vrsta kemikalij, vključno s pesticidi, ki se uporabljajo v kmetijstvu, in z antibiotiki, ki se uporabljajo v ribogojstvu, močno vpliva na imunski odgovor rib.

Celice imunskega sistema imajo tako pri ribah kot pri ostalih vretenčarjih enake karakteristike in funkcije. Zgodaj v hemopoezi se pluripotentna matična celica diferencira v dve smeri, pri čemer nastaneta ali limfoidna matična celica ali mieloidna matična celica. Tipi in količina rastnih faktorjev, ki so v mikrookolju, kjer se nahaja matična celica, usmerjajo njeno diferenciacijo. Limfoidne matične celice se diferencirajo v izhodiščne ali progenične celice limfocitov B in T. Iz mieloidne matične celice se razvijejo progenične celice za eritrocite in za različne levkocite, nevtrofilce, eozinofilce, bazofilce, monocite, mastocite, ki nato vstopijo v kri (Vozelj, 2000).

Pri ribah so dokazali družine celic limfoidnega kot tudi mieloidnega porekla (Scapigliati in sod., 1999).

Levkociti so celice v limfatičnih organih in v krvi ter so po morfoloških značilnostih podobni ustreznim celicam pri sesalcih, sestavljajo pa jih mali in veliki limfociti, plazmatske celice, monociti, makrofagi, granulociti, polimorfonuklearne celice in mastociti.

Granulociti pri ribah so zelo podobni sesalskim. Razlikujemo 3 različne tipe granulocitov, in sicer nevtrofilne, eozinofilne in bazofilne granulocite. Pri različnih vrstah rib so bili opisani številni morfološko različni granulociti. Eozinofilni in bazofilni granulociti imajo pomembno vlogo pri obrambi proti parazitom, naloga nevtrofilnih granulocitov sta fagocitoza in baktericidna aktivnost preko oksidativnega izbruha (Pastoret in sod., 1998).

Monociti in makrofagi so mononuklearne celice, ki so odgovorne za fagocitozo. Monociti krožijo po telesu, makrofagi pa so fiksirani in jih lahko najdemo v vranici, ledvicah in srcu.

Melanomakrofagi so makrofagi, ki vsebujejo različne pigmente, kot je melanin, lipofuscin, ceroid in hemosiderin, in so posebnost v obrambnem sistemu rib. Melanomakrofagi so v glavnem v vranici, ledvicah in jetrih, včasih pa tudi v drugih organih. Pri zdravih ribah se te celice akumulirajo s starostjo in tvorijo melanomakrofagne centre. Vloga melanomakrofagov je kompleksna in še ne povsem raziskana (Basurco, 1995).

Ocena delovanja imunskega sistema pri ribah temelji na testiranju oziroma pregledu različnih tkiv in telesnih tekočin z vrsto seroloških in imunoloških testov. Serološki testi vključujejo analizo krvne slike (hematokrit, koncentracija plazemskih proteinov) in analizo celotne koncentracije imunoglobulinov, lizosomov in aktivnosti komplementa, ki pa so boljši pokazatelji imunske zmožnosti organizma. Analiza celične imunske funkcije vključuje izolacijo levkocitov, meritev njihove sposobnosti migracije (kemotaksa), požiranje tujih delcev (fagocitoza) in test kemiluminiscence. Encimskoimunski test (ELISA, angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se uporablja za meritev oziroma oceno stopnje produkcije protiteles proti specifičnemu proteinskemu antigenu ali bakteriji (Verlhac in Kiron, 2004).

2.10.1 Imunski odgovor rib na okužbo z virusi

Virusne bolezni pri ribah povzročajo velike izgube. Večina virusov prizadene mlajše kategorije rib, preživele ribe pa v veliki meri ostajajo pritrjeni nosilci virusa, ki predstavljajo za ostalo populacijo rib neposredni vir okužbe. Pogosto lahko pri ribah, ki so prikriti nosilci

virusa, iz ledvic izoliramo nizke količine virusa. Za bolezen IPN je značilno, da se povzročitelj bolezni, ki se razmnožuje v ledvicah, izogne procesom fagocitoze in citolitičnim učinkom. Kljub številnim raziskavam, ki so bile opravljene do danes, pa obstaja še mnogo neodgovorjenih vprašanj glede virusnih mehanizmov okužbe gostitelja in prenosa okužbe (Johansen in Sommer, 1995).

Prirojen obrambni mehanizem ob okužbi z virusi vključuje aktivnost naravnih citotoksičnih celic, organizem na okužbo z virusi odgovori tudi s produkcijo interferonov. Pri obrambi proti okužbam z rbdovirusi igra najpomembnejšo vlogo pri nevtralizaciji virusa komplementni sistem. Njegovo aktivacijo sproži protitelesni odgovor organizma. Ostali dejavniki naravne obrambe vključujejo lektine, ki se vežejo na glikozilirane ostanke na površini virusov, in lizine, ki poškodujejo ovojnico virusov, vendar so podatki o tem skopi (Ellis, 2001).

Interferonski sistem je hiter in učinkovit mehanizem protivirusne obrambe pri vretenčarjih. Pri šarenki se produkcija interferonov pri okužbi z virusom VHS sproži že po 2 dneh. Pojavi se lahko že pri zarodu (na primer pri zarodu šarenke) (Boudinot in sod., 1998). Ker so mehanizmi obrambe organizma s sproščanjem interferonov na voljo že v zelo zgodnjih stadijih razvoja, večina avtorjev ugotavlja, da interferonski sistem predstavlja določeno stopnjo zaščite organizma do pojava specifične imunske obrambe (Ellis, 2001). Dorson s sodelavci (1994, 1995) povzema, da je stopnja sinteze interferonov odraz stopnje viremije.

V zgodnji fazi virusne okužbe je zelo pomembna funkcija naravnih celic ubijalk. Njihova naloga je uničenje okuženih celic in s tem omejitev infekcije. Dokazan je bil citotoksičen vpliv levkocitov ledvic pri šarenki in atlantskem lososu. Na celičnih linijah RTG-2 in celicah atlantskega lososa je bila opažena povečana stopnja citotoksičnosti v primeru, ko so bile celične linije okužene z virusom IPN. Dokazan je bil tudi močan obrambi mehanizem citotoksičnih celic, saj so bile okužene celice uničene, še preden je potekla ekspresija celotnega genoma virusa (Hogan in sod., 1996).

LaPatra je s sodelavci (1998) dokazal, da so bile šarenke, ki so jim intraperitonealno vbrizgali polisaharid β -glukan, bolj odporne na okužbo z virusom IHN kot pa kontrolna skupina rib, ki so jim vbrizgali le fiziološko raztopino. Po okužbi z virusom IHN je odpornost naraščala do tretjega tedna po okužbi in je trajala 58 dni. Mehanizem obrambe še do danes ni popolnoma pojasnjen.

Protitelesa, poglavitne molekule humoralne imunosti, spodbudijo aktivacijo klasične poti komplementnega sistema. Lorenzen je s sodelavci (1999) dokazal vpliv nevtralizacijskih protiteles na aktivacijo komplementnega sistema, ni pa mu uspelo nazorno prikazati vpliva

fragmenta C3 komplementnega sistema. Tako ostaja delovanje celotnega mehanizma komplementnega sistema pri ribah še vedno neznanka. Najverjetneje je aktivacija komplementnega sistema pri virusnih okužbah vezana na prisotnost virusov z ovojnico. Komplementni sistem z oblikovanjem popolnega litičnega kompleksa namreč poškoduje in lizira virusni partikel (Ellis, 2001).

2.11 DIAGNOSTIČNE METODE

Metode, ki jih uporabljamo v diagnostiki bolezni IHN, morajo biti hitre, enostavne, občutljive, specifične, poceni, diagnostični postopek pa mora biti prilagojen testiranju velikega števila vzorcev. Sprva sta bili v diagnostiki bolezni za dokaz virusa IHN na voljo le dve metodi, in sicer izolacija virusa na celični kulturi in identifikacija virusa z nevtralizacijskim testom (Amend, 1970). Omenjeni klasični metodi sta bili široko sprejeti in se še danes uporabljata kot temeljni metodi.

Postavljena diagnoza bolezni IHN mora biti potrjena z izolacijo virusa IHN in njegovo identifikacijo. Navodila za vzorčenje in diagnostični postopki so vsako leto predpisani v Diagnostičnem priročniku (angl. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Aquatic Animals*) Mednarodne organizacije za zdravje živali.

Tkivo, ki ga bomo odvzeli pri vzorčenju, je odvisno od velikosti ribe in zdravstvenega statusa jate. Preferenčno ob sumu na bolezen odvajamo ledvice, vranico, možgane in srce (LaPatra in sod., 1989; OIE, 2009). V primeru testiranja plemenskih jat predstavlja preferenčni vzorec ovarialna tekočina ob drstitvi. Manj pogosto vzorčimo semensko tekočino, ker so vzorci spermalne tekočine v postopku izolacije virusa na celični kulturi manj ustrezni in so v njih virus IHN redkeje dokazali (Mulcahy in sod., 1984; LaPatra in Groberg, 1985; Mulcahy in Pascho, 1986; Mulcahy in Batts, 1987; LaPatra in sod., 1990). Virus IHN je zelo podvržen encimski razgradnji, zato se izogibamo vzorčenju tkiva z visoko stopnjo encimske aktivnosti, kot so na primer jetra ali drobovje.

Zlati standard pri dokazovanju virusa IHN ostaja izolacija virusa na občutljivi celični kulturi, ki ji sledi serološka diagnostika (virus nevtralizacijski test (VNT), imunoperoksidazni (IP) test, indirektni imunofluorescenčni test (IFAT) ali encimskoimunski test (test ELISA) ali molekularna identifikacija povzročitelja bolezni. Pri dokazovanju virusa IHN uporabljamo tudi elektronsko mikroskopijo.

2.11.1 Neposredne metode dokazovanja virusa IHN

2.11.1.1 Izolacija virusa na celični kulturi

V laboratorijski diagnostiki lahko za razmnoževanje virusa IHN uporabimo več občutljivih celičnih linij, kot so na primer EPC, CHSE-214 (angl. *Chinook salmon embryo*) ali FHM (angl. *Fathead minnow*). Za največkrat uporabljeno in tudi najbolj razširjeno celično linijo v diagnostiki pa velja celična linija EPC.

Postopek izolacije virusa na celični kulturi opravimo po predpisanem protokolu Diagnostičnega priročnika OIE. V rastnem gojišču homogeniziran in v ustrezni razredčini pripravljen vzorec organov rib in ovarialne ali semenske tekočine inokuliramo na celično linijo EPC. Celična kultura, primerna za inokulacijo preiskovanega vzorca ali kužnine, mora biti mlada (4–48 ur po tripsinizaciji), aktivno rastoča, sloj celic pa mora prekrivati 80 % površine stekleničke, v kateri gojimo celično kulturo. Inokulirano celično linijo inkubiramo 7–10 dni pri 15 °C. Virus IHN na celični kulturi povzroča CPE. Če se po 7–10 dneh primarne inkubacije CPE ne pojavi, opravimo subkultivacijo po istem postopku, kot smo pripravili celično kulturo za primarno inkubacijo. Tako inokulirano celično linijo potem inkubiramo nadaljnjih 7–10 dni pri 15 °C.

Inokulirani primarni vzorec je lahko za celično linijo citotoksičen. V primeru pojava citotoksičnosti ali toksičnega CPE v prvih treh dneh inkubacije, takoj opravimo subkultivacijo, ki traja najmanj 7 dni, in v primeru, da se CPE ni pojavil, nadaljujemo z drugo subkultivacijo, ki traja nadaljnjih 7 dni.

V primeru bakterijske kontaminacije vzorca kljub dodatku antibiotika in antimikotika nadaljujemo s postopkom subkultivacije preiskovanega vzorca. Alikvote supernatanta preiskovanih vzorcev centrifugiramo 15–30 minut v hlajeni centrifugi pri 2000–4000 g in jih nato filtriramo skozi filtre z velikostjo por 0,45 µm (Sartorius Minisart®, Nemčija). Naprej je postopek subkultivacije preiskovanega vzorca enak kot v primeru toksičnega CPE.

Metoda izolacije virusa IHN je preprosta, občutljiva in zaradi tega široko uporabljena metoda za dokazovanje virusa IHN. Njena slabost je dolgotrajnost in stroški izvedbe postopka, saj rastno gojišče ni komercialno dostopno in si ga moramo pripraviti sami.

2.11.1.2 Imunoperoksidazni test

Identifikacijo IHNV na celični kulturi s pomočjo imunoperoksidaznega testa je prvi predlagal in tudi izvedel Leong s sodelavci (1983).

Metoda je zelo podobna indirektni imunofluorescenčni metodi dokazovanja antigena, le da pri imunoperoksidaznem testu ne uporabljamo s fluorescein izotiocianatom označenih sekundarnih protiteles, temveč so protitelesa konjugirana z encimom, največkrat s hrenovo peroksidazo.

Imunoperoksidazni test se pogosto uporablja pri študijah patogeneze bolezni IHN (Yamamoto in sod., 1989; 1990; 1992; Drolet in sod., 1994; Kim in sod., 1994). Fiksirano in osušeno celično linijo EPC, na katero smo predhodno inokulirali preiskovan vzorec organske suspenzije rib, inkubiramo z neoznačenimi, primarnimi monoklonalnimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnemu nukleoproteinu. Nevezan material speremo in dodamo s hrenovo peroksidazo konjugirana sekundarna protitelesa, ki so specifično usmerjena proti primarnim imunoglobulinom. Če so v vzorcu prisotna specifična protitelesa, se bo po dodatku AEC substrata (3-amino-9-etilkarbazol), ki ob stiku z encimom reagira, jamica mikrotitrne plošče obarvala.

Kljub temu da je metoda relativno hitra, specifična in enostavna ter ne zahteva posebne opreme, se v rutinski diagnostiki ne uporablja pogosto (Ahne, 1981; OIE, 2009). Njena pomanjkljivost je predvsem čas, ki je potreben za izvedbo celotnega postopka izolacije virusa na celični kulturi in nato še izvedba imunoperoksidaznega testa, ki pomeni še vsaj 4 dodatne ure dela, kar pa je danes, ko težimo k čim hitrejši izvedbi laboratorijskih diagnostičnih metod, težko izvedljivo.

2.11.1.3 Molekularne metode

2.11.1.3.1 Verižna reakcija s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo

Molekularne metode so se izkazale za danes skoraj nepogrešljive metode v diagnostiki bolezni IHN. Izpostaviti je treba predvsem metodo reverzne transkripcije s predhodno verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR, angl. *reverse transcription polymerase chain reaction*). Njena prednost je občutljivost, skrajšan čas izvedbe postopka dokazovanja povzročitelja bolezni in natančnost metode, saj s tipizacijo virusa lahko pojasnimo izvor virusa kot tudi pot širjenja okužbe.

RT-PCR je zelo učinkovita metoda, pri kateri s pomočjo encima reverzne transkriptaze molekulo RNA prepišemo v komplementarno DNA (cDNA) in nato s pomočjo temperaturno obstojne *Taq* DNA polimeraze pomnožujemo specifične, tarčne regije nukleinske kisline

virusnega genoma. Klasična različica metode PCR sestoji iz treh ponavljajočih se ciklov pomnoževanja: denaturacija DNA, pripenjanje začetnih oligonukleotidov na enojnovijačno DNA, ki služi kot matrica pri pomnoževanju in podaljševanju verige. Ob optimalnih pogojih se v vsakem ciklu reakcije PCR količina tarčne nukleinske kisline podvoji. Tako količina tarčnega dela nukleinske kisline med reakcijo PCR eksponentno narašča (Mackay in sod., 2002).

2.11.1.3.2 RT-PCR v realnem času

Z metodo RT-PCR v realnem času, ki predstavlja nadgradnjo klasične metode RT-PCR, lahko pomnoževanje nukleinskih kislin spremljamo že med samo encimsko reakcijo. Zato metoda PCR v realnem času velja za izredno hitro diagnostično metodo.

Reakcija poteka v termopomnoževalniku, kjer se podobno kot pri klasični izvedbi metode PCR temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih. Vsak cikel sestoji iz dveh faz, in sicer denaturacije dvojnovijačne DNA in prilaganja s fluorogenimi barvili označenih začetnih oligonukleotidov in oligonukleotidne sonde ter podaljševanja tarčne verige DNA s termično obstojnim encimom *Taq* DNA polimerazo v isti fazi posameznega cikla. Osnovni princip metode temelji na merjenju sproščene fluorescence, ki je sorazmerna količini nastalih produktov in med reakcijo narašča eksponentno. Reakcija je zaradi te lastnosti tudi bolj specifična v primerjavi s klasično izvedbo RT-PCR. Pomnoževanje in detekcija potekata sočasno, zato so rezultati v obliki sigmoidne krivulje, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov, na voljo takoj po končani reakciji (Kubista in sod., 2006).

Jakost fluorescence je v začetnih ciklih podvojevanja pod detekcijskim pragom, saj je fluorescentni signal reporterskega barvila manjši od fluorescentnega signala ozadja. Bazno linijo izračuna računalniški program na osnovi analize rezultatov prvih nekaj ciklov reakcije. Računalniški program med potekom reakcije preračuna spremembo v signalu fluorescence (ΔR_n), ki odraža razliko med fluorescenco reporterskega barvila, ki je normalizirana s fluorescenčnim signalom pasivnega referenčnega barvila (npr. ROX). Končna krivulja je podana kot razlika v jakosti normalizirane fluorescence (ΔR_n) med fluorescenco ozadja, kjer ne poteka pomnoževanje tarče (R_n^-) in povišano fluorescenco med pomnoževanjem tarče (R_n^+) (Kubista in sod., 2006, cit. v Fratnik Steyer, 2010).

V eksponentni in linearni fazi pomnoževanja je količina pomnožka že dovolj velika in zaznamo signal. Linijo fluorescentnega praga določimo v začetni fazi eksponentne rasti fluorescence. Linearni fazi sledi plato faza, kjer se zaradi zmanjšane aktivnosti encima *Taq* DNA polimeraze in zmanjšanja koncentracije začetnih oligonukleotidov in akumulacije tarčnih molekul ter tudi inhibitorjev reakcija upočasni. Število produktov PCR več ne narašča in intenziteta fluorescentnega signala se več ne povečuje. Rezultat reakcije podamo kot časovno točko oziroma število ciklov (C_t , angl. *cycle threshold*), pri katerem fluorescentni signal prečka linijo fluorescentnega praga. Čim večje je število tarčnih molekul v vzorcu, prej bo narasla intenziteta fluorescence in nižja bo vrednost C_t . Absolutno število kopij matrice v vzorcu lahko določimo s primerjavo vrednosti C_t vzorcev z vrednostmi C_t standardov z znanim številom kopij matrice (Klein, 2002). Najpogosteje uporabljena metoda določitve točke za kvantifikacijo je predhodno opisana t. i. metoda fluorescenčnega praga (angl. *threshold method*) (Logan, 2009).

PCR pridelke kvantitativno določamo na dva načina. Lahko uporabljamo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgrajujejo v dvojno vijačnico DNA (npr. SYBR[®] Green I), pri specifičnem odkrivanju nastalih produktov pa se poslužujemo dvojno označenih, fluorescirajočih oligonukleotidnih sond, ki temeljijo na fluorescenčno resonančnem prenosu energije (FRET) (Mackay, 2007). Glede na vezavo fluorogenih barvil, reporterskega in zaviralnega fluorogena, pa razlikujemo hidrolizirajoče sonde, hibridizacijske sonde, strukturirane sonde in strukturirane začetne oligonukleotide.

Primer hidrolizirajoče, dvojno označene sonde je klasična sonda TaqMan[®]. Oligonukleotidna sonda je na 5' koncu označena z najpogosteje uporabljenim reporterskim barvilom 6-karboksi-fluoresceinom (6-FAM), kot zaviralni fluorogen pa 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA) danes uspešno nadomeščajo nefluorescenčni dušilci NFQ (angl. *non fluorescent quencher*) ali BHQ (angl. *Black-hole quencher*), ki prejeta energijo oddajajo v obliki toplote. S kemično modifikacijo obstoječe TaqMan[®] sonde, pri kateri je na 3' konec poleg NFQ vezan dihidrociklopiroloindol tripeptid (DPI₃), ki ima afiniteto vezave v mali žleb molekule DNA, so sonde povečali jakost in stabilnost vezave (Kutyavin in sod., 2000). Omenjeno modificirano sondo s kratico imenujemo MGB (angl. *minor groove binder*).

2.11.2 Posredne metode dokazovanja virusa IHN

2.11.2.1 Dokaz protiteles proti virusu IHN v serumu rib

Zaradi precejšnjih razlik v jakosti in trajanju serološkega odgovora rib na virusno okužbo ostaja metoda dokazovanja ribjih protiteles ob virusnih okužbah kljub visoki občutljivosti in specifičnosti še neuveljavljena metoda v rutinski diagnostiki. Z validacijo seroloških tehnik v diagnostiki virusnih okužb rib pa bi serološke metode postale širše uporabne za diagnostične namene in predvsem kot metoda za ocenitev zdravstvenega statusa ribje populacije.

S serološkimi metodami pri ribah dokazujemo protitelesa razreda IgM.

Pri večini do zdaj omenjenih laboratorijskih diagnostičnih metodah je treba za pridobitev ustreznega vzorca ribe žrtvovati. S pomočjo serološke metode v diagnostiki bolezni IHN, ki temelji na detekciji protiteles proti virusu IHN v serumu rib, pa lahko določimo status bolezni v ribogojnici brez žrtvovanja rib.

Amend in Smith (1974) sta protitelesa proti virusu IHN prvič dokazala v virus nevtralizacijskem testu, v katerem sta uporabila toplotno obdelan serum šarenk. Hattenberger-Baudouy je s sodelavci (1989) dokazal, da je večina ribjih serumov v testu virusne nevtralizacije reagirala negativno na prisotnost specifičnih protiteles, če je inkubacija serumov in komplementa skupaj z virusom znanega titra potekala le 1 uro. Nevtralizacija virusa IHN s specifičnimi protitelesi v serumu postrvi je odvisna od komplementa in je opazna šele po 16 urah inkubacije na temperaturi do 15 °C. Toplotna inaktivacija seruma ali že enkratni postopek zamrzovanja in taljenja seruma inaktivira komplement. Test virusne nevtralizacije je ob testiranju takih serumov na prisotnost protiteles v tem primeru pomanjkljiv in nenatančen ter zato neveljaven. Zato moramo preiskovanim serumom v testu dodati komplement vsebujoči serum.

Ristow je s sodelavci (1993) predlagal, da bi lahko analogno testu virusne nevtralizacije za dokaz specifičnih protiteles proti virusu IHN uporabili test ELISA. Omenjena dva testa veljata za testa enake občutljivosti, vendar za izvedbo testa ELISA potrebujemo manj časa. Rezultati preiskav so potrdili, da je IFAT sicer najbolj občutljiva tehnika za detekcijo protiteles proti virusu IHN, se pa pri IFAT kot tudi pri testu ELISA pojavlja navzkrižna reaktivnost med virusoma IHN in VHS, ki je pri testu virusne nevtralizacije ni bilo zaslediti (Jørgensen in sod., 1991). Test ELISA je zelo uporabna diagnostična metoda v primeru obdelave velikega števila vzorcev (angl. *screening*).

Jørgensen s sodelavci (1991) priporoča pri določanju zdravstvenega statusa reje uporabo testa virusne nevtralizacije. Seveda ta diagnostična metoda zahteva ustrezno hranjenje seruma, ki

ga uporabljamo kot vir komplementa, kar pomeni dodatni čas priprave vzorcev in tehnično podkovanost.

2.12 BIOLOŠKI POSKUS, PATOHISTOLOŠKA IN IMUNOHISTOKEMIČNA PREISKAVA

Virusa IHN do zdaj niso ugotovili pri avtohtoni soški postrvi, kar daje slutiti, da je ta vrsta odpornejša. Borghesan je s sodelavci (2004) v preliminarni študiji testiral občutljivost soške postrvi na virus VHS in virus IHN. Rezultati raziskave kažejo na večjo odpornost soške postrvi v primerjavi s šarenko pri okužbi z virusom IHN. Pogin soških postrvi je bil v primerjavi s populacijo šarenk za 50 % nižji, prav tako je bil delež preživelih soških postrvi ob zaključku biološke raziskave za 100 % večji. Ker rezultati te študije niso bili statistično obdelani in ovrednoteni, lahko samo na podlagi večjega odstotka preživelih soških postrvi sklepamo na manjšo dovzetnost te vrste rib za okužbo z virusom IHN.

Za biološki poskus, v katerem smo proučevali občutljivost soške postrvi na okužbo z virusom IHN, smo izbrali jato soških postrvi in jato šarenk. Ribe smo intraperitonealno okužili z dvema različnima koncentracijama virusne suspenzije. Med biološkim poskusom smo proučevali klinično sliko in potek bolezni. Organe poginjenih in žrtvovanih rib smo proučevali patoanatomsko, histološko in virološko ter v njih ugotavljali prisotnost virusa IHN. Dobljene rezultate opravljene študije smo statistično ovrednotili s Pearsonovim hi-kvadrat testom (χ^2 test).

Tkivne vzorce šarenk in soških postrvi smo patohistološko pregledali.

Z imunohistokemično preiskavo v tkivnih rezinah dokazujemo virusne antigene in hkrati določamo njihovo lokacijo znotraj sprememb v organih in celicah. Kot specifične reagente pri imunohistokemični preiskavi uporabljamo primarna telesa proti specifičnemu antigenu ter sekundarna protitelesa, ki so največkrat označena z encimi (npr. hrenova peroksidaza), s fluorescentnimi barvili, z radioaktivnimi elementi ali s koloidnim zlatom (Ramos-Vara, 2005).

Da bodo dobljeni rezultati uporabni in jih bomo lahko interpretirali, je najpomembnejša ustreznost priprava vzorca za preiskavo. Odvzete organe je treba takoj potopiti v fiksativ. Vloga fiksativa je imobilizacija antigenov, medtem ko ostanejo celične in subcelične strukture čvrsto povezane med seboj z metilenskimi mostički ali Schiffovimi bazami, ki povezujejo bazične aminokislinske ostanke proteinov.

V imunohistokemiji uporabljamo več vrst fiksativov, najbolj pogosto 10 % puferiran formalin (Ramos in sod., 2008).

Začetna stopnja v pripravi vzorca za imunohistokemično obdelavo je torej fiksacija, ki ob minimalni deterioraciji *post mortem* in preprečitvi difuzije topnih tkivnih sestavin, ohranja osnovne morfološke značilnosti preiskovanega tkiva.

Fiksirane organe nato vklopimo v parafin. V parafinu vklopljeno tkivo je tako zaščiteno, dovolj trdo in omogoča rezanje histoloških rezin primerne debeline. Parafinske tkivne rezine so v povprečju debeline 3–5 μm . Po postopku deparafinizacije tkivnih rezin, ki sestoji iz obdelave v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov, vse do destilirane vode, sledi razkrivanje antigenov, saj včasih postopek fiksacije in vklop tkiva v parafin inhibirajo vezavo primarnih protiteles na antigen. S postopkom razkrivanja antigena obnovimo ali razkrijemo antigen. Med inkubacijo tkiva v primarnemu protitelesu nastajajo imunski kompleksi, na katere se nato veže sekundarno protitelo, konjugirano z encimom. Po inkubaciji tkiva v barvnem substratu postane imunohistokemična reakcija vidna s svetlobnim mikroskopom. Obarvan reakcijski produkt interpretiramo kot pozitivno imunohistokemično reakcijo (Ramos-Vara, 2005).

2.13 PRIMARNA CELIČNA KULTURA

Za dinamično proučevanje zgradbe in delovanja celic, osnovnih enot organizma, nam služi tehnika gojenja celičnih kultur *in vitro*. Le-ta je stara že več kot 60. let in se je razvila z namenom, da bi se izognili poskusom na živalih. Celične kulture rib imajo široko uporabnost in jih lahko pripravimo iz različnih tkiv in organov različnih vrst rib. Ločimo dve vrsti kultur: primarne celične kulture in celične linije, ki jih razvrščamo v 6 kategorij. Za nas je najbolj uporabna in informativna kategorija, ki jo uporabljamo pri študiji infekcijskih bolezni (Batista, 2005).

O primarni celični kulturi govorimo kot o stopnji v pripravi takoj po izolaciji celic iz tkiva in pred prvo opravljeno pasažo (Freshney, 2005).

Prvo trajno ribjo celično linijo sta pripravila Wolf in Quimby (1962). Pripravila sta jo iz gonad šarenke in jo danes poznamo pod oznako RTG-2.

Pripravljenih je bilo že veliko sesalskih celičnih kultur, s pomočjo katerih so preučevali celično genetiko, diferenciacijo celic, maligno transformacijo ali celični metabolizem (Namba in sod., 1978). Hayashi in Ooshiro (1985) sta s primarno kulturo jetrnih celic japonske jegulje (*Anguilla japonica*) proučevala glukoneogenezo. Ugotovila sta, da je nivo glikogena in

proteinska sinteza jetrnih celic v primarni celični kulturi višja od omenjene aktivnosti jeter pri sveže izoliranih jetrnih celicah (Hayashi in Ooshiro, 1985). Ugotovili so pozitiven učinek sesalskih rastnih faktorjev na rast jetrnih celic v primarni kulturi šarenke. Epidermalni rastni faktor (EGF, angl. *Epidermal growth factor*) in insulin ali insulinu podobni rastni faktorji imajo ugoden vpliv na sintezo DNA in celično rast jetrne celične kulture (Richman in sod., 1976). Sesalski rastni faktorji in hormoni, ki stimulirajo rast sesalskih celic, imajo mitogen učinek na epitelne celice tkiva rib. Watanabe v študiji, ki jo je opravil s sodelavci (1987) na celični membrani hepatocitov šarenke, ni dokazal receptorjev za EGF, ki so sicer prisotni na celičnih membranah številnih sesalskih celičnih linij (Haigler, 1983).

Ikeda in Kusuda (1987) sta v pripravljene primarni kulturi levkocitov jegulje *in vitro* opazovala morfološke karakteristike in ocenjevala spremembe primarne kulture levkocitov.

Primarna celična kultura kožnega tkiva šarenke, ki jo sestavljata dva celična tipa, in sicer keratinociti in čašaste celice, so se izkazale za koristne v poskusu dokaza občutljivosti na nonoksinol, čeprav so bile v primerjavi s celicami EPC manj občutljive (Dowling in Mothersill, 1999). Podobne rezultate so dobili tudi pri študiji občutljivosti primarne kulture epitelne tkiva šarenke na kadmij in nikelj (McSweeney, 1998; Lyons Alacantara in sod., 1996).

Dowling in Mothersill (2001) sta v študiji primarne epitelne celične kulture šarenke dokazala toksične učinke dveh ksenobiotikov, prokloraza (1-[*N*-propil-*N*-2-(2,4,6-triklorofenoksi)etilkarbamoi]imidazol), ki povzroča nekrozo epitelnih celic in bakra, ki v povečani koncentraciji (nad 15 µg/l) (Birge in Black, 1979) povzroči apoptotično in nekrotično smrt epitelnih celic. Ker primarna celična kultura zelo dobro ponazarja dejansko stanje, funkcije in zveze med celicami v organizmu in virusom, smo v doktorski nalogi poskušali s kulturo primarnih eksplantov ob dodatku encima pripraviti primarno celično kulturo srčnega tkiva šarenke in soške postrvi, ki nam lahko služi kot detekcijski model oziroma *in vivo* model, na katerem opazujemo morebitne degenerativne spremembe na celicah primarne celične kulture po eksperimentalni okužbi z virusom IHN.

Tehnika in postopek priprave primarne celilne kulture sta bila nekoliko modificirana v primerjavi z že objavljeno metodo (Ostrander, 2000).

Spremembe smo nato primerjali z degenerativnimi spremembami celičnega sloja na trajni celični liniji EPC.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NEPOSREDNE METODE

3.1.1 Metode klasične virologije

3.1.1.1 Klinični material

V raziskavo je bilo vključeno večje število vzorcev organov rib (anteriorni del ledvic, vranica, srce in možgani) ter semenska in ovarialna tekočina matičnih jat in drugih postrvi iz ribogojnic, ki smo jih v obdobju 1996–2010 prejeli v Virološki laboratorij Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.

Vzorci smo obdelali v skladu s cilji Direktive Sveta 2006/88/ES z dne 24. oktobra 2006 in pripadajočim Pravilnikom o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz akvakulture ter o preprečevanju in nadzoru določenih bolezni vodnih živali, Ur. l. RS, št. 54/2008 z dne 2. junija 2008.

Vzorci so bili v laboratorij dostavljeni v sterilnih plastičnih centrifugirkah v transportnem gojišču v prenosnem hladilniku ali polistirenski škatli z dovolj veliko količino ledu ali ledenih blokov, ki zagotavljajo ustrezno hlajenje vzorcev med transportom v laboratorij. Za transportni medij smo uporabili rastni medij za gojenje celičnih kultur. Odvzete organe ter semensko in ovarialno tekočino smo razredčili v transportnem gojišču v razmerju 1 : 10.

Temperatura med transportom vzorcev ni smela presegati 10 °C, ob sprejemu vzorca je moral biti v transportni škatli še vedno prisoten led, ledeni bloki pa so morali biti popolnoma ali delno zamrznjeni.

Virološka preiskava na prisotnost virusa IHN je bila opravljena znotraj 48 ur po sprejemu vzorca.

3.1.1.2 Transportno gojišče

Za prenos kužnine smo uporabljali gojišče Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (1x) (with GlutaMAX™-I), ki smo mu dodali antibiotik z antimikotikom v standardnih koncentracijah (OIE, 2009).

3.1.1.3 Vzorci organov ter semenske in ovarialne tekočine

Vzorčenje je bilo opravljeno v skladu z letno Odredbo o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali, ki je bila izdana na podlagi 1. točke 45. člena Zakona o veterinarstvu (Uradni list RS, št. 33/01, 110/02 – ZGO-1, 45/04 – ZdZPKG, 62/04 – odl. US in 93/05 – ZVMS) ter sedmega odstavka 15. člena in za izvedbo petega odstavka 6. člena Zakona o veterinarskih merilih skladnosti (Uradni list RS, št. 93/05). V skladu z Odredbo je treba za preiskavo na virusno hemoragično septikemijo postrvi (VHS) in infekciozno hematopoetsko nekrozo (IHN) odvzeti in preiskati ovarialno in semensko tekočino vseh plemenskih jat postrvi in lipanov. V ribogojnicah, ki kupujejo ikre, vršijo promet oziroma trgujejo z živimi ribami, pa je treba na bolezni iz prejšnjega odstavka enkrat letno vzorčiti in preiskati organe 30 rib dovzetnih vrst v času, ko je temperatura vode v ribogojnici pod 14 °C.

Ob izbruhu bolezni smo za virološko preiskavo odvzeli naslednje organe: anteriorni del ledvic, vranico, srce in možgane (OIE, 2009).

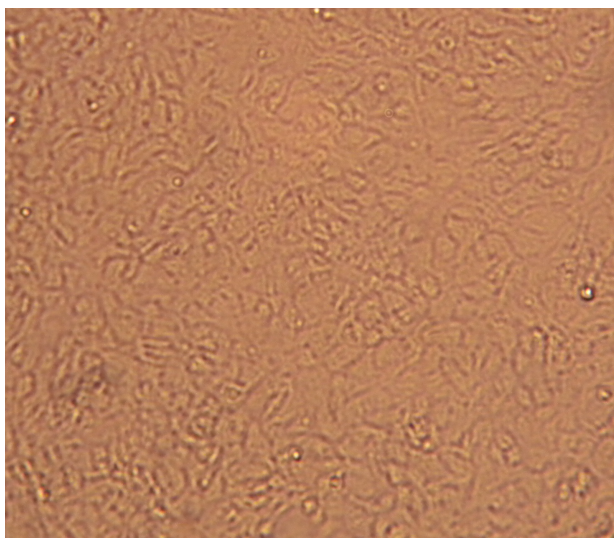
Za virološko preiskavo smo ribo velikosti do 4 cm celotno razrezali s sterilnimi škarjami ali skalpelom, potem ko smo odstranili del za zadnjično odprtino. Če je bila riba velikosti med 4 in 6 cm, smo odvzeli ledvice, vranico, srce in možgane. Enak vzorec vzorčenja za virološko preiskavo velja tudi pri ribah, ki so večje od 6 cm. Ker je virus IHN občutljiv za encimsko razgradnjo, za vzorčenje niso primerni organi z visoko stopnjo encimske aktivnosti, kot so jetra in drobovje (OIE, 2009).

V skladu s priporočili Mednarodnega urada za živalske kužne bolezni smo združevali organe ter ovarialno in semensko tekočino 10 rib. Končna razredčina tkivnega materiala in transportnega gojišča je bila 1 : 10. Tako pripravljene vzorce tkiva smo homogenizirali s pomočjo tkivnega homogenizatorja IKA® Ultra Turrax® (IKA, Nemčija) in homogenat centrifugirali v hlajeni centrifugi na 2 °C–5 °C pri 2000–4000 g 15 minut. Končno razredčino transportnega gojišča ter semenske in ovarialne tekočine (1 : 10) smo prav tako centrifugirali v hlajeni centrifugi na 2 °C–5 °C pri 2000–4000 g 15 minut. Pri nadaljnjih viroloških preiskavah smo uporabljali supernatant.

3.1.1.4 Izolacija virusa na celični kulturi

3.1.1.4.1 Celična linija EPC (*Epithelioma pappulosum cyprini*)

V vseh poskusih izolacije virusa IHN v celični kulturi smo uporabili celično linijo EPC (slika 3-1) (*Epithelioma Papulosum Cyprini*, 14. pasaža, 08. 01. 2007), ki smo jo prejeli iz Evropskega referenčnega laboratorija za bolezni rib v Aarhusu, Danska.



Slika 3-10: Celična linija EPC. Slikano pri 100-kratni povečavi (Eclipse TS100, Nikon).

3.1.1.4.2 Priprava celične kulture

Celično linijo EPC smo gojili v polistirenskih steklenicah za celično kulturo T-25 (TPP, Švica). Hranili smo jih v vlažnem inkubatorju Forma Scientific CO₂ Water Jacketed Incubator (Marjetta, Ohio, ZDA) pri 15 °C in 5-odstotni vsebnosti CO₂.

3.1.1.4.3 Razmnoževanje celične linije EPC

Celično linijo EPC smo tripsinizirali. Subkulturo smo običajno pripravili 7. dan, ko so se celice razrasle po celotni površini steklenice T-25.

Pred postopkom tripsinizacije smo vse reagente ogreli na sobno temperaturo.

S celičnega sloja smo odlili rastno gojišče in celični sloj oplaknili z gojiščem MEM. Na celični sloj smo nalili mešanico tripsina z EDTA (0,05-odstotni Trypsin, EDTA•4Na, Gibco®, Invitrogen Corporation™). Sledila je inkubacija 10 min pri sobni temperaturi, nato pa smo s celičnega sloja odlili mešanico tripsina z EDTA. Celični sloj smo z rahlim stresanjem odlepili od podlage in celice suspendirali v rastnem gojišču v razmerju 1 : 4. Sveže pripravljeno celično suspenzijo smo porazdelili v sterilne steklenice za gojenje celičnih kultur in jih 3 dni inkubirali pri 20 °C s 5 % CO₂. Po treh dneh smo steklenice s celično kulturo EPC

do naslednje tripsinizacije prenesli v inkubator s 5-odstotno vsebnostjo CO₂, v katerem je konstantna temperatura 15 °C.

Iz ene steklenice za celično kulturo T-25 smo pripravili štiri nove steklenice T-25 ali eno steklenico T-75.

3.1.1.4.4 Sestava rastnega gojišča za celično linijo EPC s 5 % fetalnega govejega seruma, 5 % FBS) (FBS, angl. fetal bovine serum)

Postopek priprave gojišča:

- 1000 ml gojišča Opti-MEM® I Reduced – Serum Medium (1x) (with GlutaMAX™- I) (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA),
- 50 ml fetalnega govejega seruma (FBS, Lot. No. 41F5190K, Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA), ki je bil v testu na prisotnost nukleinske kisline virusa BVD negativen,
- 10 ml (100x) antibiotika z antimikotikom (Antibiotic/Antimycotic Solution, Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA).

pH gojišča smo umerili na $7,6 \pm 0,2$ in ga s sistemom za filtriranje Corning® filter systems filtrirali skozi celuloznoacetatni filter s porami velikosti 0,22 µm (Corning, ZDA). Hranili smo ga v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.

3.1.1.4.5 Celična kultura EPC za izolacijo virusa IHN v celični kulturi

Za izolacijo virusa IHN na celični kulturi smo uporabili 24 ur staro celično kulturo EPC, namnoženo na mikrotitrski plošči. V vsako jamico sterilne mikrotitrške plošče (TPP, Švica), smo odpipetirali po 100 µl suspenzije s približno 350.000 celicami EPC v enem mililitru rastnega gojišča. Na ta način smo zagotovili potrebno gostoto celic, ki so v 24 urah prerasle celotno dno jamice.

Enako gostoto celic (350.000 celic/ml) v potrebni količini rastnega gojišča smo zagotovili tudi v primeru, ko smo namnoževali virusne izolate v celični kulturi EPC v steklenicah T-25. V posamezno steklenico T-25 smo odpipetirali 8 ml celic celične linije EPC, resuspendiranih v rastnem gojišču. Celična suspenzija iz ene steklenice T-25 je zadostovala za pripravo treh 96-jamičnih mikrotitrskih plošč ali štirih steklenic T-25.

3.1.1.4.6 Ocena viabilnosti celic

Pri karakterizaciji integritete celične membrane in posledično živosti celic smo uporabili barvanje s tripsanskim barvilom (Fluka, Švica), ki spada v skupino vitalnih barvil. Poškodovane celice se ob dodatku barvila obarvajo modro, nepoškodovane pa ostanejo neobarvane.

S pomočjo Neubauerjevega hemocitometra (Brand, Nemčija) smo prešteli neobarvane, torej nepoškodovane celice.

Preden smo celice celične linije EPC po tripsinizaciji nasadili na mikrotitrsko ploščo in jih pripravili za test izolacije v celični kulturi, smo jih prešteli in določili njihovo viabilnost.

Iz 5 ml suspenzije tripsiniziranih celic smo v 1,5 ml sterilno epruveto odpipetirali 100 µl celične suspenzije, ki smo ji dodali 900 µl tripsanskega modrila. 10 µl pripravljenega vzorca smo prenesli na hemocitometer. Mreža hemocitometra je sestavljena iz 4 polj s 16 kvadratki, vsak kvadrat pa ima površino 1 mm². Koncentracijo celic, kar pomeni število živih celic v mililitru gojišča, smo izračunali iz povprečnega števila celic na kvadrat, katerega volumen znaša 0,1 mm³. Na osnovi dobljene koncentracije celic smo celice v celični suspenziji ob tripsinizaciji ustrezno razredčili v rastnem gojišču.

3.1.1.4.7 Virusi

3.1.1.4.7.1 Referenčni sev N61

Referenčni sev N61 (6. pasaža na EPC, 07. 04. 2008), ki smo ga uporabljali pri raziskovalnem delu, smo prejeli od dr. Jeannette Castric (AFSSA – Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija). Virus smo razmnožili v celični kulturi EPC in mu z metodo po Reed-Muenchu (Reed in Muench, 1938) določili titer oziroma 50-odstotno infektivno dozo TCID₅₀ (TCID₅₀, angl. *tissue culture infective dose 50 %*).

3.1.1.4.7.2 Slovenski izolat 1654/08

Slovenski izolat virusa IHN (1654/08) smo uporabili pri izvedbi imunoperoksidaznega in virus nevtralizacijskega testa ter molekularnih metod.

Izolat 1654/08 smo izolirali iz organov rib, ki so jih leta 2008 odvzeli ob sumu na bolezen IHN.

3.1.1.4.7.3 Namnoževanje referenčnega seva N61 in virusnih izolatov virusa IHN v celični kulturi EPC

Iz 24 ur starega sloja celične kulture EPC smo odlili rastno gojišče. Na celični sloj smo inokulirali 100 µl referenčnega seva ali drugega virusnega izolata, ki smo ga želeli namnožiti, in dolili 8 ml rastnega gojišča. Sledila je inkubacija pri 15 °C in s 5 % CO₂. Ko so citopatske spremembe zajele 70–80 odstotkov celičnega sloja, smo steklenico zamrznili pri –80 °C. Naslednji dan smo celično kulturo EPC z namnoženim virusom odmrznili, suspenzijo virusa prenesli v 15-mililitrsko centrifugirko in jo centrifugirali 15 minut pri 3600 obr/min in 4 °C. Supernatant smo alikvotirali v slamice (500 µl) in ga shranili v kriogeni posodi s tekočim dušikom pri –196 °C.

Namnoženim virusom na celični liniji EPC smo v postopku titracije z metodo po Reed-Muenchu (Reed in Muench, 1938) določili titer oziroma 50-odstotno infektivno dozo TCID₅₀ (angl. *tissue culture infective dose 50 %*). Titer smo izrazili s številom infektivnih enot TCID₅₀ v mililitru inokuluma.

3.1.1.5 Postopek izvedbe metode izolacije virusa IHN na celični kulturi

Test izolacije virusa na celični kulturi smo izvajali v 96-jamičnih mikrotitrskih ploščah s 100 µl suspenzije celične kulture. Za vsak vzorec smo uporabili dve vzporedni koloni jamic. V prvi dve jamici smo nanegli po 50 µl vzorca, pomešili in s prenašanjem po 50 µl v naslednjo jamico pripravili 3-kratne razredčine vzorcev v smeri od A do H. Izolacijo virusa smo opravili na mikrotitrski plošči s celično linijo EPC.

Na mikrotitrski plošči uporabimo kolono jamic (na primer kolona 11 od A do H) za kontrolo rasti celične kulture. Na mikrotitrski plošči dodamo v kolono 12 pozitivno kontrolo virusa IHN.

Mikrotitrške plošče z inokuliranimi vzorci inkubiramo najmanj 7 dni v hlajenem, vlažnem inkubatorju s 5 % CO₂ (od 15 °C ±3 °C).

Celice dnevno opazujemo z invertnim mikroskopom in opazujemo, ali se bo pojavil CPE v posameznih jamicah pri vzorcih in pozitivnih kontrolah.

Če se po 7–10 dneh primarne inkubacije vzorca na celični kulturi ne pojavi CPE, opravimo subkultivacijo oziroma pasažo vzorca.

V sterilne epruvete zberemo gojišče z inokuliranim vzorcem iz vsake kolone na mikrotitrski plošči posebej, na katere smo nanesti vzorec, in to suspenzijo uporabimo kot inokulum za prvo pasažo.

Subkultivacijo opravimo po istem postopku, kot smo pripravili celično kulturo za primarno inokulacijo vzorcev.

Tako inokulirano celično linijo inkubiramo nadaljnjih 7–10 dni pri 15 °C.

Če po 7 dneh inkubacije ne opazimo CPE, vzorec ocenimo za negativen.

V primeru pojava CPE zberemo gojišče iz vseh jamic ene kolone na mikrotitrski plošči s CPE v sterilno epruveto in centrifugiramo pri temperaturi 5 ± 3 °C pri 2000–4000 x g 15 minut.

Za vsak vzorec potrebujemo 3 kolone jamic mikrotitrške plošče. 50 µl supernatanta naneseemo v prve jamice mikrotitrške plošče s 24 ur starim slojem celične linije EPC in pripravimo 2-kratne razredčine v smeri od A do H.

V eno kolono mikrotitrške plošče naneseemo 50 µl referenčnega seva IHN v prvo jamico in pripravimo 2-kratne razredčine.

Mikrotitrške plošče inkubiramo 48 ur v hlajenem, vlažnem inkubatorju s 5 % CO₂ (od 15 °C ± 3 °C).

3.1.1.6 Imunoperoksidazni test

Izolacija virusa IHN se izvaja na občutljivi celični liniji EPC, ki omogoča vstop virusa v celice in razmnoževanje virusa v njih. Z metodo indirektnega imunoperoksidaznega testa prisotnost citopatogenega virusa IHN potrdimo s specifičnimi monoklonskimi protitelesi. Celice na mikrotitrski plošči fiksiramo z acetonom, virusni antigen pa določamo z uporabo specifičnih mišjih monoklonskih protiteles, ki so usmerjena proti nukleokapsidnemu proteinu. Ker pa monoklonalna protitelesa niso označena, v testu uporabljamo še anti-mišja protitelesa, označena s hrenovo peroksidazo. Z dodatkom substrata se mesta v celici, na katero je vezan konjugat, obarvajo in postanejo vidna. Rezultat odčitamo pod svetlobnim mikroskopom.

3.1.1.6.1 Postopek izvedbe imunoperoksidaznega testa

Z imunoperoksidaznim testom z uporabo specifičnih mišjih monoklonskih protiteles, uperjenih proti nukleokapsidnemu proteinu virusa IHN, dokazujemo na občutljivi celični kulturi EPC prisotnost virusnega antigena.

Iz jamic na mikrotitrski plošči po drugi pasaži smo odstranili gojišče in ploščo dobro posušili v mikrobiološki komori pri maksimalnem pretoku zraka. Na jamice mikrotitrške plošče smo nanесли 200 μ l 85 % acetona. Aceton hranimo pri -20°C . Mikrotitrsko ploščo s fiksiranimi celicami smo zamrznili za 30 minut na -20°C . Po fiksaciji smo iz jamic mikrotitrške plošče odlili aceton in jo posušili v mikrobiološki komori (Iskra Pio, Slovenija) pri maksimalnem pretoku zraka. Na fiksirane in osušene celice smo nanесли 100 μ l sveže pripravljenega 1-odstotnega H_2O_2 (Merck, ZDA). Sledila je 10-minutna inkubacija na sobni temperaturi, nakar smo jamice mikrotitrške plošče sprali 3-krat z (1x) pufrom PBS-Tween (Svanova® Biotech AB, Švedska) in jih dobro osušili. Komercialno dostopna mišja primarna monoklonska protitelesa proti virusnim beljakovinam nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija) smo z redčenjem v pufru PBS-T pripravili v delovni razredčini 1 : 20 in 50 μ l razredčine monoklonskih protiteles nanесли na vsako jamico mikrotitrške plošče. Mikrotitrške plošče smo inkubirali 1 uro v vlažnem inkubatorju s 5 % CO_2 pri 37°C . Po inkubaciji smo plošče 3-krat temeljito sprali z (1x) pufrom PBS-T in jih osušili. Na jamice mikrotitrške plošče smo nanесли 50 μ l sekundarnih poliklonalnih kunčjih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo P0260 (Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, DAKO, Danska), ki smo jih uporabili proti mišjim primarnim monoklonskim protitelesom. Sekundarna poliklonalna kunčja protitelesa smo redčili s PBS-T v razmerju 1 : 100. V končni 5-odstotni koncentraciji smo PBS-T in konjugatu dodali goveji serum. Sledila je inkubacija mikrotitrške plošče 30 minut v vlažnem inkubatorju pri 37°C s 5 % CO_2 . Mikrotitrsko ploščo smo po inkubaciji temeljito sprali s PBS-T in v vsako jamico nanесли po 100 μ l AEC (3-amino-9-etilkarbazol) substrata (Sigma- Aldrich CO., Nemčija). Eno tableto AEC substrata smo raztopili v 2,5 ml N,N-dimetilformamida (Merck, ZDA), raztopino prenesli v manjšo erlenmajerico in raztopini dodali 47,5 ml 0,05 M acetatnega pufra, ki smo ga pripravili sami. Tako pripravljenemu substratu smo tik pred nanosom na jamice mikrotitrške plošče dodali 25 μ l 30-odstoten H_2O_2 . Ploščo smo inkubirali v temnem prostoru 30 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo ustavili tako, da smo substrat odlili in na jamice mikrotitrške plošče nalili destilirano vodo. Rezultate smo vrednotili z uporabo invertnega mikroskopa. Virus IHN se razmnožuje v citoplazmi celic, zato se v primeru pozitivnega rezultata citoplazma celic celične linije EPC obarva rdeče, v primeru negativnega rezultata pa ostane citoplazma celic neobarvana.

3.1.2 Molekularne metode

3.1.2.1 Začetni oligonukleotidi in sonda

Za pomnoževanje regij genoma virusa IHN z zapisom za glikoprotein, nukleoprotein in protein NV smo uporabili začetne oligonukleotide, ki ustrezajo nukleotidnim zaporedjem bralnih okvirjev virusnega genoma. Za pomnoževanje regije genoma virusa IHN z zapisom za glikoprotein, nukleoprotein in protein NV smo na osnovi podatkov iz literature uporabili naslednje začetne oligonukleotide: E1, E3n za protein G, N-f in N-r za nukleoprotein ter NV-f in NV-r za protein NV. Ti začetni oligonukleotidi so se v preteklih raziskavah izkazali kot najbolj učinkoviti (Emmenegger in sod., 2000; Arakawa in sod., 1990; Huang in sod., 1996). Mesta prileganja izbranih začetnih oligonukleotidov in sonde ustrezajo nukleotidnim zaporedjem bralnih okvirjev v sekvenci genoma seva X89213, ki so ga objavili Schütze in sod. (1995).

Začetne oligonukleotide so sintetizirali pri podjetjih Sigma – Aldrich® (Nemčija) ali Invitrogen™ (ZDA).

Za RT-PCR v realnem času smo uporabili sondo TaqMan®MGB, ki smo jo naročili pri podjetju Applied Biosystems (Warrington, Velika Britanija).

3.1.2.2 Osamitev celokupne RNA iz vzorcev organov ali semenske in ovarialne tekočine z reagentom TRIzol® in QIAamp Viral RNA Mini Kit

Celokupno RNA, ki smo jo izolirali iz supernatanta celične kulture EPC, v kateri smo gojili referenčni sev N61, smo uporabljali za pozitivno kontrolo pri preverjanju uspešnosti izolacije celokupne RNA in pri dokazovanju virusnega genoma IHN z metodami pomnoževanja na osnovi RT-PCR. Kot negativna kontrola pa nam je v vseh poskusih dokazovanja virusa IHN z molekularnimi metodami služila sterilna ultra čista voda brez nukleaz UltraPure™ DEPC-Treated Water [H₂O-DEPC] (Invitrogen™, ZDA).

Vzorci, ki so v testu izolacije virusa na celični kulturi reagirali pozitivno, smo obdelali še z molekularnimi metodami določanja virusne nukleinske kisline.

Pri raziskovalnem delu smo uporabljali različni metodi za izolacijo celokupne RNA, in sicer smo celokupno RNA izolirali z reagentom TRIzol® (Invitrogen™, ZDA) in komercialnim

kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemčija). Uspešnost izolacije celokupne RNA smo ugotavljali s pomnoževanjem tarčne sekvence v genu za glikoprotein. Na ta način smo preverili občutljivost in zanesljivost metod za izolacijo celokupne RNA.

3.1.2.2.1 Osamitev celokupne RNA z reagentom TRIzol® (Invitrogen®)

Za osamitev celokupne RNA, ki temelji na metodi Chomczynskega in Sacchija (1987), smo uporabili predhodno ustrezno redčene in homogenizirane vzorce organov ter semenske in ovarialne tekočine, ki smo jih nato centrifugirali. V 1,5 ml sterilne epruvete (Eppendorf, Nemčija) smo odpipetirali 250 µl supernatanta preiskovanega vzorca in mu dodali 750 µl TRIzol-a ter dobro premešali. Sledila je 5-minutna inkubacija vzorcev, med katero je potekla liza celic in raztapljanje proteinskih kompleksov. TRIzol®, mešanica gvanidinijevega izotiocianata in fenola, med 5-minutno izolacijo ohranja integriteto RNA. Dodali smo še 200 µl kloroforma, dobro pomešali na vibracijskem mešalniku in ponovno inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Po centrifugiranju pri 14.000 obr/min smo po 15 minutah 500 µl zgornje, vodne faze, v kateri je raztopljena RNA, prenesli v čisto, 1,5 ml epruveto. Dodali smo 500 µl izopropanola, ki iz vodne faze obori RNA. Vsebinsko epruvete smo dobro premešali, inkubirali 10 minut in centrifugirali pri 14.000 obr/min 15 minut. Oborjena RNA se je zbrala in izločila na steni epruvete. Po centrifugiranju smo odlili supernatant in oborjeno RNA sprali s 500 µl 75 % etanola, ohlajenega na -20 °C. Vsebinsko epruvete smo ponovno dobro premešali na vibracijskem mešalniku in centrifugirali pri 14.000 obr/min najmanj 5 minut. Supernatant smo zavržli in RNA sušili na zraku približno 25 minut. Izolirano celokupno RNA smo raztopili v 100 µl sterilne demineralizirane vode, proste nukleazne aktivnosti.

3.1.2.2.2 Osamitev celokupne RNA s komercialnim kompletom QIAamp Viral RNA (QIAGEN®)

Uporabili smo komercialni komplet reagentov QIAamp Viral RNA, ki je namenjen hitri in preprosti izolaciji virusne RNA iz vzorcev, ki vsebujejo malo celic. Metoda temelji na selektivni vezavi RNA na membrano iz silikatnega gela, ki se nahaja v kolonah in je namenjena obdelavi s postopkom centrifugiranja ali obdelavi z vakuumsko črpalko.

Po navodilih proizvajalca smo predhodno pripravili nosilno RNA v pufru, ki poveča izplen RNA v postopku osamitve. 560 μ l lizirajočega pufra (AVL) smo prenesli v 1,5 ml epruveto (Eppendorf, Nemčija), mu primešali predpisano količino nosilne RNA in dodali 140 μ l vzorca. Vsebino epruvete smo dobro pomešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 10 minut. V tem času je potekla liza vzorca. S postopkom kratkega centrifugiranja smo s sten epruvete odstranili kapljice vzorca. Pred nanosom vzorca na membrano kolone smo vzorcu dodali 560 μ l absolutnega etanola (Merck, ZDA), ki je vezal nukleinsko kislino na membrano. 630 μ l pripravljenega vzorca smo prenesli v kolono, centrifugirali 1 minuto pri 6000 x g. Filtrat v zbiralni epruveti smo zavrgli in na kolono prenesli še preostalo količino (630 μ l) vzorca. Sledilo je 1-minutno centrifugiranje pri 6000 x g. Na membrano kolone smo dodali 500 μ l pufra za spiranje AW1, centrifugirali 1 minuto pri 6000 x g in membrano kolone sprali še s 500 μ l pufra za spiranje AW2. Centrifugirali smo 3 minute pri 20.000 x g. Nukleinske kisline, vezane na membrano, smo sprali in na ta način iz vzorca odstranili snovi, ki so nespecifično vezane na membrano. Zbiralno epruveto z vsebino smo zavrgli in kolono prenesli v čisto zbiralno epruveto. Sledilo je ponovno centrifugiranje pri 20.000 x g. Kolono smo prenesli v čisto 1,5 ml epruveto in na membrano dodali 40 μ l pufra AVE, ki iz membrane sprosti RNA. Inkubirali smo 1 minuto in centrifugirali pri 6000 x g. Kolono smo zavrgli, izolirano RNA pa shranili pri -80°C .

3.1.2.3 Pomnoževanje nukleinske kisline virusa IHN z metodo RT-PCR

Po osamitvi celokupne RNA iz vzorca smo za dokazovanje prisotnosti virusne RNA uporabili različico metode PCR, imenovano RT-PCR. Ta se od klasične metode PCR razlikuje v tem, da vključuje reverzni prepis molekul RNA v komplementarno DNA (cDNA). Pomnoževali smo tri dele genoma virusa IHN: delna zapisa za glikoprotein in nukleoprotein ter celoten zapis za protein NV. Podatki o začetnih oligonukleotidih so podani v tabeli 3-1.

Ime začetnega oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Položaj naleganja v genomu
E1 (smiselni)	5'- AGA GAT CCC TAC ACC AGA GAC- 3'	563-583
E3n (protismiselni)	5'- ATA GAT GGA GCC TTT GTG CAT- 3'	1105-1085
N- f (smiselni)	5'- TTC GCA GAT CCC AAC AAC AA- 3'	319-338
N- r (protismiselni)	5'- CTT GGT GAG CTT CTG TCC A- 3'	570-552
NV- f (smiselni)	5'- AGC ATC AAA TCC GTA CCC- 3'	4508-4525
NV- r (protismiselni)	5'- TTC TCT GTG AGT CGC GC- 3'	5043-5027

Tabela 3-1: Začetni oligonukleotidi.

3.1.2.3.1 Molekularno določanje virusne RNA z enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja DNA (RT-PCR)

Osamitvi celokupne RNA iz preiskovanih vzorcev je sledilo dokazovanje prisotnosti virusne RNA z enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja.

To je različica metode PCR, pri kateri se najprej s pomočjo encima reverzna transkriptaza RNA molekula prepiše v komplementarno verigo DNA. Prepis je potekal 30 minut pri temperaturi 50 °C. Nastal je dvojnovijačni hibrid cDNA-RNA. Encim reverzna transkriptaza, ki ima tudi aktivnost RNaze H, je razgradila molekulo RNA v hibridnem kompleksu. Sledilo je pomnoževanje virusne nukleinske kisline po ustaljenem postopku PCR. Uporabili smo program, ki se je začel z denaturacijo cDNA 2 minuti pri 94 °C, sledilo je 40 ciklov denaturacije pri 94 °C 15 sekund, prileganja začetnih oligonukleotidov pri 54 °C 30 sekund in podaljševanja pri 72 °C 1 minuto ter zaključno podaljševanje pri 72 °C 10 minut.

3.1.2.3.1.1 Pomnoževanje odseka v genu za glikoprotein (ORF4)

S parom začetnih oligonukleotidov E1 in E3n, ki smo jih povzeli po literaturi (Emmenegger in sod., 2000), smo pomnožili 532 bp velik odsek gena za glikoprotein. Začetna oligonukleotida v genomu virusnega izolata RB-76 (angl. *Round Butte strain*) (v GenBank dostopna številka U50401) prilegata na mesti 563-583 in 1105-1085 gena za glikoprotein.

3.1.2.3.1.2 Pomnoževanje odseka v genu za nukleokapsidni protein (ORF1)

S parom začetnih oligonukleotidov N-f in N-r, ki smo jih povzeli po literaturi (Arakawa in sod., 1990), smo pomnožili 252 bp velik odsek gena za nukleokapsidni protein. Začetna oligonukleotida v genomu virusnega izolata RB-76 (v GenBank dostopna številka U50401) prilegata na mesti 319-338 in 570-552 gena za nukleokapsidni protein.

3.1.2.3.1.3 Pomnoževanje odseka v genu za protein NV (ORF5)

S parom začetnih oligonukleotidov NV-f in NV-r, ki smo jih povzeli po literaturi (Emmenegger in sod., 2000), smo pomnožili 536 bp velik odsek gena za protein NV. Začetna oligonukleotida v genomu virusnega izolata RB-76 (v GenBank dostopna številka U50401) prilegata na mesti 4508-4525 in 5043-5027 gena NV.

3.1.2.4 Analiza produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu

Produkte PCR smo analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Pripravili smo 1,8-odstotni gel. V erlenmajerico smo natehtali 1,8 g agaroze v prahu (Merck, ZDA) in dodali 100 ml 1x TAE pufra (Tris-acetat EDTA). V mikrovalovni pečici smo agarozo s segrevanjem dobro raztopili. Nato smo agarozo ohladili na približno 60 °C in jo zlili v nosilec z nameščenim glavničkom. Ko se je po približno 30 minutah gel strdil, smo ga skupaj z nosilcem potopili v kadičko z 1x puffrom TAE. Na mikrotitrski ploščici smo v posamezni jamici pomešali in nato v vdolbinice gela nanесли 12 µl pomnoženega produkta PCR, ki smo mu dodali 3 µl nosilnega barvila (0,35-odstotno brom-fenol modrilo) Loading Dye Solution (MBI Fermentas, Nemčija). Na gel smo poleg produktov PCR, negativne in pozitivne kontrole nanесли še 3 µl komercialno pripravljene molekularnega označevalca (100bp) (Fermentas, Nemčija).

Elektroforeza je tekla 40 minut pri napetosti 108 V.

Po končani elektroforezi smo gel previdno odstranili iz kadičke in ga prenesli v banjico z etidijevim bromidom. Vidljivost pomnoženih odsekov pod ultravijolično svetlobo smo omogočili z barvanjem gela v etidijevem bromidu. Etidijev bromid po približno 15 minutah interkalira v dvojno vijačnico DNA in ob osvetlitvi z UV-svetlobo močno fluorescira. Gel smo nato prenesli na UV-transiluminator ter z računalniškim programom in kamero zabeležili produkte PCR.

Pomnoženi odseki so se na gelu ločili po velikosti zaradi različne hitrosti potovanja in s pomočjo molekularnega označevalca smo njihovo velikost tudi določili.

3.1.2.5 Sekvenciranje produktov RT-PCR

Za sekvenčno reakcijo odseka genoma virusa IHN z zapisom za glikoprotein G smo uporabili enake začetne oligonukleotide kot pri pomnoževanju z metodo RT-PCR. Poslužili smo se Sangerjeve metode ali terminacijske metode. Terminatorji so spremenjeni nukleotidi (dideoksinukleozid trifosfat ali ddNTP), ki imajo na mestu 3' namesto –OH skupine vezan –H. Danes je Sangerjeva metoda prilagojena računalniški tehnologiji in je komercialno dostopna v avtomatiziranih sistemih. Na trgu je več sistemov, ki temeljijo na fluorescentno označenih ddNTP.

3.1.2.5.1 Izbira začetnih oligonukleotidov za sekvenčno reakcijo

Za sekvenčno reakcijo odseka genoma virusa IHN z zapisom za glikoprotein G smo uporabili enake začetne oligonukleotide kot pri klasični RT-PCR reakciji.

3.1.2.5.2 Sekvenčna reakcija

V sekvenčni reakciji smo uporabili iz gela očiščene produkte RT-PCR. Komercialni komplet reagentov ABIPRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, ZDA), ki smo ga uporabili, temelji na Sangerjevi metodi sekvenciranja, pri kateri je vsak terminator označen z drugim barvilom. Za vsak produkt RT-PCR smo naredili reakcijsko mešanico, po eno za vsak začetni oligonukleotid. 10 µl reakcijske mešanice je vsebovalo 4,0 µl reagenta BigDye™ iz kompleta ABIPRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, 1 µl začetnega oligonukleotida (E1, E3n, N-f, N-r, NV-f in NV-r) s koncentracijo 1,6 pmol/µl in 5 µl očiščenega produkta RT-PCR.

Pomnoževanje produktov sekvenčne reakcije je potekalo v cikličnem termostatu. Začetni denaturaciji, ki je trajala 1 minuto pri 96 °C, je sledilo 25 ciklov pomnoževanja, ki je vključevalo fazo denaturacije (10 sekund pri 95 °C), prileganja začetnih oligonukleotidov (5 sekund pri 50 °C) in podaljševanja tarčnega zaporedja (4 minute pri 60 °C). Sledilo je še ohlajevanje reakcijske mešanice pri 4 °C.

Produkte sekvenčne reakcije smo pred avtomatskim sekvenciranjem očistili neporabljenih dideoksi terminatorjev in začetnih oligonukleotidov. Produkte, ki smo jih hranili v 1,5 ml epruveti, smo dodali 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M natrijevega acetata in 25 µl 100-odstotnega etanola. Mešanico smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in jo inkubirali 15 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je 30-minutno centrifugiranje pri 10.000 x g na sobni temperaturi. Po centrifugiranju smo supernatant zavrgli, oborjen produkt PCR na dnu 1,5 ml epruvete pa sprali s 35 µl 70-odstotnega etanola. Vsebino epruvete smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku in ponovno centrifugirali 15 minut pri 10.000 x g in sobni temperaturi. Supernatant smo odlili in DNA sušili v toplotnem stresalniku z nastavljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija) pri 90 °C 1 minuto. Po denaturaciji smo vzorce hitro prestavili na led za 2 minuti. Tako obdelane vzorce smo shranili pri -20 °C. Sekvenciranje pridelkov sekvenčne reakcije je potekalo v avtomatskem sekvenatorju ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ZDA). Laserski čitalec na osnovi značilnega fluorescentnega spektra ločuje pomnožena tarčna zaporedja v kapilari s polimerom (POP6).

3.1.2.6 Določanje nukleotidnega zaporedja

Specifične produkte RT-PCR je treba pred izvedbo sekvenčne reakcije očistiti ostankov *Taq* polimeraze DNA, začetnih oligonukleotidov in deoksiribonukleotidov. Pridelke smo očistili s komercialnim kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Čiščenje temelji na metodi vezave molekule DNA na delce silicijevega dioksida v membrani posebne kolone in spiranju le-te s pufri.

V 1,5 ml epruveto smo izrezanemu koščku želenega produkta RT-PCR iz agaroznega gela dodali ustrezno količino pufra MBS (angl. *Membrane Binding Solution*), ki je ustrezala teži izrezanega koščka gela. Vsebino epruvete smo pomešali na vibracijskem mešalniku. Epruveto smo vstavili v toplotni stresalnik z nastavljivo temperaturo (Thermomixer 5436, Eppendorf, Nemčija) in pri temperaturi 65 °C vsebino segrevali približno 10 minut oziroma toliko časa,

da se je gel popolnoma raztopil. Vsebinsko epruvete smo nato prenesli v kolono (SV Minicolumn), vstavljeno v zbiralno epruveto (Collection Tube) in inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 1 minuto pri 16.000 x g. V tem postopku se je tarčni odsek nukleinske kisline, ki smo ga v postopku RT-PCR pomnožili, vezal na membrano. Z dodatkom 700 µl raztopine MWS (angl. *Membrane Wash Solution*) smo z membrane sprali nečistoče in ponovno centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g. Postopek spiranja membrane smo ponovili z dodatkom 500 µl raztopine MWS in centrifugirali 5 minut pri 16.000 x g. Tekočino v zbiralni epruveti smo zavrgli in kolono v izpraznjeni zbiralni epruveti še enkrat centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g, da smo odstranili vse ostanke raztopine za spiranje. Nato smo kolono prenesli v novo, 1,5 ml epruveto. V postopku elucije na membrano vezane DNA, smo na kolono prenesli 50 µl DEPC-H₂O, inkubirali 1 minuto pri sobni temperaturi in nato centrifugirali 1 minuto pri 16.000 x g. Kolono smo po centrifugiranju zavrgli, epruveto z očiščenim produktom RT-PCR pa shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe.

3.1.2.7 Analiza nukleotidnih zaporedij

Nukleotidna zaporedja slovenskih izolatov virusa IHN, ki smo jih dobili s sekvenciranjem, smo obdelali s programi paketa LaserGene (DnaStar, ZDA). Nabor programov, ki jih vsebuje ta programski paket, nam omogoča popolno obdelavo podatkov. Dobljene sekvence smo uredili s programom SeqMan, ki omogoča sestavljanje zaporedij v soglasno zaporedje in programom EditSeq, ki nam služi za urejanje zaporedij. Zaporedje začetnih oligonukleotidov in neberljiva začetek in konec nukleotidega zaporedja smo odrezali s programom DAMBE (angl. *Data Analysis and Molecular Biology and Evolution*). S programom Clustal X2 (prosto dostopen na medmeržju na naslovu <http://www.clustal.org/>) smo zaporedja poravnali. V analizo nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov virusa IHN smo vključili tudi 43 izolatov, ki smo jih pridobili iz podatkovne zbirke GenBank, ki jo ureja Nacionalni center za informacije s področja biotehnologije (NCBI, angl. *National Centre for Biotechnology Information*). Slovenske izolate, ki smo jim določili nukleotidna zaporedja s pomočjo omenjenih programov, smo poslali genski banki GenBank v odobritev in potrditev. Posameznemu nukleotidnemu zaporedju slovenskega izolata so podelili kodo (angl. *accession number*). Z vnosom te kode v podatkovno zbirko GenBank lahko danes dostopamo do javno dostopnih podatkov o nukleotidnih zaporedjih slovenskih izolatov virusa IHN.

Zaporedjem vseh analiziranih izolatov smo s programom MEGA, verzija 4 (prosto dostopen na medmrežju na naslovu <http://www.megasoftware.net/>) določili stopnjo identičnosti in divergence ter izrisali filogenetska drevesa.

3.1.2.8 Preverjanje virusne nukleinske kisline z metodo RT-PCR v realnem času

Vzorci celokupne RNA, ki so bili pozitivni pri preverjanju prisotnosti RNA virusa IHN z metodo RT-PCR, smo testirali še z metodo RT-PCR v realnem času. Uporabili smo par začetnih oligonukleotidov in sondo. Podani so v tabeli 3-2.

Ime začetnega oligonukleotida in sonde	Nukleotidno zaporedje
IHNV-Tf (smiselni)	5'- GTG TGA CTC CAT ACC TCC TAT CCA A- 3' 3'
IHNV-Tr (protismiselni)	5'- TCC CGT GAT AGA TGG AGC CTT T- 3'
IHNV-MGB (sonda)	5'- TCT CCA CAT CCC GGA AT- 3'

Tabela 3-2: Začetni oligonukleotid in sonda za RT-PCR v realnem času.

3.1.2.8.1 Enostopenjski RT-PCR v realnem času za pomnoževanje odseka v genu za glikoprotein (ORF4)

S smiselnim začetnim oligonukleotidom IHNV-Tf, ki smo ga skonstruirali sami na osnovi pregledane literature (Overturf in sod., 2001), in protismiselnim začetnim oligonukleotidom IHNV-Tr ter sondo IHNV-MGB (Purcell in sod., 2006) smo pomnoževali nukleinsko kislino virusa IHN v vzorcih organov rib in v kontrolnem vzorcu. V testu smo uporabili modificirano sondo s skrajšanim nukleotidnim zaporedjem, kot pa je bila objavljena v izvirniku (Purcell in sod., 2006). Kot pozitivna kontrola izolacije virusa nam je služil referenčni sev virusa IHN N61, za negativno kontrolo smo uporabili DEPC vodo.

Za dokaz virusne nukleinske kisline smo uporabili detekcijski sistem, ki temelji na sondi TaqMan® MGB.

Za reakcijo RT-PCR v realnem času smo uporabili komercialno dostopen komplet reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen™, ZDA), ki nam omogoča enostopenjsko pomnoževanje.

Reakcijsko mešanico za vse vzorce smo pripravili v sterilni, 1,5 ml epruveti (Eppendorf, Nemčija). Za vsak vzorec smo pripravili 21 μ l reakcijske mešanice, ki je vsebovala 12,5 μ l reakcijske mešanice s pasivnim referenčnim barvilom ROX (Reaction Mix with ROX), 0,5 μ l mešanice encimov reverzne transkriptaze Superscript™ III RT in Platinum® *Taq* polimeraze DNA, 0,2 μ l 200 nM sonde IHNV-MGB, 2 μ l 500 nM posameznega začetnega oligonukleotida in 3,8 μ l H₂O-DEPC. Pripravljeno reakcijsko mešanico smo nanесли v jamice na optični ploščici (96-Well Optical Reaction Plate, Applied Biosystems, ZDA) in v vsako reakcijo pomnoževanja dodali še po 4 μ l izolirane RNA. Vsak posamezni vzorec smo na ploščico nanесли v dveh ponovitvah. Kot kontrola kontaminacije nam je služila zadnja reakcijska mešanica (NTC, angl. *no template control*), ki smo jo na ploščico nanесли v dvojniku. Namesto izolirane RNA smo v reakcijsko zmes dodali 4 μ l H₂O-DEPC. Celoten postopek smo opravili na ledu.

Ploščico smo prekrili z optično folijo (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, ZDA) in jo centrifugirali 6 minut pri 4300 obr/min pri 4 °C. Ploščico smo nato vstavili v termopomnoževalnik ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA) in jo pokrili s kompresijsko blazinico (MicroAmp™ Optical Film Compression Pad). Reakcija pomnoževanja je potekala pod naslednjimi pogoji: reverzna transkripcija 15 minut pri 50 °C, nato je sledila inaktivacija reverzne transkriptaze ter aktivacija Platinum *Taq* polimeraze DNA 2 minuti pri 95 °C. Sledilo je 50 temperaturnih ciklov pomnoževanja v dveh stopnjah: denaturacija 15 sekund pri 95 °C in prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde ter podaljševanje tarčnega odseka 30 sekund pri 60 °C.

Po končani reakciji smo analizo rezultatov opravili na računalniku s programsko opremo SDS, verzija 1.1 (Applied Biosystems, ZDA).

Kot pozitivne rezultate smo upoštevali tiste vzorce, ki so presegli linjo fluorescenčnega praga (C_t) in jih primerjali z rezultatom pozitivne kontrole. Pri določevanju vrednosti C_t smo največkrat upoštevali avtomatsko nastavitve vrednosti bazne linije (med šestim in petnajstim ciklom) in praga reakcije (angl. *cycle threshold 0,2000*).

Za določitev meje detekcije smo celokupno izolirano RNA referenčnega izolata N61 redčili v DEPC- H₂O in pripravili serijo desetkratnih razredčin (od 10^{-1} do 10^{-7}). Vsako razredčino smo v posamezni reakciji testirali v dvakratnih ponovitvah. Zbrane podatke o vrednostih C_t za posamezne razredčine smo po končani reakciji obdelali s programom Microsoft Excel in v njem narisali standardno linearno regresijsko krivuljo. Tako smo določili spodnjo mejo

detekcije, ki jo teoretično predstavlja največja razredčina celokupne RNA z največjo vrednostjo C_t .

Z RT-PCR v realnem času smo nato ugotavljali učinkovitost reakcije pomnoževanja DNA. Učinkovitost reakcije smo izračunali iz podatka naklona (k) linearne regresijske premice po naslednji enačbi:

$$E = 10^{(-1/k)} - 1$$

3.2 POSREDNE METODE

3.2.1 Klinični material

Humoralni imunski odgovor pri ribah vključuje tvorbo nevtralizacijskih protiteles, ki jih lahko zaznamo 3–6 tednov po infekciji in so prisotna še 12 mesecev po njej (Fregeneda- Grandes in Olesen, 2007; Vestergaard Jorgensen in sod., 1991). Na prisotnost protiteles razreda M (IgM) proti virusu IHN smo testirali 197 serumov rib, ki smo jih pridobili iz ribogojnic, v katerih smo s klasično metodo izolacije virusa na celični kulturi v zimskih mesecih dokazali virus IHN in iz ribogojnic, prostih virusa IHN. Vzorce so v poletnih mesecih odvzeli sodelavci Inštituta za zdravstveno varstvo in gojitev divjadi, rib in čebel. Takoj po prevzemu smo krvne vzorce pustili čez noč na sobni temperaturi, da je potekla spontana koagulacija in se je iztisnil krvni serum. Nato smo serum odpipetirali v epruvetke, ga inaktivirali 30 minut na 45 °C in do izvedbe nevtralizacijskega testa shranili pri –20°C.

3.2.2 Dokazovanje protiteles proti virusu IHN z virus nevtralizacijskim testom (VNT)

Virus nevtralizacijski test je specifična metoda dokazovanja nevtralizacijskih protiteles proti virusu IHN in je primeren način spremljanja okužbe z virusom IHN v posamezni jati rib. Sama izvedba testa je odvisna od prisotnosti na toploto občutljivih serumskih faktorjev (komplementni sistem). Za izvedbo virus nevtralizacijskega testa smo uporabili občutljivo celično linijo EPC, gojeno v rastnem gojišču, komplement, slovenski virusni izolat 1654/08, pozitivne in negativne serumske kontrole ter serumske vzorce, pri katerih smo določali titre nevtralizacijskih protiteles.

Z nevtralizacijskim testom smo v vzorcih serumov rib dokazovali prisotnost nevtralizacijskih protiteles (IgM) proti virusu IHN. Test smo izvajali v mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom

(TPP, Švica) v skladu z navodili AFSSA – Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija.

Preiskovane serume smo pred izvedbo testa inkubirali v vodni kopeli (Sutjeska, Beograd, SČG) 30 minut pri 45 °C, da smo inaktivirali komplement v preiskovanem serumu.

24 ur pred izvedbo testa smo pripravili ustrezno število mikrotitrskih plošč, v jamice katerih smo nanесли po 150 µl suspenzije celične linije EPC.

Glede na število preiskovanih serumov smo v vse jamice mikrotitrskih plošč z U-dnom (NUNC, Danska) nanесли 30 µl rastnega gojišča za celično linijo EPC in še dodatnih 30 µl rastnega gojišča v jamice, ki nam bodo služile za kontrolo rasti celic. Serume smo redčili z rastnim gojiščem v razredčini 1 : 20. V prvo vrsto jamic mikrotitrskih plošč smo nanесли 30 µl razredčine preiskovanega seruma in ga z multikanalno pipeto prenašali po 30 µl do zadnje vrste jamic na mikrotitrski plošči. Tako smo pripravili serijo razredčin seruma od začetne razredčine v jamici 1 : 40 do končne 1 : 320.

Kontrolni pozitivni serum (titer protiteles 1 : 320) in kontrolni negativni serum smo pripravili po enakem postopku kot razredčine preiskovanih serumov in ju nanесли v ustrezne jamice mikrotitrskih plošč.

Komplement in njegove razredčine, ki smo jih uporabili v testu, smo med celotnim postopkom hranili na ledu. Komplement smo pripravili v razredčini 1:160 z gojiščem in ga po 30 µl nanесли na jamice, ki so nam služile za kontrolo citotoksičnosti komplementa. Preostali količini razredčenega komplementa (1 : 160) smo dodali 160 µl virusne razredčine referenčnega virusa N61, ki je v končni razredčini vsebovala 6×10^4 TCID₅₀ in jo nanесли na vse jamice mikroplošče, v vsako po 30 µl.

Mikroplošče smo inkubirali pri 5 °C ± 3 °C še nadaljnjih 16–24 ur v vlažni komori.

Naslednji dan smo 50 µl vsebine jamic mikrotitrskih plošč s predhodo pripravljenimi serumskimi razredčinami nanесли na mikroplošče, v katerih smo gojili celično linijo EPC, katere sloj je pokrival 80–90 % površine jamice.

Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali od 4 do 5 dni pri 15 °C in s 5 % CO₂.

Po inkubaciji smo celice dnevno opazovali z invertnim svetlobnim mikroskopom. Če na sloju celične linije EPC nismo opazili CPE, je to pomenilo, da so v serumu prisotna protitelesa, ki so virusu IHN preprečila pritrjevanje in vstop v občutljivo celico. Če v preiskovanem serumu ni bilo prisotnih nevtralizacijskih protiteles, smo na celičnem sloju opazili CPE.

Po inkubaciji smo iz mikrotitrskih plošč odlili vsebino jamic. Celice smo fiksirali in obarvali s pripravljeno raztopino, ki je vsebovala 1,3 g kristal vijoličnega (Merck, ZDA), 200 ml absolutnega etanola (Merck, ZDA) in 800 ml destilirane vode.

Test je bil veljaven, če je bil celični sloj EPC v jamicah kontrole celične linije EPC in v jamicah, kjer smo dodali samo razredčino komplementa, nepoškodovan in konfluenten, če je bila v jamicah z razredčinami kontrole referenčnega seva virusa prisotna 75–90 % destrukcija celičnega sloja, v jamicah kontrolnega negativnega seruma prisotna enako obsežna destrukcija celičnega sloja kot pri kontrolnem virusu in v jamicah kontrolnega pozitivnega seruma prisoten pričakovan titer nevtralizacijskih protiteles.

Pri vrednotenju rezultatov smo razredčine 1 : 40 zanemarili zaradi nespecifičnih reakcij, kot je citotoksičnost. Rezultat je bil pozitiven, če smo v preiskovanem serumskem vzorcu določili titer nevtralizacijskih protiteles IgM v razredčini 1 : 80 ali več.

3.3 BIOLOŠKI POSKUS

3.3.1 Gojišče za gojenje primarne celične kulture srčnega tkiva (kardiomiocitov) šarenke in soške postrvi

Sestava in postopek priprave rastnega gojišča:

- 500 ml gojišča Opti-MEM® I Reduced – Serum Medium (1x) (with GlutaMAX™-I) (Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA),
- 200 ml fetalnega govejega seruma (FBS, Lot. No. 41F5190K, Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA), ki je bil v testu na prisotnost nukleinske kisline virusa BVD negativen,
- 30 ml (100x) antibiotika z antimikotikom (Antibiotic/Antimycotic Solution, Gibco®, Invitrogen Corporation™, ZDA).

pH gojišča smo umerili na $7,6 \pm 0,2$ in ga s sistemom za filtriranje Corning® filter systems filtrirali skozi celuložnoacetatni filter s porami velikosti $0,22 \mu\text{m}$ (Corning, ZDA). Hranili smo ga v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C.

3.3.2 Raztopina za pripravo primarne kulture srčnega tkiva (kardiomiocitov)

V 50 ml sterilno steklenico (Brandt) smo nalili 25 ml PBS in mu dodali 25 ml mešanice tripsina z EDTA (0,05-odstotni Trypsin, EDTA•4Na, Gibco®, Invitrogen Corporation™).

Vsebinsko steklenice smo s sistemom za filtriranje Corning® filter systems filtrirali skozi celuloznoacetatni filter s porami velikosti 0,22 µm (Corning, ZDA). Raztopino smo alikvotirali po 5 ml v sterilne 15 ml epruvete, jih označili in shranili v hladilniku pri temperaturi od 2 do 8 °C do uporabe.

3.3.3 Določanje občutljivosti soške postrvi (*Salmo marmoratus*) na okužbo z virusom IHN

Ministrstvo za kmetijstvo, prehrano in gozdarstvo, Veterinarska uprava RS je izdalo dovoljenje za izvedbo biološkega poskusa, ki smo ga izvajali v Virološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo in na Inštitutu za zdravstveno varstvo divjadi rib in čebel Veterinarske fakultete. V biološki poskus smo vključili 50 šarenk in 50 soških postrvi, ki smo jih dobili iz ribogojnice Soča iz Kobarida, ki je prosta okužb z virusi IHN, VHS in IPN. Ribe smo gojili v pretočnih akvarijih, napajanih z vodovodno vodo. Temperatura vodnega okolja je bila od 10 °C do 11 °C, v prostoru pa do največ 14 °C.

Takoj po prinosu rib na Inštitutu za divjad, ribe in čebele smo ribe naselili v ločena akvarija, kjer smo jih ob minimalnem vnosu dnevne potrebe po hrani za vzdrževanje gojili 3 tedne, da so se na novo okolje prilagodile. S tem smo pri samem biološkem poskusu izločili število poginjenih rib, ki bi v postopku biološkega poskusa poginile zaradi stresa (prevoz, sprememba življenjskega prostora), kar bi imelo opazen vpliv v postopku vrednotenja in pri interpretaciji rezultatov. Pred izvedbo biološkega poskusa so bile ribe živahne in brez kliničnih znakov bolezni.

Skupino šarenk smo razdelili v 3 skupine, in sicer A, B in C. Gojili smo jih v treh ločenih pretočnih akvarijih, prostornine 50 litrov. V vsaki skupini je bilo po 10 šarenk.

Pri populaciji soških postrvi smo uporabili enak sistem delitve in kategorizacije v pretočne akvarije.

Pred izvedbo biološkega poskusa smo iz vsake skupine žrtvovali eno ribo, njene organe pa testirali na prisotnost virusov IHN, VHS in IPN.

Skupini A in B populacij soške postrvi in šarenke sta bili testni skupini, ki smo jih intraperitonealno (i/p) okužili z virusom IHN, ki smo ga pripravili v virusni suspenziji.

Za pripravo virusne suspenzije smo uporabili slovenski izolat virusa IHN, ki smo ga dokazali leta 2008 v eni izmed slovenskih ribogojnic. Virus smo namnožili v celični kulturi in mu z

metodo po Reed-Muenchu (Reed in Muench, 1938) določili titer oziroma 50-odstotno infektivno dozo TCID₅₀.

Pri testni skupini A smo uporabili virusno suspenzijo z delovno razredčino virusa IHN 10⁻⁵ TCID₅₀/ml, v testni skupini B pa je bila delovna razredčina virusa 10⁻³ TCID₅₀/ml. Pri obeh skupinah populacij šarenke in soške postrvi smo i/p injicirali 100 µl pripravljene virusne suspenzije. Testnima skupinama C populacij soške postrvi in šarenke smo intraperitonealno vbrizgali 100 µl fiziološke raztopine. Služili sta nam kot kontrolni skupini.

Biološki poskus je trajal 45 dni. Vsak dan poskusa smo redno beležili število poginjenih rib v vseh akvarijih, opazovali morebitne izražene klinične znake in opažanja zabeležili. Vsak dan smo spremljali temperaturo vodnega okolja in temperaturo prostora, v katerem so se nahajali akvariji.

Poginjene ribe smo še isti dan patoanatomsko pregledali in odvzeli organe (ledvice, vranico, jetra, možgane). Iz organov smo pripravili organsko suspenzijo po navodilih Diagnostičnega priročnika OIE. Organsko suspenzijo smo testirali na prisotnost virusa IHN z metodo izolacije virusa na celični kulturi in s klasično molekularno metodo RT-PCR. Ob koncu poskusa smo preživele ribe najprej narkotizirali s pripravkom MS-222 (vodna raztopina 100 mg/l trikain metan sulfonata; Sandoz, Švica) in jih nato žrtvovali.

3.3.4 Obdelava tkiv za patohistološko in imunohistokemično preiskavo

Tkivne vzorce šarenk in soških postrvi smo fiksirali v 10 % puferiranem formalinu, jih impregnirali s parafinom in nato izdelali parafinske bloke tkiv.

3.3.4.1 Barvanje s hematoksilinom in eozinom

Tkivne rezine debeline 4 µm smo najprej deparafinizirali v ksilolu in padajoči vrsti alkoholov, jih obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE) in dehidrirali v naraščajoči vrsti alkoholov. Postopek barvanja smo zaključili z bistrenjem v ksilolu in pobarvane tkivne rezine pokrili s sintetično smolo in pokrovnim stekelcem.

3.3.4.2 Postopek imunohistokemične preiskave za dokazovanje prisotnosti virusnega antigena virusa IHN

Tkivne rezine debeline 4 μm smo najprej deparafinizirali. Antigen smo razkrili z obdelavo z mikrovalovi v citratnem pufru (pH 6,0), ki je trajala 20 minut. Potem smo tkivne rezine ohladili do sobne temperature. Po hlajenju smo rezine kratko sprali z destilirano vodo.

Za imunohistokemično označevanje smo nato uporabili aparaturo DAKO Autostainer Universal Staining System (DAKO North America, Inc., ZDA). Spiranju je sledila inkubacija z mišjimi monoklonskimi protitelesi proti virusnim beljakovinam nukleokapside BIO 285 virusa IHN (BioX Diagnostics, Belgija). Primarna protitelsa smo redčili 1: 100 v DAKO Cytomation Antibody Diluent (DAKO, kataloška oznaka S0805) in tkivne rezine v njem inkubirali eno uro na sobni temperaturi. Nato smo rezine 5 minut spirali v izpiralnem pufru (TRIS-HCl-NaCl, pH 7,5). Za inhibicijo endogene peroksidaze smo uporabili Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL™ (DAKO, kataloška oznaka S2023). Postopek inhibicije je trajal 30 minut. Z izpiralnim pufrom smo nato tkivne rezine spirali 5 minut. Na tkivne rezine smo nato nanesti sekundarna protitelesa, konjugirana s polimerom označenim s hrenovo peroksidazo, iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) (steklenička A). Tkivne rezine smo v sekundarnih protitelesih inkubirali v vlažni komori 20 minut. Sledilo je ponovno, 5-minutno spiranje v izpiralnem pufru. Tkivne rezine smo nato 7 minut inkubirali pri sobni temperaturi v delovni raztopini barvnega substrata 3-diaminobenzidina (DAB), ki smo ga pripravili tik pred uporabo. Delovno raztopino DAB smo pripravili tako, da smo 1 ml pufru iz kita (Substrate Buffer – steklenička B) dodali 20 μl kromogena iz kita (DAB+ Chromogen – steklenička C). Sledilo je spiranje rezin z destilirano vodo, nato kontrastiranje z Mayerjevim hematoksilinom 1 minuto, 1-minutno spiranje v puferirani fiziološki raztopini (PBS) in nato 20 minutno spiranje pod tekočo vodo. Iz tkivnih rezin smo nato v postopku dehidracije z naraščajočimi koncentracijami alkoholov odstranili vodo, s ksilolom bistrili in pokrili s sintetično smolo. Pri imunohistokemičnem postopku, pri katerem kot barvni substrat uporabimo DAB, je pozitivna reakcija vidna kot rjav reakcijski produkt. Po kontrastiranju s hematoksilinom se jedra celic obarvajo nežno modro.

3.3.5 Dokaz občutljivosti šarenke in soške postrvi na okužbo z virusom IHN – primarna celična kultura srčnega tkiva (kardiomicitov)

V poskusu smo pripravili primarno celično kulturo kardiomiocitov šarenke in soške postrvi, ki smo jih do začetka priprave celične kulture gojili v pretočnih akvarijih na Inštitutu za zdravstveno varstvo divjadi rib in čebel Veterinarske fakultete, pri temperaturi vode med 10 °C in 11 °C. Ribe so bile brez kliničnih znamenj bolezni in živahne.



Slika 3-11: Soška postrv.

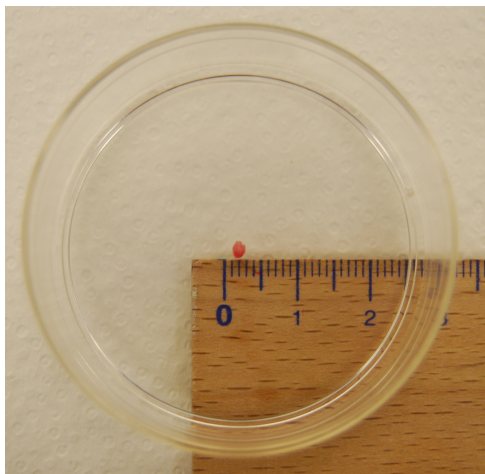
Pred pripravo primarne celične kulture kardiomiocitov smo žrtvovali eno ribo iz vsake populacije in jo testirali na prisotnost virusov IHN, VHS in IPN (Slika 3-2).

Najprej smo ribo anestezirali s preparatom MS-222 (trikain metan sulfonat, angl. *Tricaine methane sulphonate*) v končni razredčitvi 1 : 10.000 v vodi (Anderson in sod., 1996). Ribo smo izkrvaveli s punkcijo kavdalne vene ali z odstranitvijo repne plavuti. Izkrvavitev je ključnega pomena, saj eritrociti preprečujejo in onemogočajo dobro pritrditev celic na podlago steklenice, v kateri gojimo celično kulturo. Pred sekcijo smo ribo dobro obrisali s 70-odstotnim alkoholom. Ventralno na steni trebušne votline smo naredili incizijo, zarezali do glave, odstranili škrge in aseptično odvzeli srce (Slika 3-3).



Slika 3-12: Soška postrv ob raztelesbi.

Srce smo prenesli na sterilno plastično petrijevko premera 60 mm (Greiner Bio-One, Nemčija) in ga razrezali s skalpelom na približno 0,5 mm³ velike koščke (Slika 3-4).



Slika 3-13: Srce soške postrvi.

Tako pripravljeno srčno tkivo smo prenesli v sterilno 15 ml epruveto z raztopino za pripravo primarne kulture kardiomiocitov in ga inkubirali preko noči pri 20 °C v inkubatorju s 5-odstotno vsebnostjo CO₂. Po inkubaciji smo epruveto s srčnim tkivom v raztopini za pripravo primarne kulture kardiomiocitov centrifugirali pri 20 °C 5 minut pri 800 obr/min, odpipetirali supernatant in ga zavrgli. Na dnu epruvete zbranim celicam smo dodali 8 ml gojišča za gojenje primarne celične kulture kardiomiocitov šarenke in soške postrvi, jih previdno pomešali in prenesli v sterilno steklenico za gojenje celičnih kultur T-25.

Celice smo inkubirali 14 dni. Po 14 dneh smo celicam zamenjali gojišče in jih ponovno inkubirali pri 20 °C s 5 odstotki CO₂ toliko časa, dokler se celice niso razrasle po celotni površini steklenice T-25. Nato smo celice tripsinizirali po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.1.1.

Med postopkom inkubacije ali gojenja kardiomiocitov, ta je v povprečju trajal 10 mesecev, smo celicam redno, enkrat tedensko menjavali gojišče.

4 REZULTATI

4.1 NEPOSREDNE METODE

4.1.1 Klasične virološke tehnike

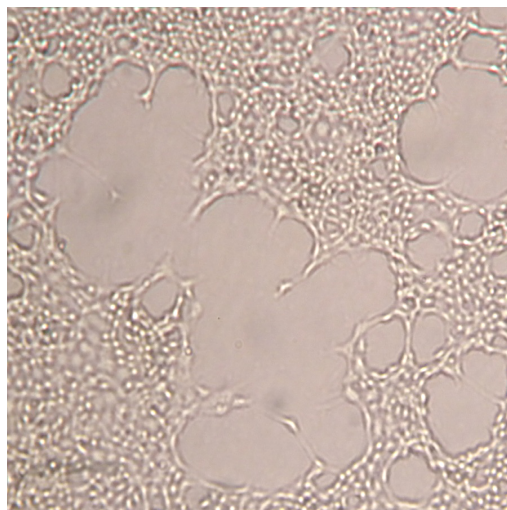
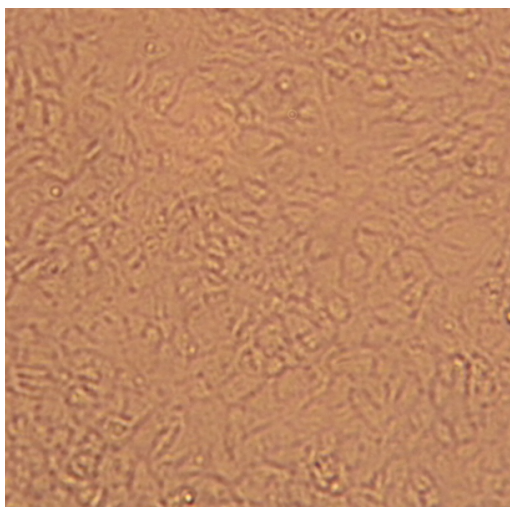
4.1.1.1 Izolacija virusa na celični kulturi

V obdobju od leta 2005 pa do konca leta 2010 smo na prisotnost virusa IHN pregledali 1781 vzorcev postrvi: parenhimskih organov, ovarialne in semenske tekočine. Virus IHN smo dokazali v 51 vzorcih.

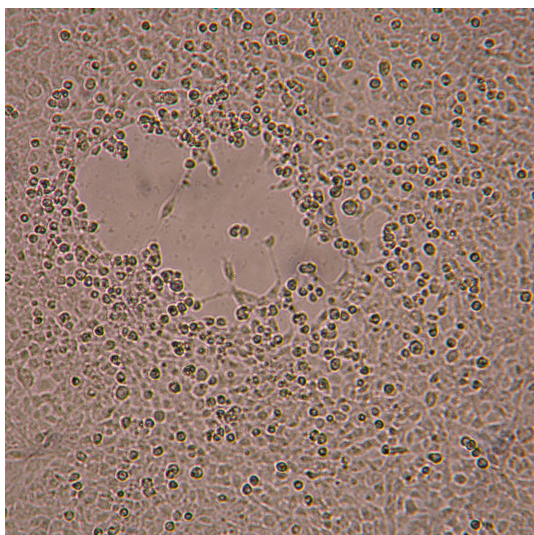
Vzorčenje je bilo opravljeno v skladu z letno Odredbo o izvajanju sistematičnega spremljanja stanja bolezni in cepljenj živali, ki je bila izdana na podlagi 1. točke 45. člena Zakona o veterinarstvu (Uradni list RS, št. 33/01, 110/02 – ZGO-1, 45/04 – ZdZPKG, 62/04 – odl. US in 93/05 – ZVMS) ter sedmega odstavka 15. člena in za izvedbo petega odstavka 6. člena Zakona o veterinarskih merilih skladnosti (Uradni list RS, št. 93/05). V skladu z Odredbo je treba za preiskavo na virusno hemoragično septikemijo postrvi (VHS) in infekcijsko hematopoetsko nekrozo (IHN) odvzeti in preiskati ovarialno in semensko tekočino vseh plemenskih jat postrvi in lipanov. V ribogojnicah, ki kupujejo ikre, vršijo promet oziroma trgujejo z živimi ribami, je treba zaradi bolezni iz prejšnjega odstavka enkrat letno vzorčiti in preiskati organe 30 rib v času, ko je temperatura vode v ribogojnici pod 14 °C.

V primeru suma bolezni so bili odvzeti organi (ledvice, vranica, srce in možgani) odraslih rib ali zarod.

Od skupno 1781 vzorcev rib, ki smo jih testirali z metodo izolacije virusa na celični kulturi, se je značilen CPE za virus IHN na občutljivi celični liniji EPC pojavil pri 51 vzorcih organov šarenk (Slika 4-1). V žarišču CPE so bile celice videti kot napihnjeni baloni. Jedro celic je bilo pomaknjeno na periferijo. Poškodovane celice so se odlepile od dna stekleničke za gojenje celične kulture in so prosto plavale v rastnem gojišču. Mesto, kjer so se celice zaradi delne ali popolne lize virusa odlepile od rastne podlage, imenujemo plak. Na robovih takih mest smo lahko opazili značilno združevanje poškodovanih celic v grozdom podobne strukture.



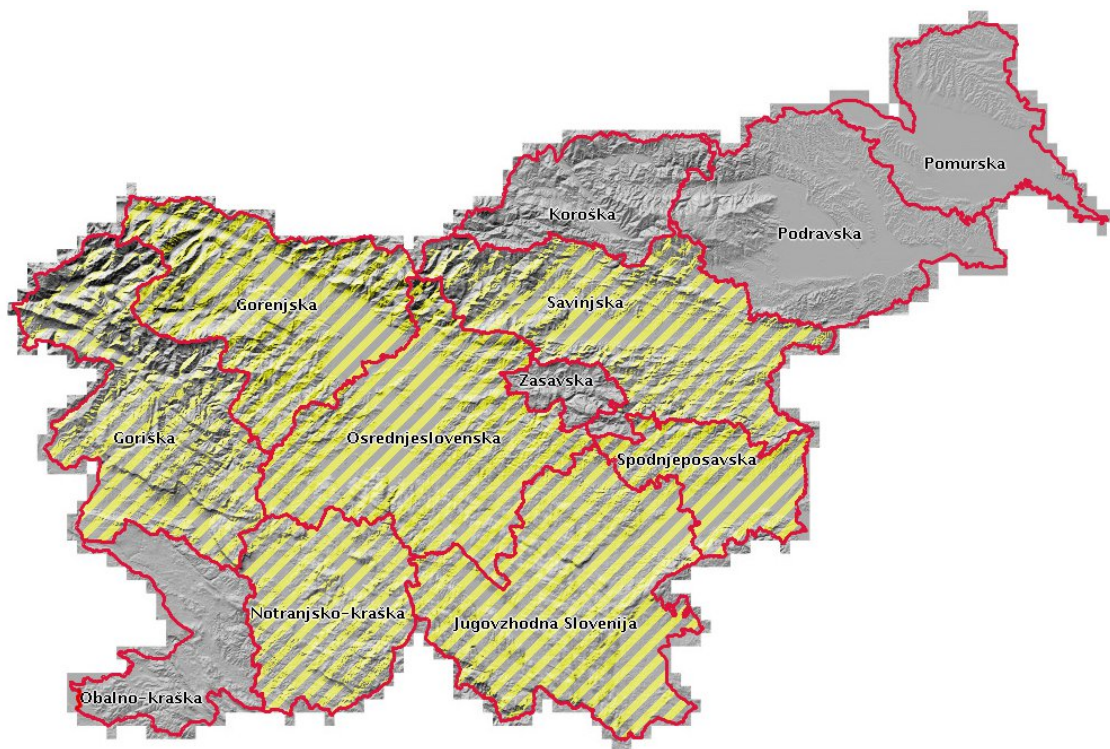
Slika 4-14: Nepoškodovan, porasel sloj EPC (levo, 200-kratna povečava) in pojav CPE na celični liniji EPC po 48 urah po inokulaciji virusa IHN (desno, 100-kratna povečava).



Slika 4-15: Pojav citopatskega efekta, značilnega za virus IHN na celični liniji EPC, 48 ur po inokulaciji virusa IHN (200-kratna povečava).

Prve citopatske spremembe na celičnem sloju EPC smo opazili že drugi dan inkubacije inokuliranih supernatantov testiranih vzorcev pri 14 °C, pri razredčini inokuliranega vzorca 1:90 (Slika 4-2).

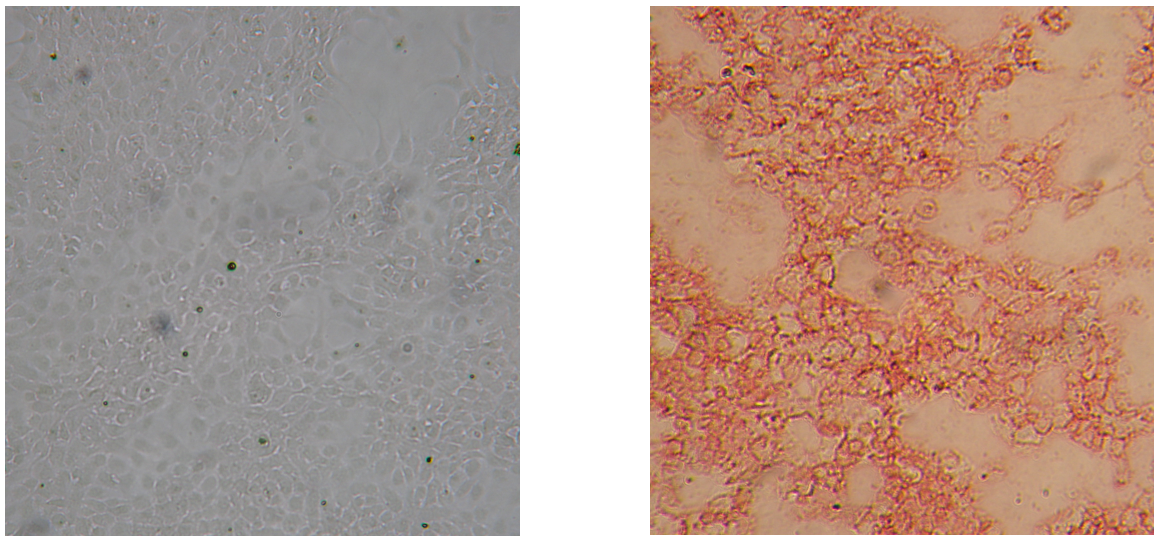
Vzorci, pri katerih se je pojavil CPE, so bili odvzeti v 7 slovenskih regijah. Prisotnost virusa IHN smo v testiranih vzorcih po prvi pasaži potrdili z imunoperoksidaznim testom.



Slika 4-16: Slovenske regije, v katerih smo v letih 1997–2010 dokazali prisotnost virusa IHN. Vir: Statistični urad Republike Slovenije.

4.1.1.2 Imunoperoksidazni test

Pri vseh 51 vzorcih, pri katerih se je pri metodi izolacije virusa na celični kulturi na celični liniji EPC pojavil CPE, smo prisotnost virusa IHN potrdili z imunoperoksidaznim testom. Pri vzorcih, pri katerih smo dokazali značilno rdeče obarvanje citoplazme, kar je dokaz prisotnosti virusnega proteina N (virusnega antigena), smo reakcijo ovrednotili kot pozitivno (Slika 4-4).



Slika 4-17: Negativen rezultat imunoperoksidaznega testa na celični liniji EPC (levo, 200-kratna povečava) in značilno rdeče obarvanje citoplazme celic v primeru pozitivne reakcije (desno, 200-kratna povečava) in dokaza virusa IHN.

V imunoperoksidazni test smo poleg pozitivne in negativne kontrole vključili tudi 20 vzorcev, ki v testu izolacije virusa IHN na celični kulturi na celični liniji EPC niso povzročili CPE. Vseh 20 vzorcev je v imunoperoksidaznem testu reagiralo negativno.

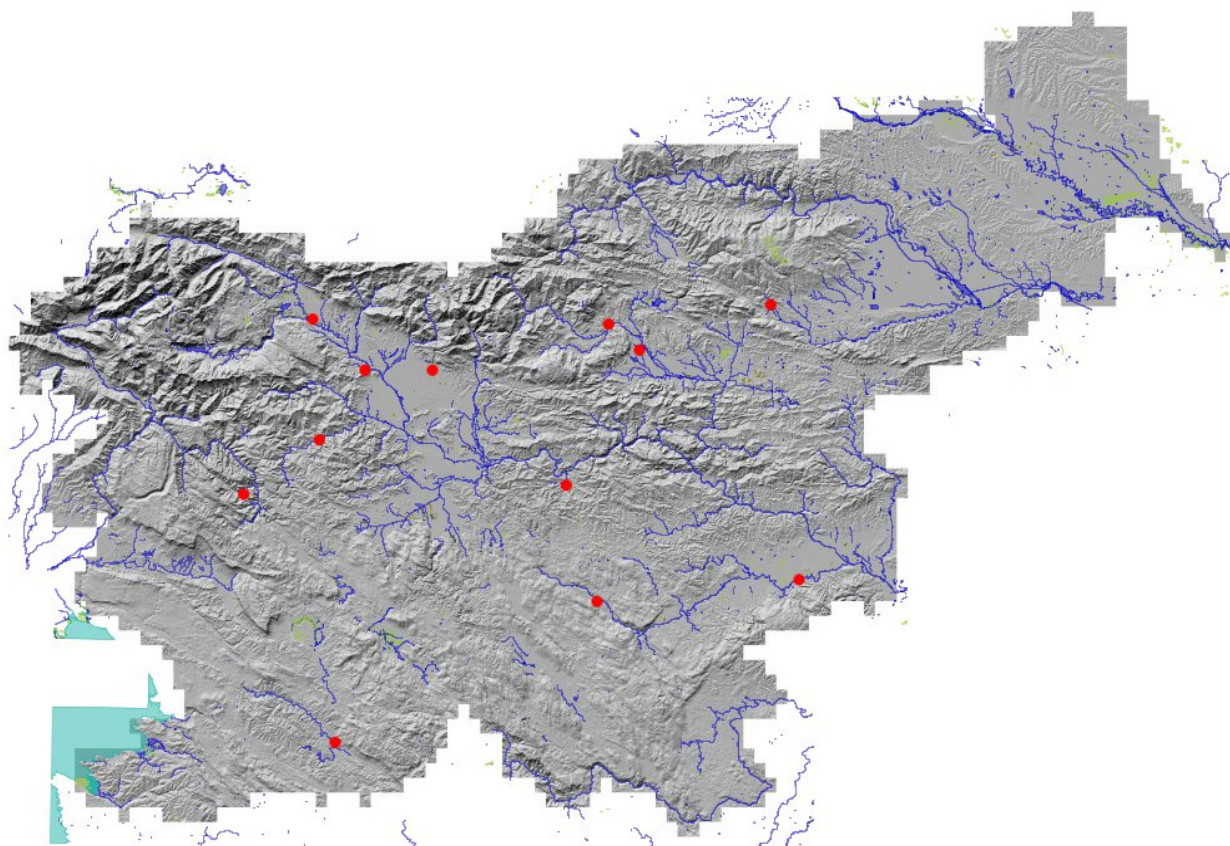
Pri vseh pozitivnih vzorcih smo virus IHN dokazali v organih rib.

Pozitivne vzorce na virus IHN iz ribogojnic smo časovno (Tabela 4-1) in geografsko (Slika 4-5) opredelili.

Regija	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Osrednjeslovenska	2			1		1
Gorenjska		1		2		2
Goriška			1			
Notranjsko-kraška			1			
Jugovzhodna Slovenija		1			1	
Savinjska		2		1		1
Posavje	2		2			

Tabela 4-3: Številčna in časovna opredelitev pozitivnih ribogojnic na prisotnost virusa IHN po slovenskih regijah. Vzorci so bili odvzeti v obdobju od leta 2005 do 2010.

V Osrednjeslovenski regiji smo virus dokazali v 3 ribogojnicah, v Gorenjski regiji v 5 ribogojnicah, v Goriški regiji v 1, v Notranjsko-kraški v 1, prav tako tudi v Jugovzhodni Sloveniji, v Savinjski regiji v 3 in v Posavju v 3 ribogojnicah. Iz nadaljnjih raziskav smo izključili vzorce kontrole sanacije ribogojnic po okužbi z virusom IHN.



Slika 4-18: Geografska lega ribogojnic, v katerih smo v letih 2005–2010 dokazali virus IHN. Vir: Statistični urad Republike Slovenije.

4.1.2 Molekularne metode

4.1.2.1 Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR v odseku gena za nukleokapsidni protein (ORF1), glikoprotein G (ORF4) in protein NV (ORF5)

Pri 51 vzorcih, pri katerih smo z imunoperoksidaznim testom dokazali prisotnost virusa IHN, smo z molekularnimi metodami uspešno pomnožili odseke v genih za ORF1 (gen N), ORF4 (gen G) in ORF5 (gen NV) nukleinske kisline virusnih izolatov. Najprej smo z metodo RT-PCR prepisali virusno RNA v cDNA in nadaljevali s postopkom PCR. S pari začetnih oligonukleotidov smo pomnožili odseke genov za glikoprotein G, nukleokapsidni protein in protein NV. Virusno RNA smo dokazali v vseh 51 testiranih vzorcih. Prisotnost produktov PCR smo ugotavljali z elektroforezo v agaroznem gelu. Velikost produktov tarčnih zaporedij na genu za glikoprotein G, nukleokapsidni protein in protein NV je ustrezala pričakovani velikosti pridelkov PCR, ki je za glikoprotein G 532 bp, za nukleokapsidni protein 252 bp in protein NV 714 bp.



Slika 4-19: Dokazovanje produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Na sliki vidimo 532 bp velik odsek gena za glikoprotein G, ki smo ga dobili s pomnoževanjem tarčnega zaporedja na ORF4 z začetnima oligonukleotidoma E1 in E3n.



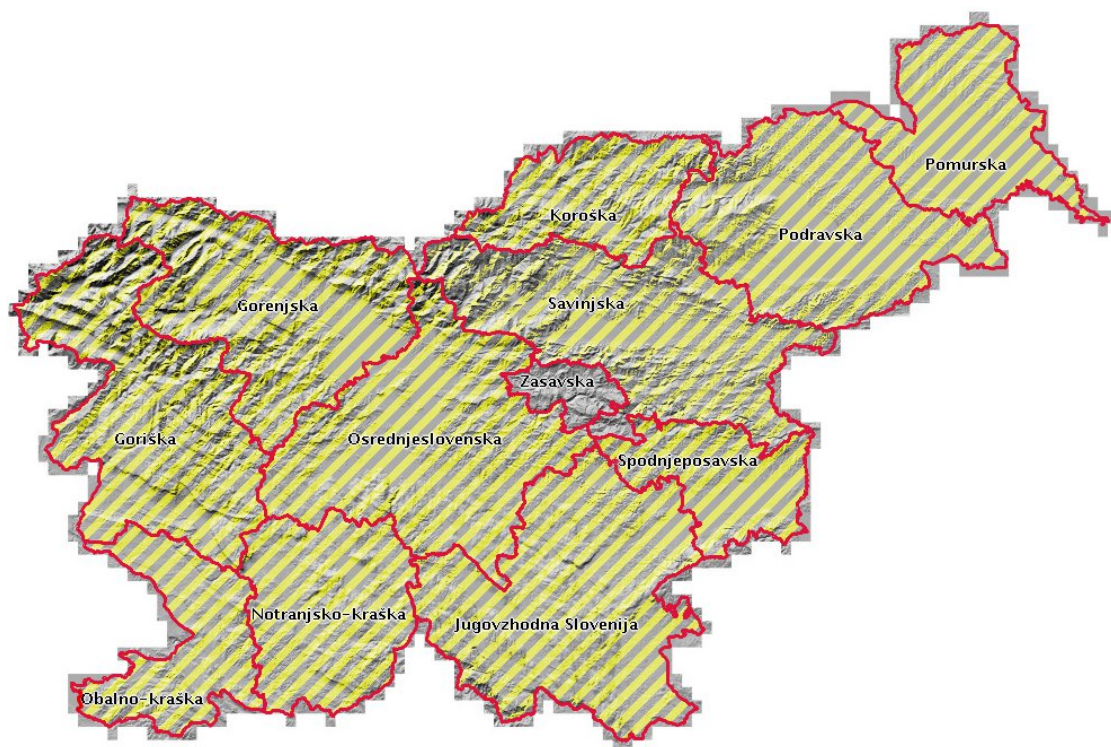
Slika 4-20: Dokazovanje produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Na sliki vidimo 252 bp velik odsek gena za nukleokapsidni protein, ki smo ga dobili s pomnoževanjem tarčnega zaporedja na ORF1 z začetnima oligonukleotidoma N-f in N-r.



Slika 4-21: Dokazovanje produktov PCR z elektroforezo v agaroznem gelu. Na sliki vidimo 714 bp velik odsek gena za protein NV, ki smo ga dobili s pomnoževanjem tarčnega zaporedja na ORF5 z začetnima oligonukleotidoma NV-f in NV-r.

Preiskovane vzorce smo testirali s tremi pari različnih začetnih oligonukleotidov (N-f/N-r, E1/E3n in NV-f/NV-r) in tako dokazovali tri različne tarčne odseke virusa IHN (ORF1, ORF4 in ORF5). S primerjavo rezultatov metode RT-PCR dokazovanja odsekov nukleokapsidnega gena, gena za glikoprotein G in gena NV smo dokazali, da so rezultati pomnoževanja virusne nukleinske kisline z vsemi tremi pari začetnih oligonukleotidov primerljivi in enako občutljivi. Rezultati so se 100-odstotno ujemali (Slika 4-6, Slika 4-7 in Slika 4-8).

V raziskovalno nalogo smo vključili tudi vzorce, odvzete v obdobju 1997–2005, pri katerih smo dokazali prisotnost virusnega antigena ali nukleinske kisline. Skupno smo tako z molekularnimi metodami obdelali 76 vzorcev, pozitivnih na prisotnost virusne RNA. Vzorci so bili odvzeti v letih 1997–2010 v 11 slovenskih regijah.



Slika 4-22: Slovenske regije, v katerih smo v letih 1997–2010 dokazali prisotnost virusa IHN.
Vir: Statistični urad Republike Slovenije.

V testiranje parenhimskih vzorcev in vzorcev ovarialne ter semenske tekočine rib smo z molekularno metodo RT-PCR poleg pozitivne in negativne kontrole vključili tudi 20 vzorcev, ki so v postopku dokazovanja virusnega antigena z imunoperoksidaznim testom reagirali negativno.

Z enostopenjsko reakcijo reverzne transkripcije in pomnoževanja nukleinske kisline smo virusno RNA dokazali pri 76 vzorcih, pri 20 vzorcih, ki so v imunoperoksidaznem testu reagirali negativno, pa tudi z metodo RT-PCR nismo dokazali virusne RNA.

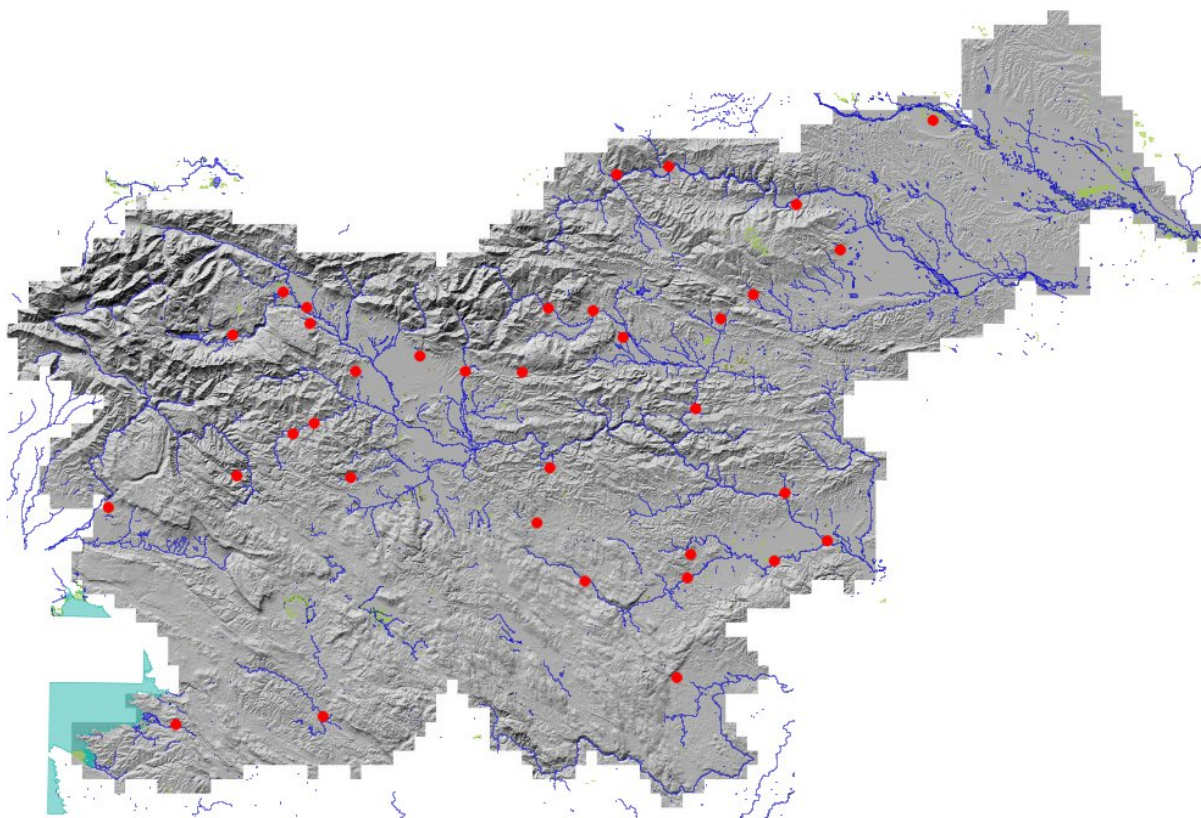
Največkrat smo virus IHN dokazali v organih rib, in sicer v 70 primerih, samo v 6 primerih pa smo virus IHN dokazali v ovarialni in semenski tekočini.

Regija	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Osrednjeslovenska			1			1			2			1		1
Gorenjska			1			1	1			1		2		2
Goriška											1			
Notranjsko-kraška											1			
Jugovzhodna Slovenija			1							1			1	
Savinjska					1			1		2		1		1
Posavje	1		1	1					2		2			
Obalno-kraška		1												
Pomurje														
Koroška	1				2									
Podravje		1												

Tabela 4-4: Številčna in časovna opredelitev pozitivnih ribogojnic na prisotnost virusa IHN po slovenskih regijah. Vzorci so bili odvzeti v obdobju od leta 1997 do 2010.

V Osrednjeslovenski regiji smo virus dokazali v 5 ribogojnicah, v Gorenjski regiji v 7 ribogojnicah, v Goriški regiji v 2, v Notranjsko-kraški v 1, prav tako tudi v Obalno-kraški regiji, v Podravju v 4, v Savinjski regiji v 6, v Pomurju v 1 ribogojnici, na Koroškem v 2, v Jugovzhodni Sloveniji v 4 in v Posavju v 4 ribogojnicah. Iz nadaljnjih raziskav smo izključili vzorce kontrole sanacij ribogojnic po okužbi z virusom IHN.

Pozitivne vzorce na virus IHN iz ribogojnic smo časovno (Tabela 4-2) in geografsko (Slika 4-10) opredelili.



Slika 4-23: Geografska lega ribogojnic, v katerih smo v letih 2005–2010 dokazali virus IHN. Vir: Statistični urad Republike Slovenije.

4.1.2.2 Določanje nukleotidnega zaporedja odseka v genu za glikoprotein G (ORF4)

Vsem 76 virusnim izolatom IHN, ki smo jih potrdili v časovnem obdobju 1997–2010 in dobili pridelke velikosti 532 bp, smo z avtomatskim sekvenciranjem določili nukleotidna zaporedja. S programsko aplikacijo DNASTAR smo nukleotidnim zaporedjem odstranili zaporedje začetnih oligonukleotidov in ta zaporedja tudi uredili. Zaporedja, velika 303 bp, smo z uporabo medmrežnega servisa BLAST primerjali z izbranimi nukleotidnimi zapisi v genski banki. Dobljena nukleotidna zaporedja gena G (mid-G regija) smo uporabili za filogenetsko analizo. S programom MEGA 4 smo izrisali filogram, s katerim smo ugotavljali filogenetske odnose med nukleotidnimi zaporedji slovenskih in tujih izolatov virusa IHN.

Nukleotidna zaporedja posameznih slovenskih izolatov so bila enaka, zato smo za filogenetsko analizo mid-G regije izbrali zaporedja 17 izolatov. V analizo so bili vključeni virusni izolati iz 8 slovenskih regij, odvzeti pa so bili v časovnem obdobju 1997–2006. Od leta 2007 do leta 2010 so bila nukleotidna zaporedja slovenskih izolatov virusa IHN identična nukleotidnim zaporedjem slovenskih virusnih izolatov, ki smo jih dokazali do leta 2006. Identična in ponavljajoča se nukleotidna zaporedja smo iz filogenetske analize izključili.

Regija	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Osrednjeslovenska			1			1				
Gorenjska			1				1			
Goriška										
Notranjsko-kraška										
Jugovzhodna Slovenija			1							
Savinjska					1			1		1
Posavje	1		1	1					1	
Obalno-kraška		1								
Pomurje										
Koroška	1				2					
Podravje		1								

Tabela 4-5: Regijska in časovna razporeditev vzorcev pozitivnih na virus IHN, ki smo jih obdelali v filogenetski analizi.

Nukleotidna zaporedja 17 pomnoženih tarčnih odsekov na genu za glikoprotein G smo uredili s programoma Seqman in Editseq programskega paketa Lasergene. Po obdelavi smo dobili 303 bp dolga soglasna zaporedja, ki smo jih s programom ClustalX2 poravnali s 43 znanimi delnimi zapisi nukleotidnih zaporedij gena G iz Avstrije, Nemčije, Italije, Francije, Severne Amerike in Japonske, ki so prosto dostopni v genski banki (Tabela 4-4). Zbrana in urejena nukleotidna zaporedja slovenskih izolatov virusa IHN smo s pomočjo programa Sequin 7.00 poslali v gensko banko GenBank, v kateri so sprejetim in potrjenim zaporedjem slovenskih izolatov virusa IHN podelili identifikacijske kode. Do slovenskih izolatov virusa IHN v genski banki GenBank dostopamo s kodama GU571159 - GU571175.

Nukleotidna zaporedja smo prevedli v aminokislinska zaporedja, dolga 101 aminokislino.

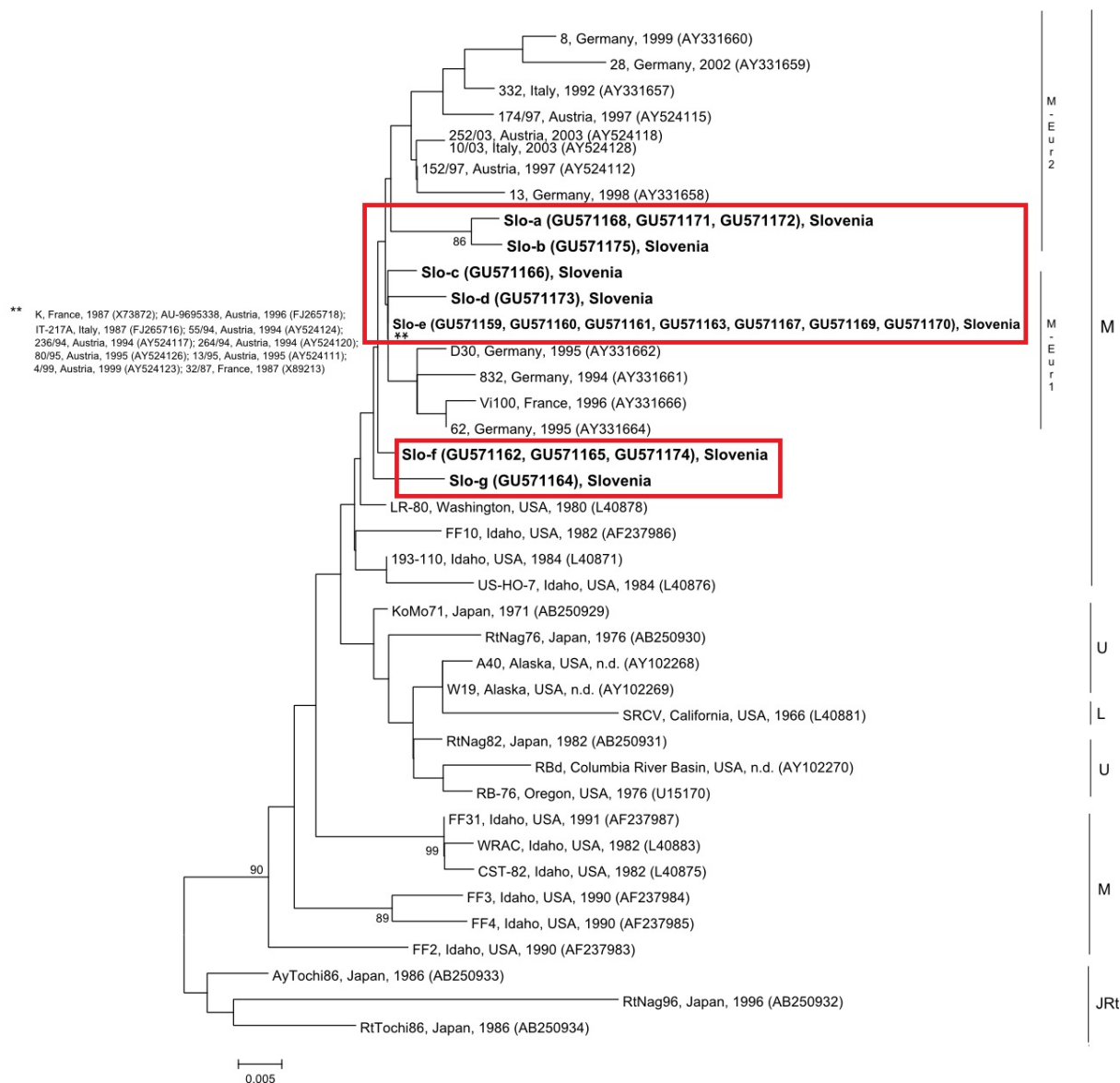
Izolat virusa	Leto izolacije	Genska skupina	Država izbruha	Referenca	Koda, dostopna v GenBank
Vi100	1996	M-Eur1	Francija	Enzmann in sod., 2005	AY331666
62	1995	M-Eur1	Nemčija	Enzmann in sod., 2005	AY331664
55/94	1994	M-Eur1	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524124
236/94	1994	M-Eur1	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524117

264/94	1994	M-Eur1	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524120
80/95	1995	M-Eur1	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524126
13/95	1995	M-Eur1	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524111
4/99	1999	M-Eur1	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524123
32/87	1987	M-Eur1	Francija	Schütze in sod., 1996	X89213
K	1987	M-Eur1	Francija	Schütze in sod., 1995	X73872
IT-217A	1987	M-Eur2	Italija	Johansson in sod., 2009	FJ265716
152/97	1997	M-Eur2	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524112
252/03	2003	M-Eur2	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524118
174/97	1997	M-Eur2	Avstrija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524115
8	1999	M-Eur2	Nemčija	Enzmann in sod., 2005	AY331660
13	1998	M-Eur2	Nemčija	Enzmann in sod., 2005	AY331658
832	1994	M	Nemčija	Enzmann in sod., 2005	AY331661
D30	1995	M	Nemčija	Enzmann in sod., 2005	AY331662
10/03	2003	M	Italija	Kolodziejek in sod., 2008	AY524128
AU-	1996	M	Avstrija	Johansson in sod., 2009	FJ265718
9695338					
332	1992	M	Italija	Enzmann in sod., 2005	AY331657
28	2002	M	Nemčija	Enzmann in sod., 2005	AY331659
LR-80	1980	M	Washington, ZDA	Nichol in sod., 1995	L40878
193-110	1984	M	Idaho, ZDA	Nichol in sod., 1995	L40871
US-HO-7	1984	M	Idaho, ZDA	Nichol in sod., 1995	L40876
FF10	1992	M	Idaho, ZDA	Troyer in sod., 2000	AF237986
FF31	1991	M	Idaho, ZDA	Troyer in sod., 2000	AF237987
WRAC	1982	M	Idaho, ZDA	Nichol in sod., 1995	L40883
CST-82	1982	M	Idaho, ZDA	Nichol in sod., 1995	L40875
FF3	1990	M	Idaho, ZDA	Troyer in sod., 2000	AF237984
FF4	1990	M	Idaho, ZDA	Troyer in sod., 2000	AF237985
FF2	1990	M	Idaho, ZDA	Troyer in sod., 2000	AF237983
KoMo71	1971	U	Japonska	Nishizawa in sod., 2006	AB250929
RtNag76	1976	U	Japonska	Nishizawa in sod., 2006	AB250930
W19	n.p.	U	Aljaska, ZDA	Emmenegger in sod., 2002	AY102269
A40	n.p.	U	Aljaska, ZDA	Emmenegger in sod., 2000	AY102268
RtNag82	1982	U	Japonska	Nishizawa in sod., 2006	AB250931
RBd	n.p.	U	Col. River Basin, ZDA	Anderson in sod., 2000	AY102270
RB-76	1976	U	Oregon, ZDA	Kim et al., 1994, neob.	U15170
SRCV	1966	L	California, ZDA	Nichol in sod., 1995	L40881
AyTochi86	1986	JRt	Japonska	Nishizawa in sod., 2006	AB250933
RtNag96	1996	JRt	Japonska	Nishizawa in sod., 2006	AB250932
RtTochi86	1986	JRt	Japonska	Nishizawa in sod., 2006	AB250934
SLO1/97	1997	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571159
SLO2/97	1997	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571160
SLO1/98	1998	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571161
SLO2/98	1998	M	Slovenija	t.š.	GU571162
SLO1/99	1999	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571163
SLO2/99	1999	M	Slovenija	t.š.	GU571164
SLO3/99	1999	M	Slovenija	t.š.	GU571165
SLO4/99	1999	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571166
SLO1/00	2000	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571167
SLO1/01	2001	M-Eur2	Slovenija	t.š.	GU571168
SLO2/01	2001	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571169
SLO3/01	2001	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571170
SLO1/02	2002	M-Eur2	Slovenija	t.š.	GU571171
SLO1/03	2003	M-Eur2	Slovenija	t.š.	GU571172
SLO1/04	2004	M-Eur1	Slovenija	t.š.	GU571173
SLO1/05	2005	M	Slovenija	t.š.	GU571174
SLO1/06	2006	M-Eur2	Slovenija	t.š.	GU571175

Tabela 4-6: Podatki o izolatih virusa IHN, vključenih v filogenetsko analizo odseka ORF4. Okrajšave: neob., neobjavljeno; n.p., ni podatka; t.š., ta študija.

4.1.2.3 Filogenetska analiza ORF4

Filogenetsko analizo smo opravili s programom MEGA 4 (Tamura in sod., 2007). Za izračun vrednosti distančne matrike smo uporabili Kimurin dvoparametrični model, ki upošteva neenakomerno hitrost zamenjav na različnih mestih zaporedja. Število sprememb v zaporedju, ki ga izračunamo na podlagi razdalje, nam da informacijo o filogenetski oddaljenosti. Z metodo povezovanja sosedov (angl. *neighbor joining*) smo izrisali filogram nukleotidnih zaporedij tarčnega odseka gena G virusa IHN in ga statistično ovrednotili z metodo vezanja (angl. *bootstrapping*) (1.000 ponovitev).



Slika 4-24: Nekoreninjeno filogenetsko drevo sorodnosti med slovenskimi izolati virusa IHN in 43 referenčnih izolatov virusa IHN. Slovenski izolati virusa IHN so označeni krepko.

V filogenetski analizi smo potrdili obstoj 3 glavnih genskih skupin, ki jih označujemo z U, M in L, ki sovpadajo z geografsko distribucijo posameznih virusnih izolatov v Severni Ameriki, ter genske skupine JRt, v katero so uvrščeni japonski izolati virusa IHN, dokazani po letu 1986. Vsi evropski izolati virusa IHN so uvrščeni v gensko skupino M. Delimo jo na dve genski podskupini, in sicer M-Eur1 in M-Eur-2. V prvo uvrščamo evropske virusne izolate, katerih izvor naj bi segal v Francijo, v gensko podskupino M-Eur-2 pa izolate, ki predstavljajo italijanske tipe virusnih izolatov IHN. Slovenski izolati so razporejeni v obe genski podskupini, M-Eur-1 in M-Eur-2, časovno in geografsko neodvisno (Slika 4-11).

Med 17 slovenskimi izolati virusa IHN smo z analizo delnih nukleotidnih zaporedij ORF4 na nukleotidnem nivoju ugotovili od 97,7- do 100-odstotno ujemanje. V primerjavi delnih zaporedij slovenskih izolatov z vključenimi referenčnimi izolati ugotavljamo več kot 91,4-odstotno ujemanje nukleotidnih zaporedij. Na aminokislinskem nivoju je bil odstotek ujemanja med slovenskimi izolati od 98 do 100 %, v primerjavi z referenčnimi sevi virusa IHN pa 86,1 %.

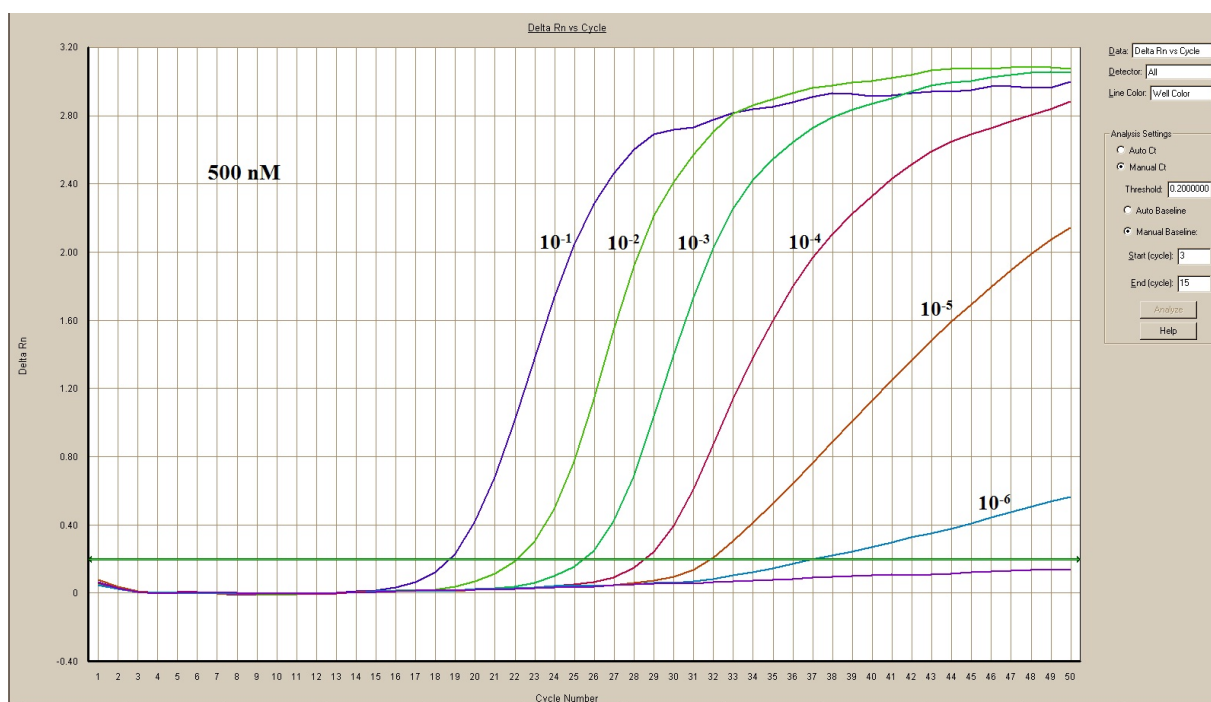
S filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov virusa IHN smo dokazali časovno in geografsko neodvisno razporeditev slovenskih izolatov virusa IHN znotraj genske skupine M.

4.1.2.4 Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR v realnem času

Z metodo RT-PCR v realnem času dosežemo boljšo občutljivost, specifičnost in ponovljivost. Za pomnoževanje tarčnega odseka posameznega gena virusa IHN je treba optimalne pogoje določiti eksperimentalno. Sestavo reakcijske zmesi v komercialnem kompletu reagentov SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System with ROX (Invitrogen™, ZDA), ki je bila že predhodno optimizirana s strani proizvajalca, smo delno modificirali in priredili termalni profil reakcije.

Pri delni optimizaciji metode smo spreminjali koncentracijo začetnih oligonukleotidov (200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 700 nM, 900 nM). Vsakemu vzorcu smo določili vrednost C_t in se glede na dobljene rezultate odločili za koncentracijo začetnih oligonukleotidov 500 nM, pri kateri je bil naklon standardne linearne regresijske krivulje še najbližje idealnemu naklonu, ki znaša $-3,32$.

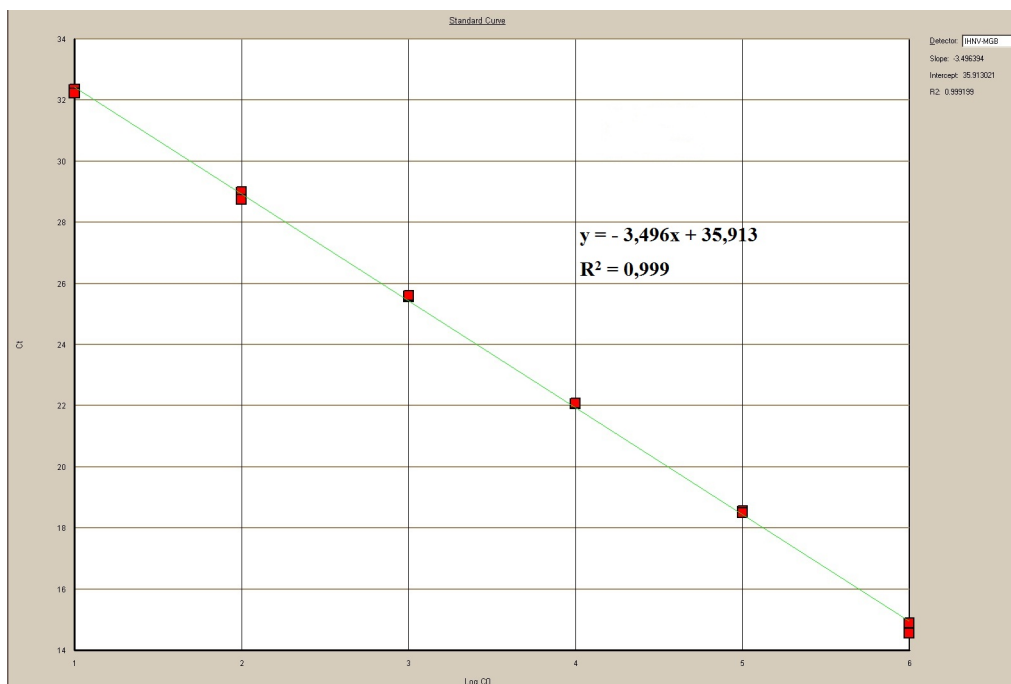
V postopku določanja občutljivosti metode RT-PCR v realnem času smo uporabili referenčni sev virusa IHN N61. 10-kratne razredčine osamljene virusne RNA (od 10^{-1} do 10^{-7}) smo testirali v dveh ponovitvah in so prikazane na sliki 4-12.



Slika 4-25: Rezultat titracije referenčnega izolata N61 virusa IHN z metodo RT-PCR v realnem času.

Rezultate titracije referenčnega seva N61 smo analizirali z aparaturo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, ZDA). Dobljene C_t vrednosti smo uporabili za pripravo standardne linearne regresijske krivulje in iz naklona premice odčitati učinkovitost reakcije.

Po testiranju razredčin osamljene RNA pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov 500 nM vrednost koeficienta linearne krivulje (R^2) je pri naklonu standardne krivulje $-3,496$ znašala $0,999$ (Slika 4-13).



Slika 4-26: Standardna linearna regresijska krivulja pri RT-PCR v realnem času za določanje virusa IHN pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov (IHNV-Tf / IHNV-Tr) 500 nM .

Hkrati smo določili tudi najvišjo virusno razredčino, pri kateri krivulja normalizirane fluorescence ΔRn prečka prag v najnižjem ciklu. Ocenili smo, da je najvišja vrednost, pri kateri je signal pomnoževanja še stabilen, C_t 40. Pri vrednosti C_t 40, ki sovpada z virusno razredčino 10^{-6} , še lahko zaznamo vzorce, ki so identični N61 v prileganju sonde in začetnih oligonukleotidov. Ta vrednost predstavlja spodnjo mejo občutljivosti reakcije.

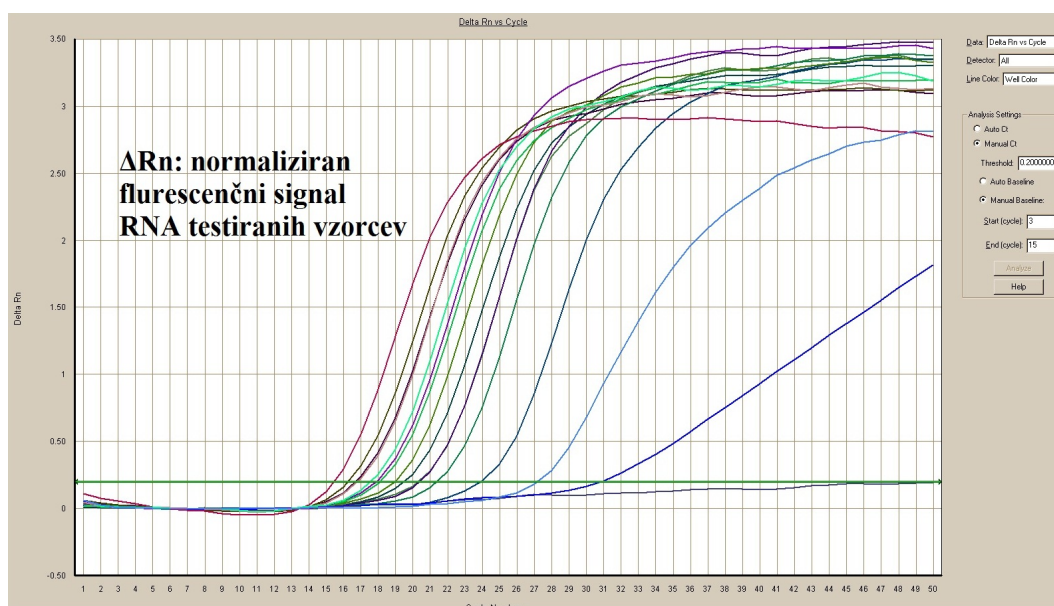
Vzorci, katerih vrednost C_t je bila manjša ali enaka 40, smo vrednotili kot pozitivne. Vzorce, katerih vrednost C_t je bila večja od 40, pa smo vrednotili kot negativne.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo v vseh 76 vzorcih, ki smo jih prej obdelali s klasičnimi virološkimi tehnikami in molekularno metodo RT-PCR, dokazovali prisotnost virusne nukleinske kisline. V postopek dokazovanja virusne nukleinske kisline z RT-PCR v realnem času smo poleg negativne in pozitivne kontrole, v testiranje vključili tudi 20 naključno izbranih vzorcev organov, ovarialne in semenske tekočine, ki so v postopku dokazovanja virusnega antigena z imunoperoksidaznim testom in pri dokazovanju virusne nukleinske metode z RT-PCR reagirali negativno.

Z metodo RT-PCR v realnem času smo pri 76 vzorcih dokazali prisotnost virusne RNA, pri 20 pa virusne nukleinske kisline nismo dokazali. Rezultati so podani v tabeli 4-5 in na sliki 4-1.

OZNAKA VZORCA	VREDNOST C _t	REZULTAT	OZNAKA VZORCA	VREDNOST C _t	REZULTAT
SI-1	20,33	poz.	SI-39	16,96	poz.
SI-2	19,50	poz.	SI-40	15,44	poz.
SI-3	16,69	poz.	SI-41	22,10	poz.
SI-4	23,96	poz.	SI-42	16,75	poz.
SI-5	16,27	poz.	SI-43	16,34	poz.
SI-6	20,39	poz.	SI-44	15,76	poz.
SI-7	21,37	poz.	SI-45	16,48	poz.
SI-8	18,99	poz.	SI-46	16,24	poz.
SI-9	17,40	poz.	SI-47	45,10	neg.
SI-10	nedet.	neg.	SI-48	nedet.	neg.
SI-11	18,11	poz.	SI-49	nedet.	neg.
SI-12	15,45	poz.	SI-50	18,52	poz.
SI-13	19,91	poz.	SI-51	15,36	poz.
SI-14	17,90	poz.	SI-52	15,32	poz.
SI-15	30,15	poz.	SI-53	47,84	neg.
SI-16	17,10	poz.	SI-54	nedet.	neg.
SI-17	24,91	poz.	SI-55	nedet.	neg.
SI-18	20,38	poz.	SI-56	nedet.	neg.
SI-19	19,01	poz.	SI-57	nedet.	neg.
SI-20	30,86	poz.	SI-58	nedet.	neg.
SI-21	22,22	poz.	SI-59	nedet.	neg.
SI-22	17,12	poz.	SI-60	nedet.	neg.
SI-23	16,80	poz.	SI-61	nedet.	neg.
SI-24	18,25	poz.	SI-62	nedet.	neg.
SI-25	23,11	poz.	SI-63	nedet.	neg.
SI-26	19,66	poz.	SI-64	nedet.	neg.
SI-27	17,92	poz.	SI-65	nedet.	neg.
SI-28	19,08	poz.	SI-66	nedet.	neg.
SI-29	17,55	poz.	SI-67	25,15	poz.
SI-30	19,06	poz.	SI-68	17,00	poz.
SI-31	18,32	poz.	SI-69	18,58	poz.
SI-32	18,62	poz.	SI-70	20,92	poz.
SI-33	16,18	poz.	SI-71	17,59	poz.
SI-34	16,41	poz.	SI-72	38,98	poz.
SI-35	18,04	poz.	SI-73	nedet.	neg.
SI-36	21,18	poz.	SI-74	18,39	poz.
SI-37	17,66	poz.	SI-75	nedet.	neg.
SI-38	27,74	poz.	SI-76	nedet.	neg.

Tabela 4-7: Rezultati RT-PCR v realnem času.



Slika 4-27: Rezultati RT-PCR v realnem času.

Rezultate, dobljene z metodo RT-PCR v realnem času, smo primerjali z rezultati izolacije virusa na celični kulturi ter rezultati klasične RT-PCR metode dokaza virusne RNA. Ujemanje rezultatov vzorcev, ki smo jih testirali z zgoraj omenjenimi metodami, je bilo 100-odstotno. Primerjava rezultatov opravljenih metod dokazovanja virusa IHN zajema časovno obdobje 2005–2010 (Tabela 4-6).

Leto	Št. preiskanih vzorcev	IVCK (CPE)	IP (IHN +)	RT-PCR (IHN +)	qRT-PCR (IHN +)
2005	691	24	24	24	24
2006	153	4	4	4	4
2007	240	14	14	14	14
2008	199	4	4	4	4
2009	218	1	1	1	1
2010	280	4	4	4	4
Skupaj	1781	51	51	51	51

Tabela 4-8: Primerjava rezultatov metod dokazovanja virusa IHN.

4.1.2.5 Primerjava občutljivosti metode izolacije virusa na celični kulturi z metodo RT-PCR v realnem času

Primerjali smo občutljivost klasične virološke tehnike izolacije virusa na celični kulturi in molekularne metode RT-PCR v realnem času.

Pripravili smo desetkratne razredčine (od 10^{-1} do 10^{-8}) referenčnega izolata N61, ki smo jih inokulirali na celično linijo EPC. Iste virusne razredčine smo uporabili za izolacijo virusne RNA z reagentom TRIzol®.

Na celični kulturi smo po 4 dnevih inkubacije referenčnemu izolatu virusa IHN v postopku titracije z metodo po Reed-Muenchu določili titer oziroma 50-odstotno infektivno dozo TCID₅₀, ki je znašala $10^{6,6}$ TCID₅₀/ml (4×10^6 TCID₅₀/ml).

Rezultate RT-PCR v realnem času, ki smo jih dobili iz razredčin celokupne RNA z znanimi koncentracijami virusa, smo uporabili za izdelavo standardne linearne regresijske krivulje. Vsako razredčino RNA (od 10^{-1} do 10^{-7}) smo v eni reakciji analizirali v dveh ponovitvah. Učinkovitost pomnoževanja posamezne reakcije smo izračunali iz naklona standardne krivulje. Najboljša učinkovitost pomnoževanja je bila v primeru, ko je bil naklon krivulje $-3,496$, vrednost koeficienta linearne krivulje R^2 pa je znašala 0,999 (Slika 4-12).

Razredčina 10^{-6} je s preračunano koncentracijo virusa 2 TCID₅₀/ml predstavljala teoretično spodnjo mejo detekcije.

Primerjava občutljivosti obeh metod je pokazala, da sta metoda izolacije virusa na celični kulturi in metoda RT-PCR v realnem času izolacije virusa na celični kulturi enako občutljivi. Meja občutljivosti reakcij pri obeh metodah je bila pri virusni razredčini IHN 10^{-6} .

4.1.2.6 Primerjava molekularnih metod za izolacijo in dokazovanje RNA referenčnega seva N61

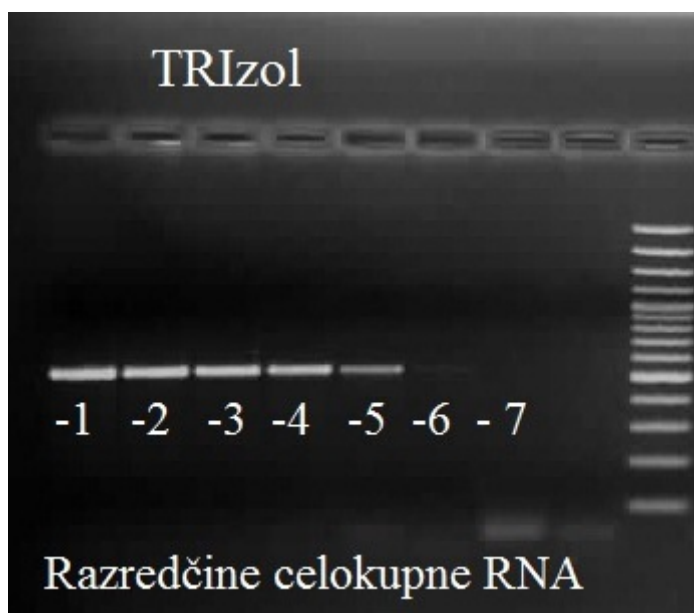
Med seboj smo primerjali dve metodi za izolacijo celokupne RNA, izolacijo celokupne RNA z reagentom TRIzol® in s kompletom reagentov QIAamp Viral RNA Mini Kit.

Uspešnost izolacije celokupne RNA iz vzorcev smo preverjali s pomnoževanjem odseka v ORF4.

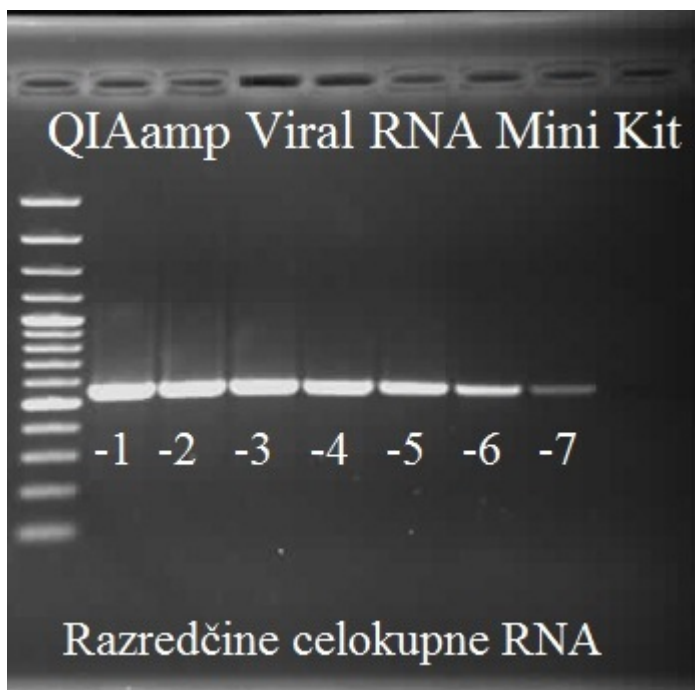
4.1.2.6.1 Metoda RT-PCR

Kot bolj učinkovit se je za izolacijo celokupne RNA izkazal komercialni komplet reagentov QIAamp® Viral RNA Mini Kit, ki nam je omogočil, da smo z metodo RT-PCR določili virusno RNA do razredčine 10^{-7} . Z reagentom TRIzol® pa smo uspešno izolirali in pomnožili virusno RNA do razredčine 10^{-6} .

Pri obeh metodah za izolacijo celokupne RNA so bili produkti RT-PCR iz razredčin od 10^{-1} do 10^{-5} na agaroznem gelu videti kot ostri pasovi, medtem ko je bila intenziteta sevanja UV-svetlobe produkta RT-PCR pri metodi izolacije s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit pri razredčini 10^{-7} nekoliko šibkejša, z reagentom TRIzol® iz razredčine 10^{-6} pa še komaj zaznavna (Slika 4-15 in Slika 4-16).



Slika 4-28: Produkti RT-PCR iz serije sedmih desetkratnih razredčin celokupne RNA (prikazane so log₁₀ vrednosti virusnih razredčin N61, od -1 do -7) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Celokupno RNA smo iz referenčnega izolata N61 izolirali z reagentom TRIzol®.



Slika 4-29: Produkti RT-PCR iz serije sedmih desetkratnih razredčin celokupne RNA (prikazane so $\log_{10}$ vrednosti razredčin N61, od -1 do -7) v 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Celokupno RNA smo iz referenčnega izolata N61 izolirali s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit.

4.1.2.6.2 RT-PCR v realnem času

Učinkovitost reakcije je bila v primeru izolacije RNA s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit na osnovi primerjav standardnih krivulj boljša od učinkovitosti reakcije v primeru izolacije z reagentom TRIzol®. Vrednost koeficienta linearne regresijske krivulje (R^2) je v primeru izolacije z reagentom TRIzol® pri naklonu standardne krivulje $-3,731$ znašal $0,981$, vrednost koeficienta linearne regresijske krivulje (R^2) pa je v primeru izolacije s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit pri naklonu standardne krivulje $-3,104$ znašal $0,998$.

Območje relativne kvantifikacije s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit je z mejo detekcije pri razredčini 10^{-7} obsegalo $7 \log_{10}$ območij (od -1 do -7). Vrednosti C_t serije razredčin celokupne RNA, ki smo jo izolirali s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit, so bile večje od vrednosti C_t desetkratnih razredčin celokupne RNA, ki smo jo izolirali z reagentom TRIzol®. Območje kvantifikacije pri reagentu TRIzol® obsega $6 \log_{10}$ območij (od -1 do -6). Razlika v vrednostih C_t v primerjavi z vrednostmi C_t iz serije razredčin celokupne RNA, izolirane s kompletom QIAamp® Viral RNA Mini Kit, je približno 3 cikle. Na osnovi rezultatov lahko zaključimo, da je metoda RT-PCR v realnem času v primerjavi s klasično

metodo RT-PCR bolj občutljiva. Z RT-PCR v realnem času smo v primerjavi obeh metod izolacije celokupne RNA določili virus IHN do razredčine 10^{-7} , kar je za 1 red velikosti več kot s klasično metodo RT-PCR.

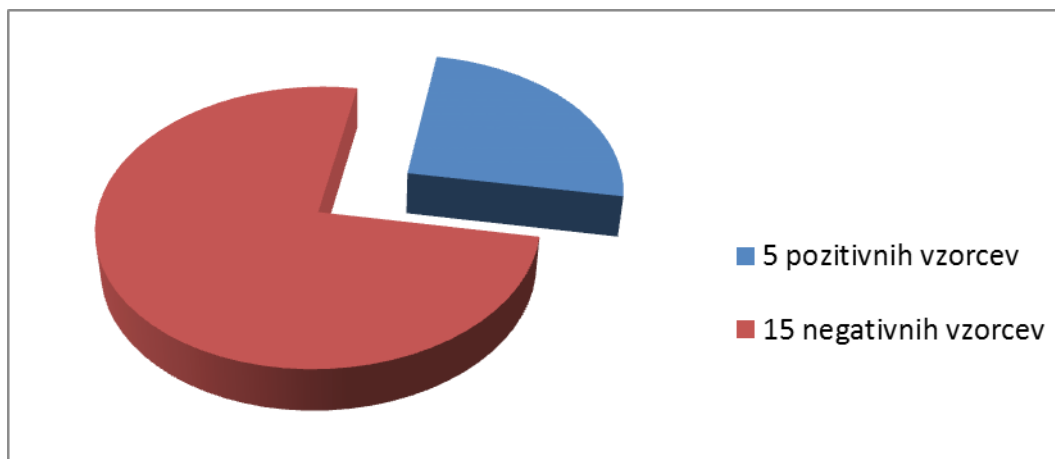
4.2 POSREDNE METODE

4.2.1 Serološke preiskave

Protitelesa v krvi rib smo dokazovali z virus nevtralizacijskim testom. Testirali smo 197 krvnih vzorcev šarenk. Vzorci so bili odvzeti v mesecu marcu, juniju in septembru. V poletnih mesecih, ko je povprečna temperatura vode v bazenih, v katerih živijo ribe, nad 18 °C, bolezen klinično ni več zaznavna (Slika 4-23, Slika 4-24).

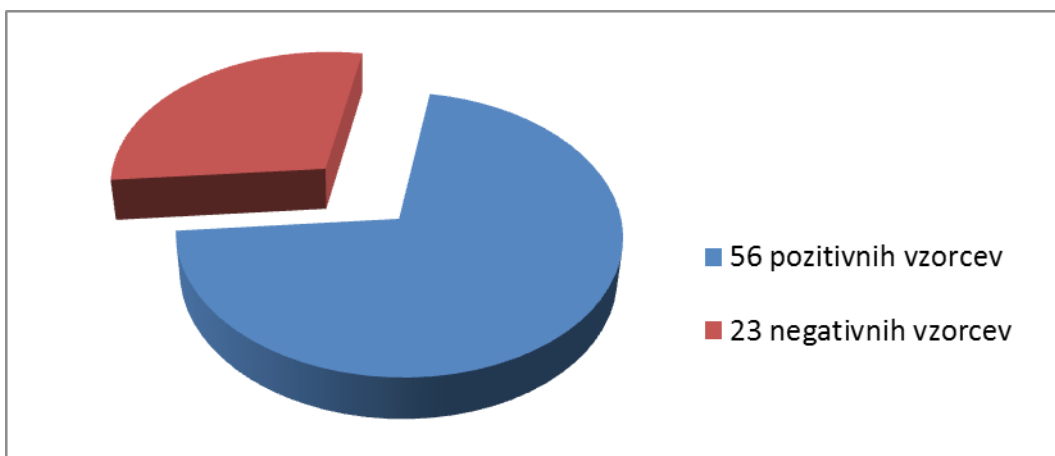
Vzorci smo odvzeli iz dveh ribogojnic (A in B) v obdobju 2 let, v katerih je bil v zimskih mesecih istega leta ali leto prej dokazan povzročitelj bolezni IHN. Kot pozitivne rezultate testa smo upoštevali serumske vzorce, katerih titri protiteles so bili ocenjeni $\geq 1 : 80$.

Najprej so meseca junija v ribogojnici A odvzeli vzorce krvi 20 šarenkam. V testu virusne nevtralizacije je 5 (25 %) vzorcev reagiralo negativno, pri ostalih (75 %) smo dokazali prisotnost protiteles (Slika 4-17).



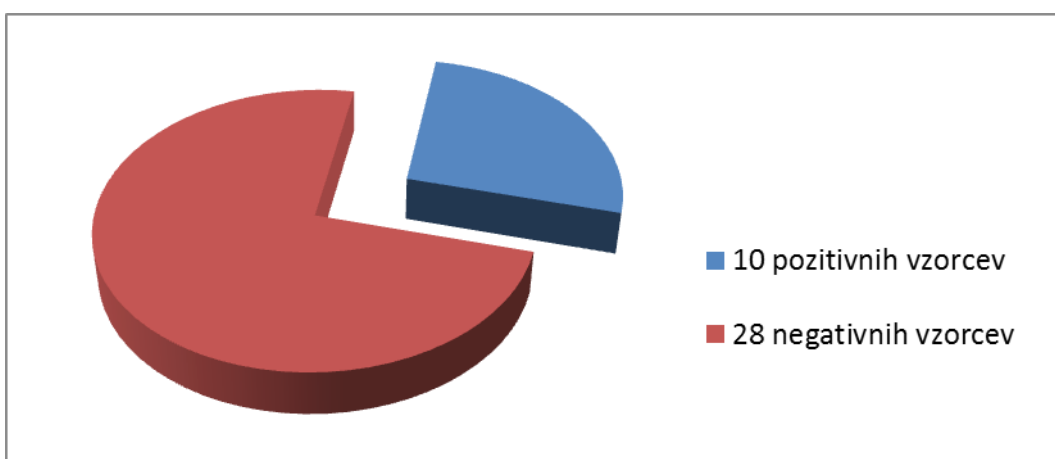
Slika 4-30: Grafični prikaz rezultatov prvega testiranja serumskih vzorcev z VNT.

Od testiranih 79 vzorcev pri drugem vzorčenju v ribogojnici A v mesecu juniju smo potrdili prisotnost nevtralizacijskih protiteles pri 56 (70,89 %) vzorcih, 23 (29,11 %) vzorcev je bilo negativnih (Slika 4-18). Vse ribe, ki jim je bila odvzeta kri za preiskave, so bile tudi označene z značko.



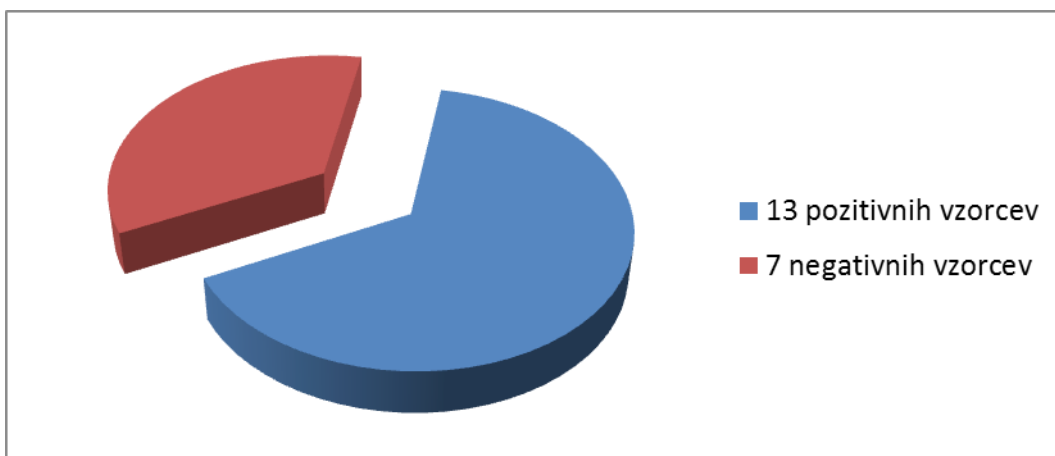
Slika 4-31: Grafični prikaz rezultatov drugega testiranja serumskih vzorcev z VNT.

Septembra je bilo vzorčenje v ribogojnici A opravljeno v dveh ponovitvah. S testom virusne nevtralizacije smo po prvem odvzemu 38 vzorcev nevtralizacijska protitelesa dokazali pri 10 (26,31 %) vzorcih, 28 (73,69 %) rib pa je imelo titer protiteles $\geq 1 : 80$ (Slika 4-19).



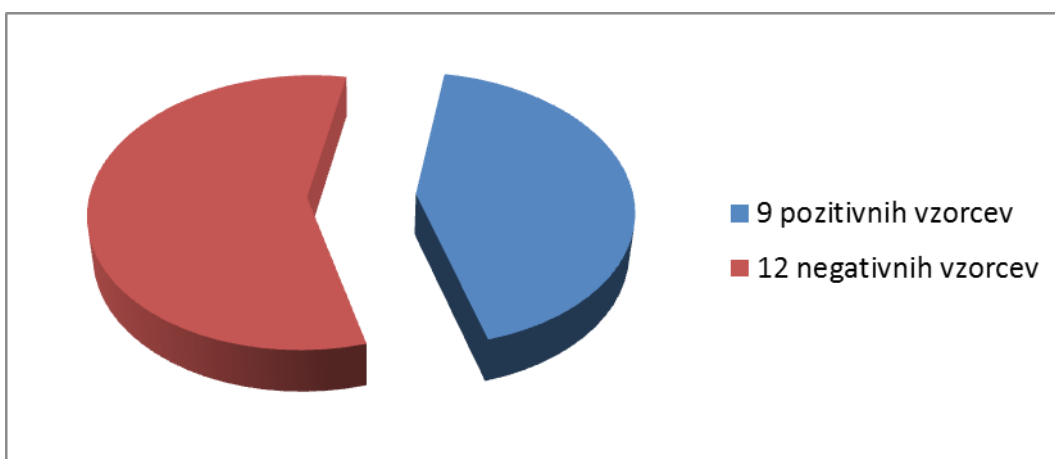
Slika 4-32: Grafični prikaz rezultatov tretjega testiranja serumskih vzorcev z VNT.

Pri drugem vzorčenju istega meseca smo od 20 odvzetih vzorcev v 13 (65 %) vzorcih dokazali nevtralizacijska protitelesa, v 7 (35 %) vzorcih pa protiteles nismo dokazali (Slika 4-20).



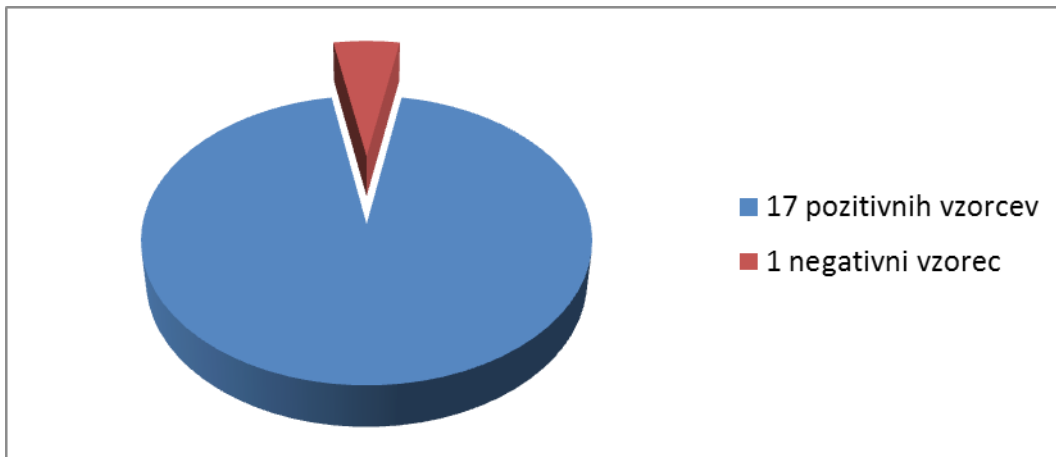
Slika 4-33: Grafični prikaz rezultatov četrtega testiranja serumskih vzorcev z VNT.

Leto kasneje smo meseca marca v ribogojnici A odvzeli krvne vzorce 21 šarenkam. Od tega smo v testu dokazali visoke titre nevtralizacijskih protiteles v 9 (42,86 %) vzorcih, v 12 (57,14 %) serumskih vzorcih pa protiteles nismo dokazali (Slika 4-21).

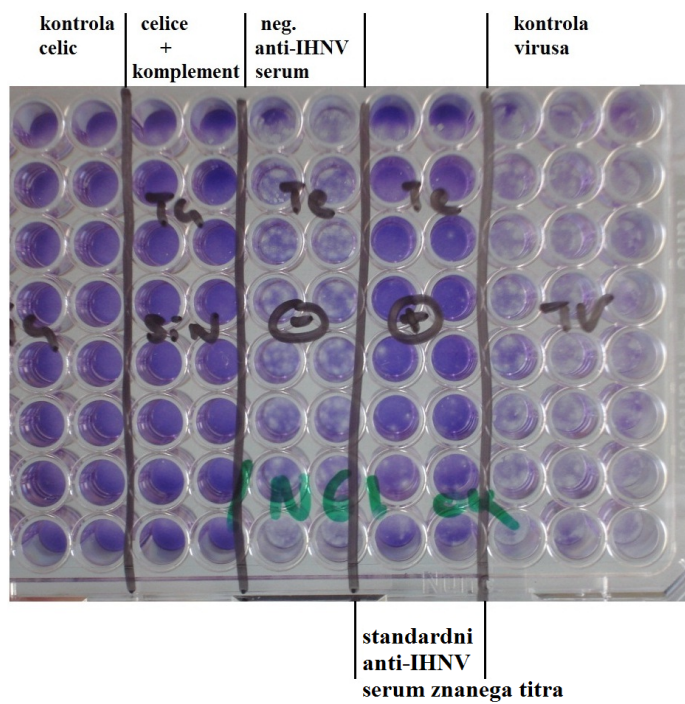


Slika 4-34: Grafični prikaz rezultatov petega testiranja serumskih vzorcev z VNT.

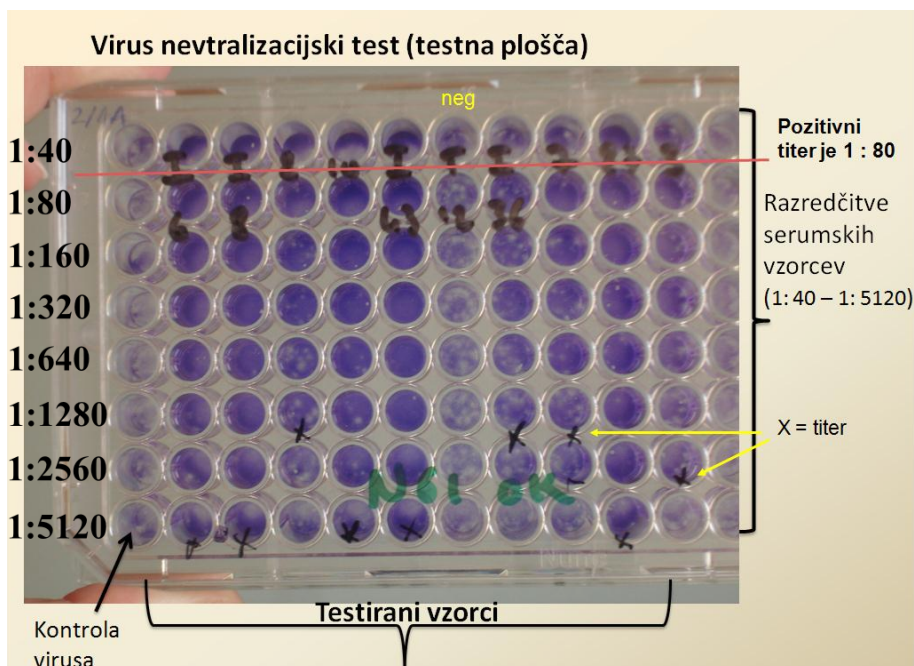
V zimskih mesecih istega leta smo v ribogojnici B, v kateri so v preteklosti že dokazali prisotnost virusa IHN, ob postavljenem sumu na bolezen IHN povzročitelja dokazali v organih rib. Meseca septembra istega leta smo odvzeli še krvne vzorce. Od testiranih 18 vzorcev protiteles nismo ugotovili samo pri 1 (5,55%) vzorcu, pri vseh ostalih (94,45 %) so bila protitelesa prisotna v visokem titru ($> 1 : 320$) (Slika 4-22).



Slika 4-35: Grafični prikaz rezultatov šestega testiranja serumskih vzorcev z VNT.



Slika 4-36: Kontrolna plošča pri VNT.



Slika 4-37: Testna plošča. Rezultati VNT.

4.3 BIOLOŠKI POSKUS

4.3.1 Rezultati testiranja občutljivosti šarenke in soške postrvi na okužbo z virusom IHN

Občutljivost šarenke in soške postrvi na okužbo z virusom IHN smo preverjali z biološkim poskusom. Biološki poskus smo izvedli v mesecu januarju in mesecu februarju. Trajal je 45 dni, šteto od dneva i/p inokulacije virusne suspenzije. V populaciji mladice 30 šarenk smo testirali tri skupine po 10 rib. V skupini A smo 10 ribam i/p inokulirali virusno suspenzijo N61 z virusno koncentracijo 10^5 TCID₅₀/ml, v skupini B smo 10 ribam i/p inokulirali virusno suspenzijo N61 z virusno koncentracijo 10^3 TCID₅₀/ml, populaciji 10 rib skupine C, ki nam je služila kot kontrolna skupina, pa smo i/p inokulirali 100 µl fiziološke raztopine.

V populaciji mladice 30 soških postrvi smo testirali tri skupine po 10 rib. V skupini A smo 10 ribam i/p inokulirali virusno suspenzijo N61 z virusno koncentracijo 10^5 TCID₅₀/ml, v skupini B smo 10 ribam i/p inokulirali virusno suspenzijo N61 z virusno koncentracijo 10^3 TCID₅₀/ml, populaciji 10 rib skupine C, ki nam je služila kot kontrolna skupina, smo i/p inokulirali 100 µl fiziološke raztopine.

Dnevno smo spremljali zdravstveno stanje rib in opazovali pojav kliničnih znakov ter smrtnost. Pred samo izvedbo poskusa smo na prisotnost virusov IHN, VHS in IPN testirali po

eno ribo iz populacije šarenk in soških postrvi. Pri testiranih ribah z molekularno metodo RT-PCR v vzorcih organov nismo dokazali nukleinskih kislin virusov IHN, VHS in IPN.

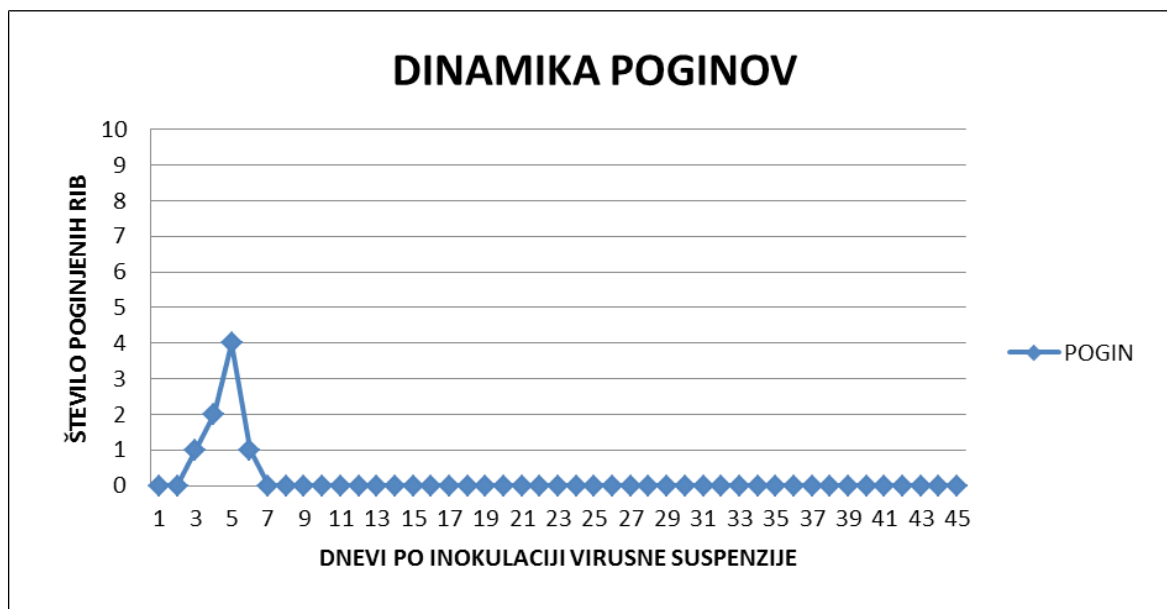
4.3.1.1 Rezultati testne skupine A pri vrsti »šarenka«

Prvi pogin smo opazili že tretji dan po inokulaciji virusa IHN, in sicer pri šarenki v skupini A. Šarenka je pred poginom plavala tik pod gladino vode, opazili smo tudi temnejše obarvanje kože. Ob sekciji na organih ni bilo vidnih sprememb. Odvzeli smo ledvice, možgane, vranico in jetra. Šarenka je merila 7 cm in tehtala 1,6 g. Vsi 4 vzorci, pripravljeni iz vsakega organa posebej, so v testu izolacije virusa na celični kulturi na celični liniji EPC povzročili CPE. Z molekularno metodo RT-PCR smo z začetnima oligonukleotidoma E1 in E3n v vseh 4 vzorcih dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa IHN (Slika 4-25).

8 šarenk iz testne skupine A je poginilo znotraj 7 dni po okužbi. Kot neznačilna in nespecifična pogina smo iz nadaljnjega raziskovalnega dela v biološkem poskusu izločili 2 pogina rib, ki sta se zgodila znotraj 48 ur po aplikaciji suspenzije virusa IHN.

Od pregledanih 32 vzorcev jih je na celični liniji EPC 26 povzročilo CPE (81,25 %), z RT-PCR pa smo virusno nukleinsko kislino dokazali pri vseh 32 vzorcih (100 %).

Velikost poginjenih rib je variirala med 7 in 10 cm.



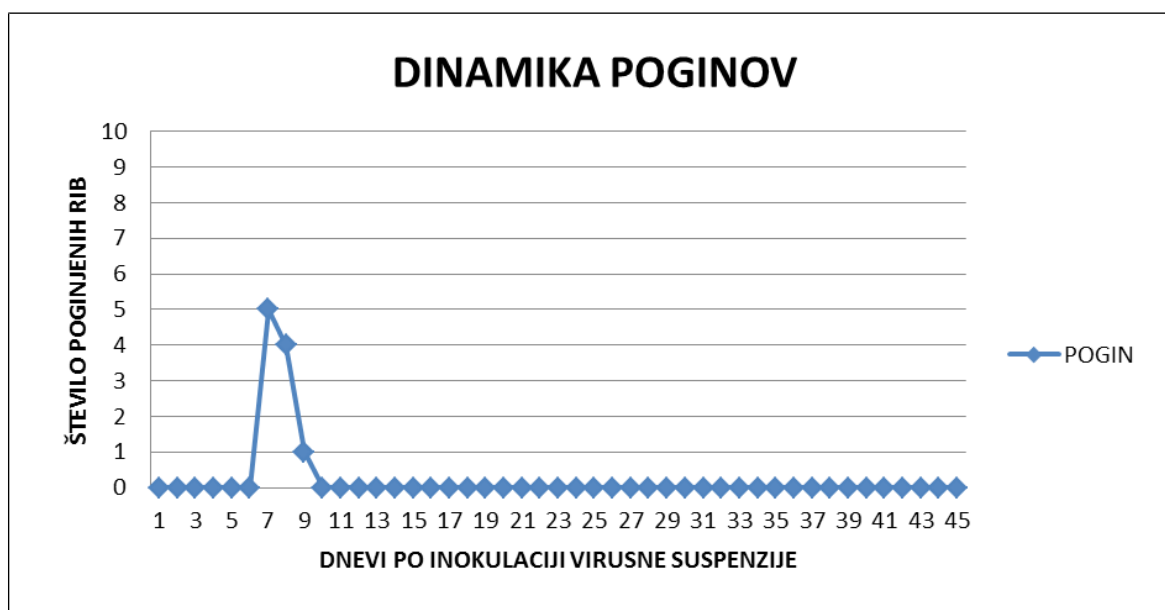
Slika 4-38: Dinamika poginov pri šarenki v testni skupini A.

4.3.1.2 Rezultati testne skupine B pri vrsti »šarenka«

10 šarenk iz testne skupine B je poginilo 10. dan po okužbi. Prvi in hkrati tudi najštevilnejši pogin rib je bil 7. dan po okužbi. Poginilo je namreč kar 5 rib, naslednji dan 4 ribe in čez dva dneva še zadnja šarenka iz testne skupine B (Slika 4-26). Velikost poginjenih rib je bila od 7 cm do 10 cm. Pri dveh ribah smo pred poginom opazili nenormalne akcije plavanja. Obe ribi sta plavali spiralno, se vrteli ob robu bazena. Ob sekciji smo pri dveh šarenkah opazili posamezne petehialne krvavitve v trebušni mišičnini, pri eni šarenki so bila jetra izrazito rumenkaste barve, blede.

CPE smo na celični liniji EPC opazili pri 31 vzorcih (77,5 %), z metodo RT-PCR pa smo nukleinsko kislino virusa IHN dokazali pri vseh 40 vzorcih (100 %).

Velikost poginjenih rib je variirala med 7 in 10 cm.

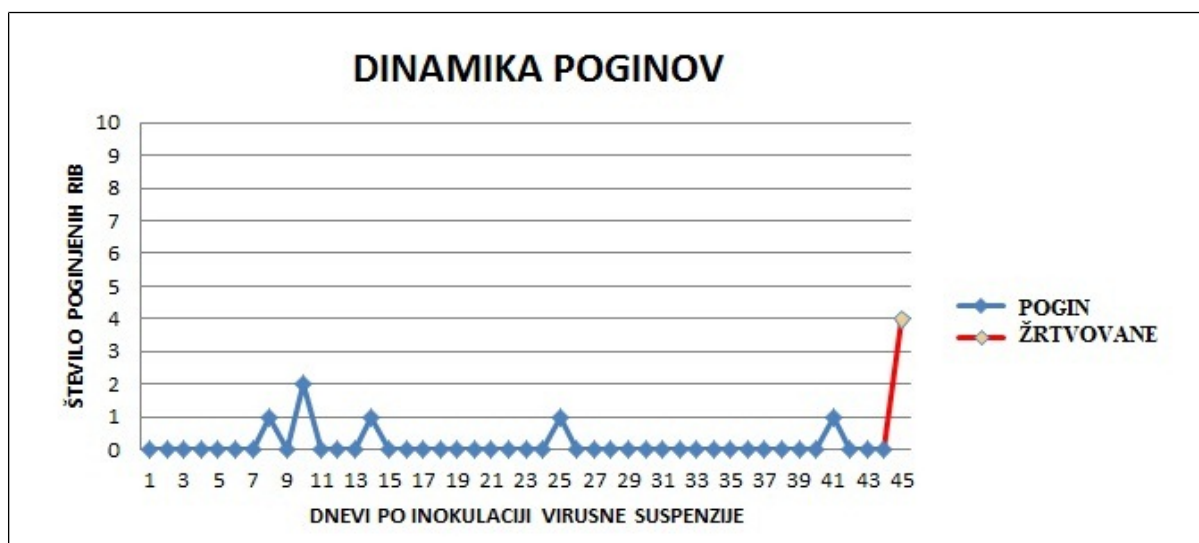


Slika 4-39: Dinamika poginov pri šarenki v testni skupini B.

4.3.1.3 Rezultati testne skupine A pri vrsti »soška postrv«

Prvi pogin (1 soška postrv) v populaciji soških postrvi testne skupine A je bil 8. dan po inokulaciji virusne suspenzije. Ob sekciji smo ugotovili petehialne krvavitve na področju trebuha, škrge pa so bile blede in razprte. V tej testni skupini je poginilo 6 soških postrvi, 4 pa smo ob koncu biološkega poskusa žrtvovali, jim odvzeli organe in s testoma izolacije virusa na celični kulturi in molekularno metodo RT-PCR dokazovali prisotnost virusa oziroma

virusne nukleinske kisline (Slika 4-27). 2 vzorca sta v testu izolacije virusa na celični kulturi povzročila CPE, 38 inokuliranih vzorcev na celično linijo EPC pa ni povzročalo sprememb. Vseh 40 vzorcev smo tudi testirali na prisotnost virusne nukleinske kisline. Z metodo RT-PCR smo virusno nukleinsko kislino dokazali pri 31 vzorcih (77,5 %). Velikost poginjenih in žrtvovanih rib je variirala med 9,5 in 11 cm.

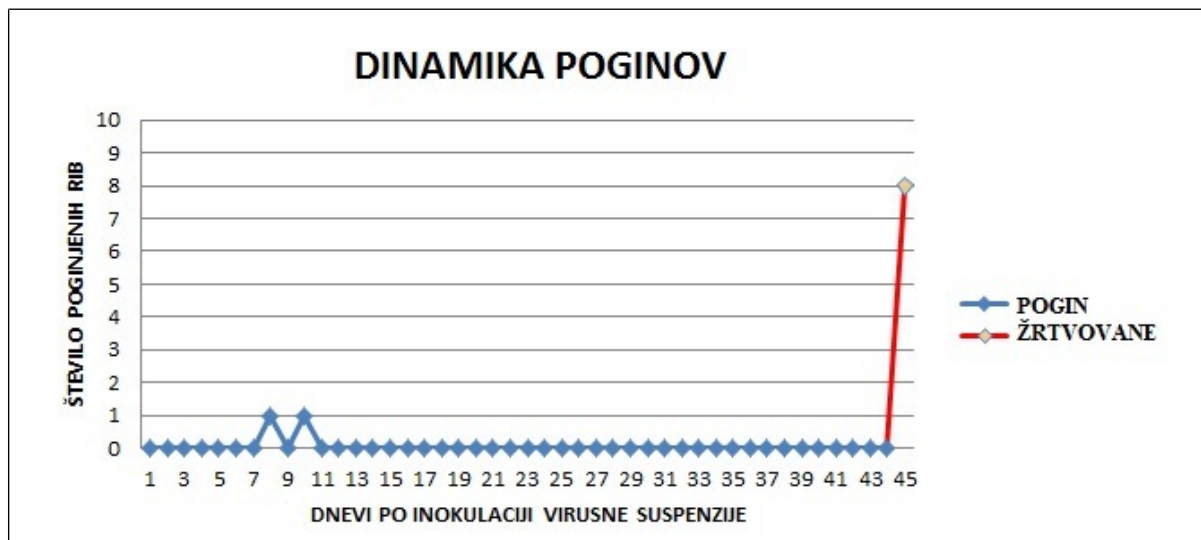


Slika 4-40: Dinamika poginov pri soški postrvi v testni skupini A.

4.3.1.4 Rezultati testne skupine B pri vrsti »soška postrv«

V testni skupini B soških postrvi smo prvi pogin (1 soška postrv) opazili 8. dan po inokulaciji virusne suspenzije, drugi in hkrati zadnji pogin (1 soška postrv) pa čez dva dneva, torej 10 dni po inokulaciji virusne suspenzije. 45. dan biološkega poskusa smo preostalih 8 soški postrvi iz testne skupine B žrtvovali, njihove organe pa testirali na občutljivi celični liniji in preiskali na prisotnost virusne nukleinske kisline z molekularno metodo RT-PCR (Slika 4-28). Vsi testirani organi na celični liniji EPC niso povzročili CPE. Rezultat izolacije virusa IHN na celični kulturi je bil torej za 40 vzorcev negativen, z metodo RT-PCR smo virusno nukleinsko kislino dokazali pri 10 vzorcih (25 %).

Velikost poginjenih in žrtvovanih rib je variirala med 9 in 11 cm.



Slika 4-41: Dinamika poginov pri soški postrvi v testni skupini B.

4.3.1.5 Tabelarni prikaz rezultatov za obe testni skupini šarenk in soških postrvi

Rezultati za obe testni skupini šarenk in soških postrvi so podani v tabeli 4-7 in 4-8.

Šarenka (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Število rib	Izolacija virusa IHN na celični kulturi EPC (IVCK) (ledvice, jetra, vranica, možgani)			RT-PCR (ledvice, jetra, vranica, možgani)		
		število testiranih organov	število pozitivnih organov	%	število testiranih organov	število pozitivnih organov	%
Skupina A	8*	32	26	81,25 %	32	32	100 %
Skupina B	10	40	31	77,5 %	40	40	100 %
Skupina C	10	40	0	0 %	40	0	0 %

* 2 šarenki sta poginili znotraj 48 ur po aplikaciji virusne suspenzije in sta bili izločeni iz biološkega poskusa.

Tabela 4-9: Rezultati testiranih vzorcev šarenke z metodo izolacije virusa na celični kulturi EPC in molekularno metodo RT-PCR.

Soška postrv (<i>Salmo</i>)	Število rib	Izolacija virusa IHN na celični kulturi EPC (IVCK) (ledvice, jetra, vranica, možgani)			RT-PCR (ledvice, jetra, vranica, možgani)		
		število testiranih organov	število pozitivnih organov	%	število testiranih organov	število pozitivnih organov	%

<i>marmoratus</i>)		število testiranih organov	število pozitivnih organov	%	število testiranih organov	število pozitivnih organov	%
Skupina A	10	40	2	5 %	40	31	77,5 %
Skupina B	10	40	0	0 %	40	10	25 %
Skupina C	10	40	0	0 %	40	0	0 %

Tabela 4-10: Rezultati testiranih vzorcev soške postrvi z metodo izolacije virusa na celični kulturi EPC in molekularno metodo RT-PCR.

Rezultate biološkega poskusa smo statistično ovrednotili s Pearsonovim hi-kvadrat testom (χ^2 test).

4.3.2 Imunohistokemično dokazovanje virusnega antigena virusa IHN v tkivnih rezinah

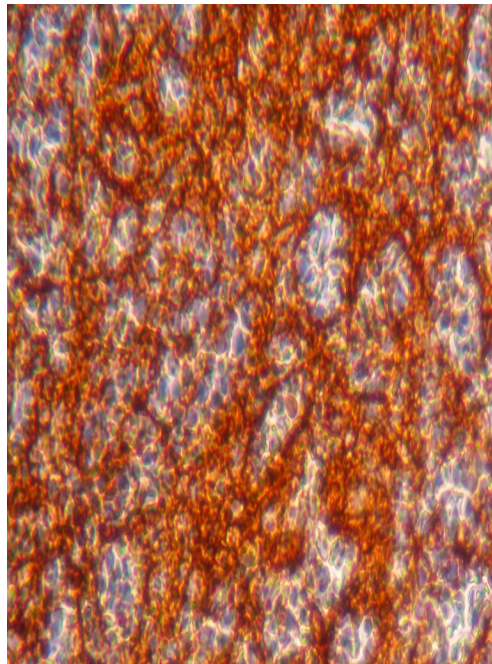
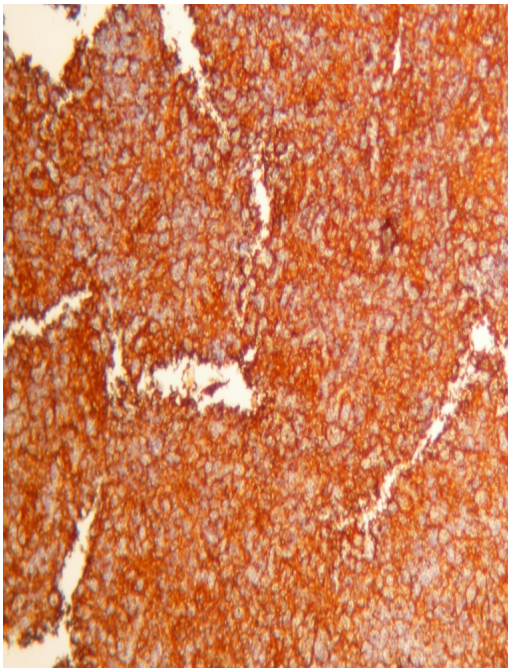
Pregledali smo vzorce organov 7 šarenk in 4 soških postrvi. Pred samo izvedbo imunohistokemičnega označevanja virusnih antigenov v tkivu okuženih rib smo iz obeh populacij rib žrtvovali po eno šarenko in eno soško postrv. V tkivnih rezinah odvzetih organov z monoklonskimi protitelesi nismo dokazali virusnih antigenov IHN.

Pri šarenki smo vzorce odvzeli 5. (2 ribi), 6., 7., in 8. (2 ribi) dan po inokulaciji virusne suspenzije, pri soški postrvi pa smo vzorce odvzeli 7., 14. in 21. dan po inokulaciji suspenzije virusa IHN. Pri obeh skupinah testiranih populacij šarenk in soških postrvi smo imunohistokemično obdelali anteriorni in posteriorni del ledvic, možgane, vranico, jetra in srce.

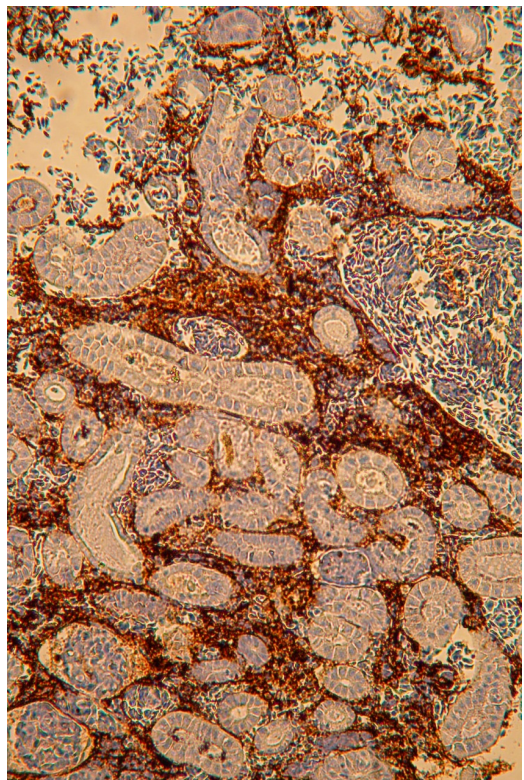
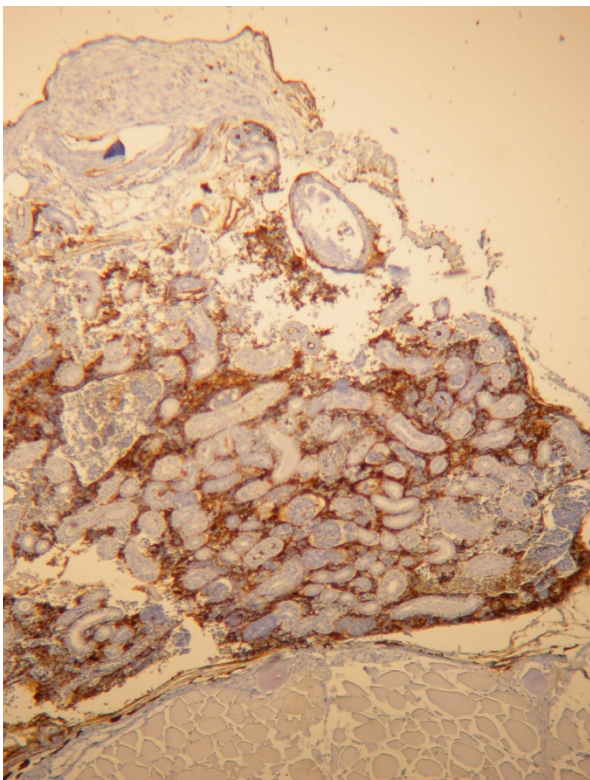
Imunohistokemična preiskava anteriornega in posteriornega dela ledvic, vranice, možganov in srca je bila pri šarenkah skupine A, ki so poginile 5., 6., 7. in 8. dan po i/p inokulaciji suspenzije, pozitivna na virus IHN.

Pri poginjenih šarenkah smo v vseh organih ugotovili močno pozitivno imunohistokemično reakcijo na virus IHN. Pozitivno imunohistokemično reakcijo v obliki številnih drobnih rjavih zrnč smo ugotovili v citoplazmi okuženih celic v ledvicah, vranici in srcu ter fokalno v možganih (Slika 4-29, Slika 4-30, Slika 4-31).

Pri soških postrveh po i/p inokulaciji virusne suspenzije nismo opazili poginov. Ribe smo žrtvovali 6., 8., in 20. dan po eksperimentalni okužbi. V vseh vzorcih organov (ledvice, vranica, srce in možgani), je bil rezultat imunohistokemične preiskave negativen na virusni antigen IHN (Slika 4-32, Slika 4-33, Slika 4-34).

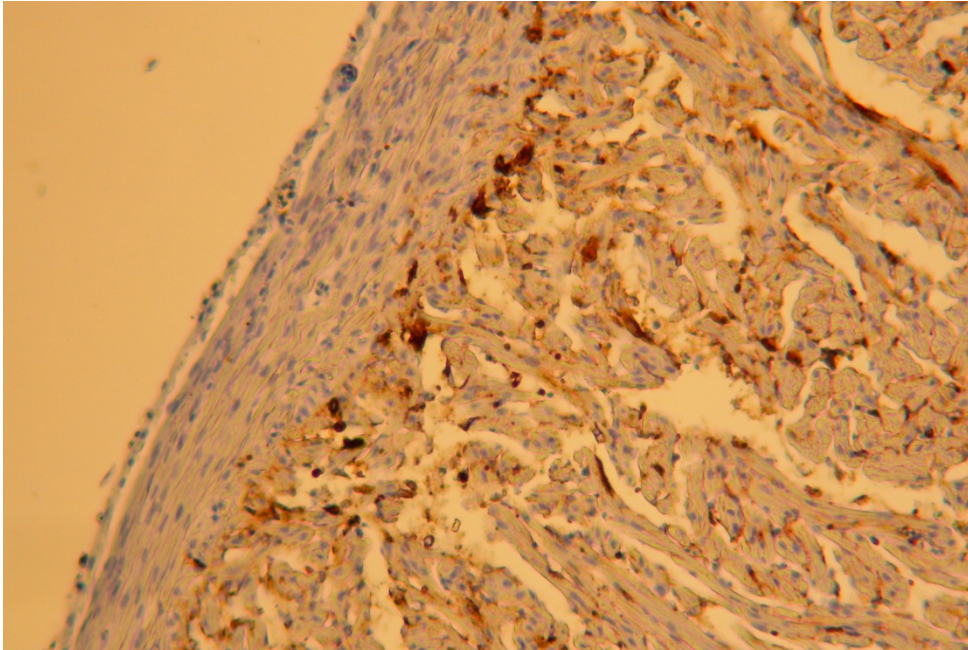


Slika 4-42: Vranica, šarenka. Difuzna in močna pozitivna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN v vranici. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (slika levo: 100-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).

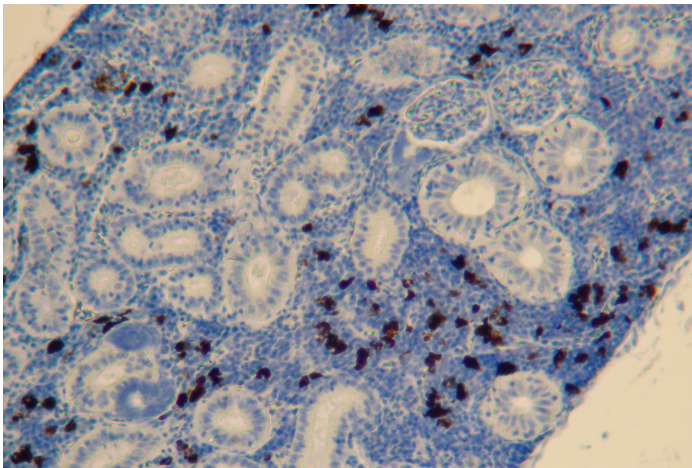


Slika 4-43: Ledvica, šarenka. Močna pozitivna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN v intersticiju sredice ledvic. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim

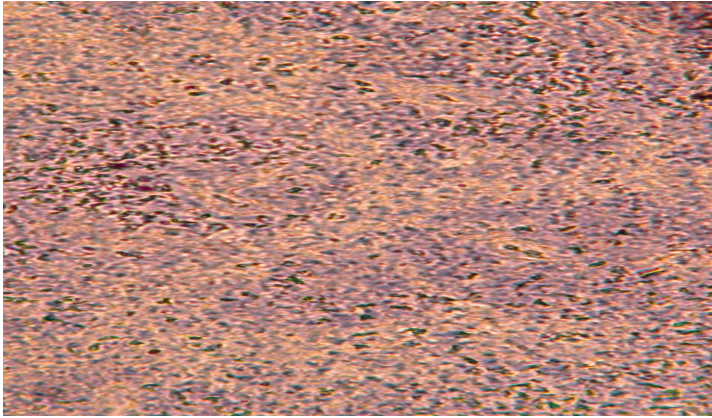
beljakovinam nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (slika levo: 100-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).



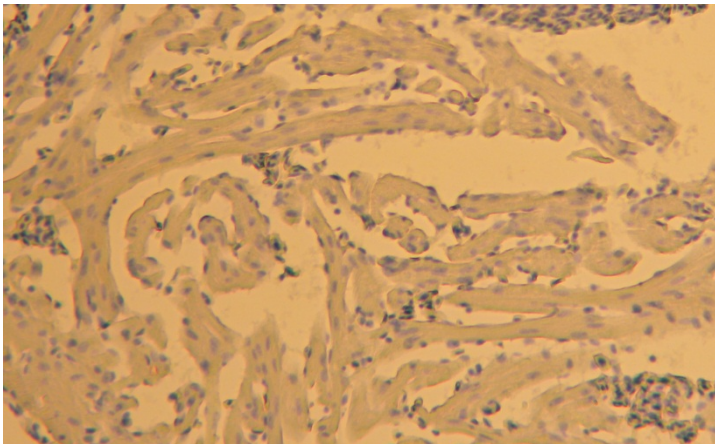
Slika 4-44: Srce, šarenka. Pozitivna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN v miokardu. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (200-kratna povečava).



Slika 4-45: Ledvice, soška postrv. Negativna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (200-kratna povečava).

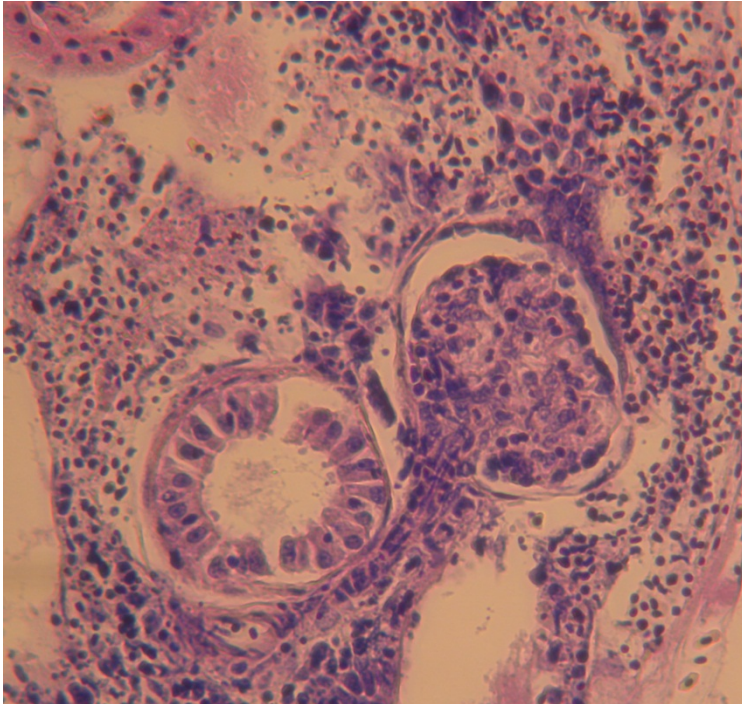


Slika 4-46: Vranica, soška postrv. Negativna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (100-kratna povečava).



Slika 4-47: Srce, soška postrv. Negativna imunohistokemična reakcija na virusni antigen N virusa IHN. Imunohistokemično barvanje z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnim beljakovinom nukleokapside BIO 285 (BioX Diagnostics, Belgija), kontrastirano s hematoksilinom (200-kratna povečava).

Pri raztelesbi 2 šarenk iz testne skupine A smo opazili samo posamezne krvavitve v mišičnini. Pri patohistološki preiskavi ledvic, možganov in srca smo ugotovili spremembe, značilne za okužbo z virusom IHN (Slika 4-35). V ledvicah, vranici in srcu smo ugotovili obsežne infiltrate limfocitov. Žile so bile napolnjene z monociti. Pri nekaterih šarenkah iz testne skupine B smo v ledvicah opazili piknotične spremembe celic tubulov, ki so znak začetnega stadija nekroze tkiva.



Slika 4-48: Ledvice šarenke. Ledvice šarenke. Značilne vnetne spremembe v intersticiju skorje ledvic. HE, 200-kratna povečava.

4.3.3 Statistična obdelava rezultatov biološkega poskusa

Za ugotavljanje povezanosti med dvema spremenljivkama, vrsto rib in dovzetnostjo rib za okužbo z virusom, smo uporabili hi-kvadrat test, za smer in moč povezanosti pa Pearsonov koeficient korelacije. Za statistično značilne vrednosti smo uporabili $p < 0,05$.

4.3.3.1 Statistična obdelava rezultatov biološkega poskusa – dokazovanje virusa z metodo IVCK

			Dokazovanje virusa (metoda IVCK)		Skupaj	
			Virus prisoten	Virus ni prisoten		
Vrsta rib	šarenka	število vzorcev	57	55	112	
		število vzorcev, izraženih v %	50,9%	49,1%	100,0%	
		% virusa pri šarenkah glede na celotno populacijo rib v biološkem poskusu	96,6%	31,8%	48,3%	
	soška postrv	število vzorcev	2	118	120	
		število vzorcev, izraženih v %	1,7%	98,3%	100,0%	
		% virusa pri soški postrvi glede na celotno populacijo rib v biološkem poskusu	3,4%	68,2%	51,7%	
		Skupaj		število vzorcev	59	173
			število vzorcev, izraženih v %	25,4%	74,6%	100,0%

Tabela 4-11: Testiranje občutljivosti šarenke in soške postrvi pri metodi izolacije virusa na celični kulturi (IVCK).

Z metodo izolacije virusa na celični kulturi in potrditvenim testom IP smo virus IHN dokazali pri 96,6 % testirane populacije šarenk, in pri 3,4 % populacije soških postrvi. Znotraj posamezne vrste smo virus dokazali pri šarenkah v 50,9 %, pri soški postrvi pa pri 1,7 % (Tabela 4-9).

4.3.3.1.1 Rezultati hi-kvadrat testa

	Vrednost	Statistična značilnost
Pearsonov hi-kvadrat test	74,026 ^a	0,000
Continuity Correction ^b	71,452 ^b	0,000
Število veljavnih vzorcev	232	

a. ocena velja v primeru minimalnega števila frekvenc = 5

b. ocena velja le za tabele 2 x 2

Tabela 4-12: Rezultati hi-kvadrat testa (ocena statistične povezanosti).

Ker smo v statistični analizi uporabili tabelo 2 x 2, ki nam pomaga pojasniti smer in velikost razlik, je treba rezultate hi-kvadrat testa interpretirati po »Continuity correction« (Yatesova korekcija Pearsonove formule). Sliko o statistični značilnosti testa hi-kvadrat bi nam lahko kvarilo nezadostno število pozitivnih frekvenc pri kategoriji »soška postrv«. Predpogoj za oceno statistične značilnosti je v tem primeru zahtevano minimalno število frekvenc = 5, pri soški postrvi pa je to število 2. Zato smo uporabili Yatesovo korekcijo Pearsonove formule, ki je statistično značilno razliko Pearsonovega hi-kvadrat testa ($p = 0,000$) tudi potrdil.

Rezultati hi-kvadrat testa so nam pokazali, da obstaja statistično značilna povezanost med vrsto rib in občutljivostjo rib za okužbo z virusom IHN ($\chi^2 = 71,452^{***}$ ali $p = 0,000$) (Tabela 4-10). Pri šarenkah je torej virus prisoten v večjem številu vzorcev kot pri soški postrvi, zato veljajo šarenke za bolj dovzetno vrsto za okužbo z virusom IHN v primerjavi s soško postrvjo pri metodi izolacije virusa na celični kulturi.

4.3.3.2 Statistična obdelava rezultatov biološkega poskusa – dokazovanje virusa z metodo RT-PCR

			Dokazovanje virusa (metoda RT-PCR)		Skupaj
			Virus prisoten	Virus ni prisoten	
Vrsta rib	šarenka	število vzorcev	72	40	112
		število vzorcev, izraženih v %	64,3%	35,7%	100,0%
		% virusa pri šarenki glede na celotno populacijo rib v biološkem poskusu	63,7%	33,6%	48,3%
	soška postrv	število vzorcev	41	79	120
		število vzorcev, izraženih v %	34,2%	65,8%	100,0%
		% virusa pri soški postrvi glede na celotno populacijo rib v biološkem poskusu	36,3%	66,4%	51,7%
Skupaj	število vzorcev		113	119	232
	število vzorcev, izraženih v %		48,7%	51,3%	100,0%

Tabela 4-13: Testiranje občutljivosti šarenke in soške postrvi pri metodi izolacije virusa z molekularno metodo RT-PCR.

S klasično molekularno metodo RT-PCR smo virus dokazali v testirani populaciji šarenk v 63,7 % in v 36,3 % pri soški postrvi. Znotraj vrste je bilo okuženih 64,3 % šarenk, neokuženih pa 35,7 % (n = 112). V populaciji soških postrvi smo nukleinsko kislino virusa IHN dokazali v 34,2 %, pri 65,8 % populacije pa prisotnosti virusa nismo dokazali (n = 120) (Tabela 4-11).

4.3.3.2.1 Rezultati hi-kvadrat testa

	Vrednost	Statistična značilnost
Pearsonov hi-kvadrat test	21,035 ^a	0,000
Continuity Correction ^b	19,847 ^b	0,000
Število veljavnih vzorcev	232	

a. ocena velja v primeru minimalnega števila frekvenc = 5

b. ocena velja le za tabele 2 x 2

Tabela 4-14: Rezultati hi-kvadrat testa (ocena statistične povezanosti).

Rezultati hi-kvadrat testa so nam pokazali, da obstaja statistično značilna povezanost med vrsto rib in občutljivostjo rib na okužbo z virusom IHN ($\chi^2 = 19,847^{***}$ ali $p = 0,000$) pri dokazovanju virusa s klasično molekularno metodo RT-PCR (Tabela 4-12). Pri šarenkah je torej virus IHN prisoten v večjem številu vzorcev kot pri soški postrvi, zato veljajo šarenke za bolj dovzetno vrsto za okužbo z virusom IHN v primerjavi s soško postrvjo.

4.3.3.3 Analiza korelacij (Pearsonov koeficient) med spremenljivkami

		vrsta rib	Dokazovanje virusa (metoda IVCK)
Populaciji rib (šarenka + soška postrv)	Pearsonov koeficient	1	0,565 ^{**}
	število vzorcev	232	232

**** Korelacija je značilna za vrednosti nad 0.01.**

Tabela 4-15: Korelacija med populacijo šarenk in soških postrvi pri metodi izolacije virusa na celični kulturi (IVCK).

Pearsonov koeficient korelacije med spremenljivkama »vrsta rib« (šarenke in soške postrvi) in »prisotnost virusa IHN« (dokaz virusa z metodo IVCK) kaže, da korelacija obstaja ($r_p = 0,565^{**}$), in sicer je glede na izračunano vrednost stopnja korelacije pozitivna in zmerna (Tabela 4-13).

	virus-metoda RT-PCR
Populaciji rib (šarenka + soška postrv)	Pearsonov koeficient 0,301 ^{**}
	število vzorcev 232

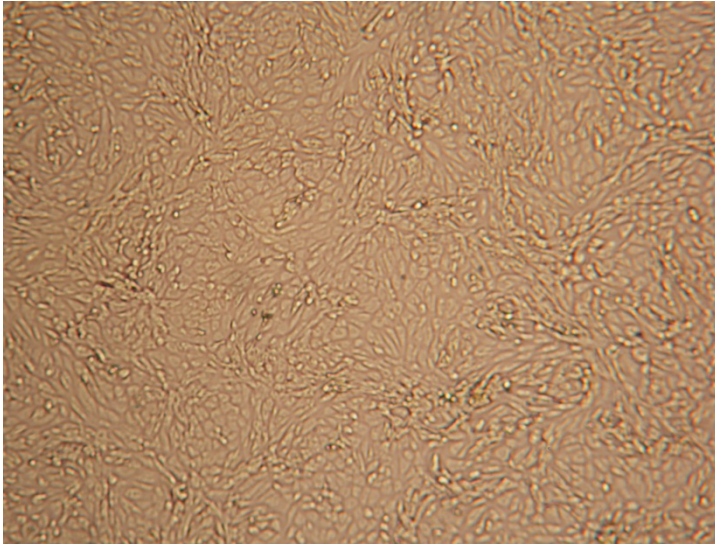
**** Korelacija je značilna za vrednosti nad 0.01.**

Tabela 4-16: Korelacija med populacijo šarenk in soških postrvi pri metodi dokaza virusa IHN z metodo RT-PCR.

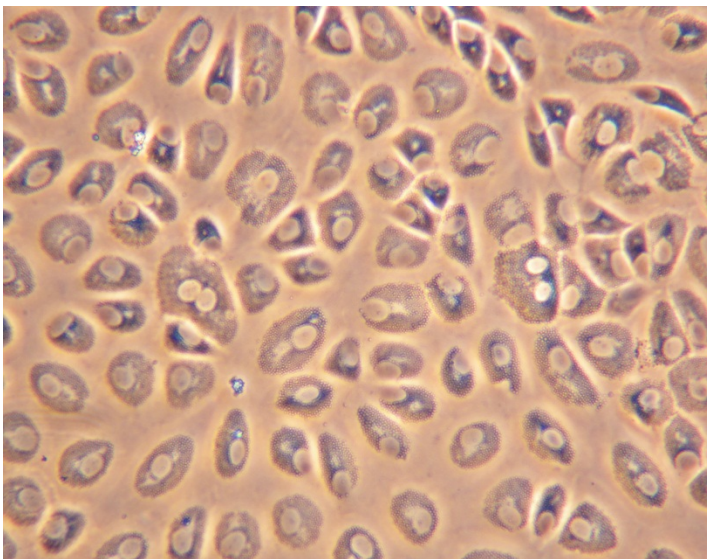
Pearsonov koeficient korelacije med spremenljivkama »vrsta rib« (šarenke in soške postrvi) in »prisotnost virusa IHN« (dokaz virusa IHN z metodo RT-PCR) kaže, da korelacija obstaja ($r_p = 0,301^{**}$), in sicer je glede na izračunano vrednost stopnja korelacije pozitivna in zmerna (Tabela 4-14).

4.4 PRIMARNA CELIČNA KULTURA

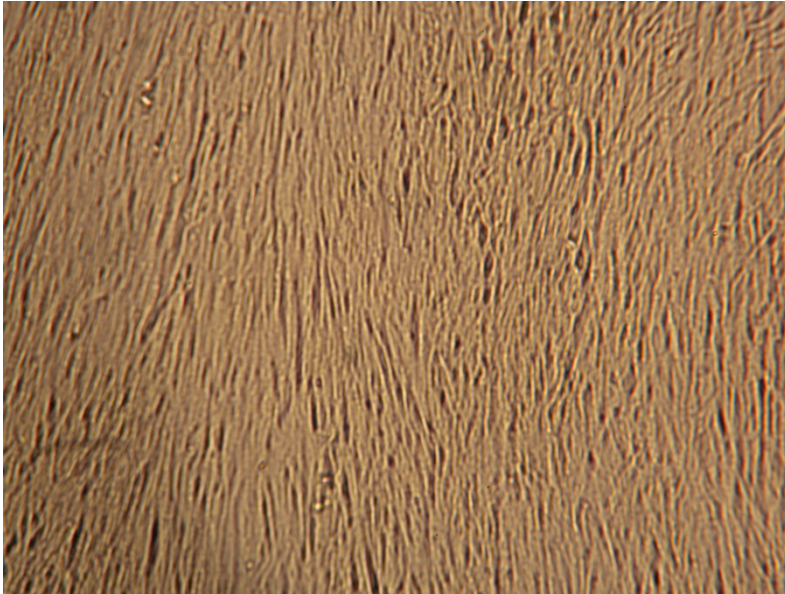
Vzgojili smo primarno celično kulturo srčnega tkiva šarenke in soške postrvi in primarno kulturo vranice pri šarenki (Slika 4-36, Slika 4-37, Slika 4-40).



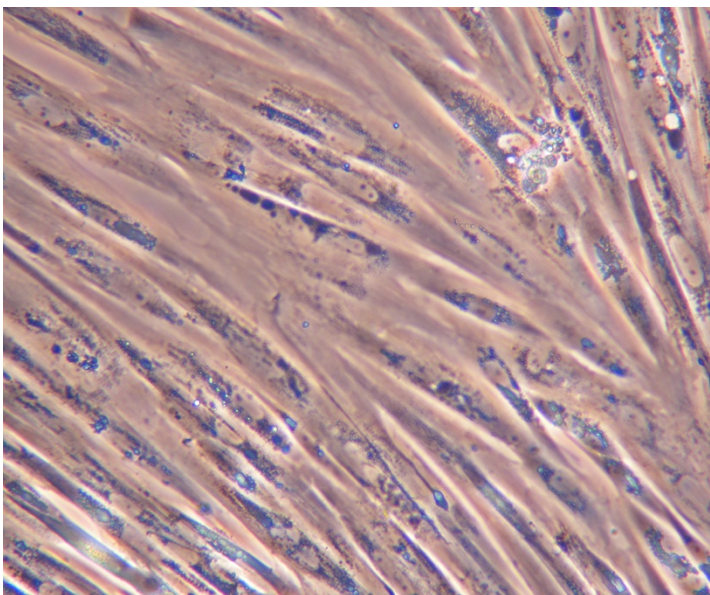
Slika 4-49: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke (100-kratna povečava).



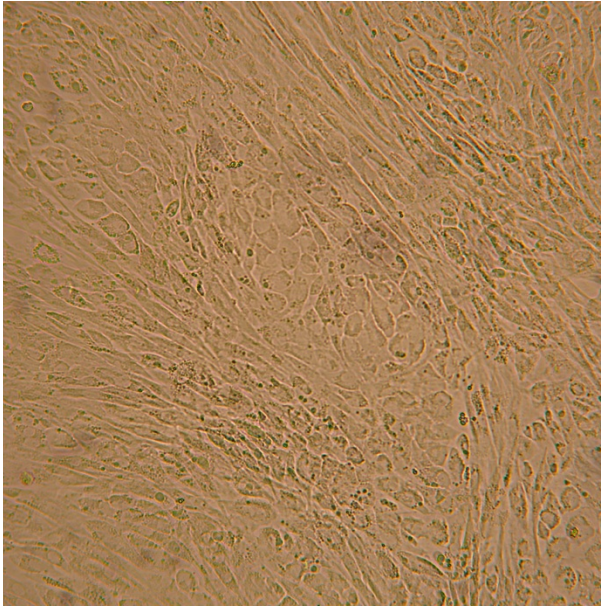
Slika 4-50: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke (200-kratna povečava).



Slika 4-51: Primarna kultura vranice, šarenka (100-kratna povečava).



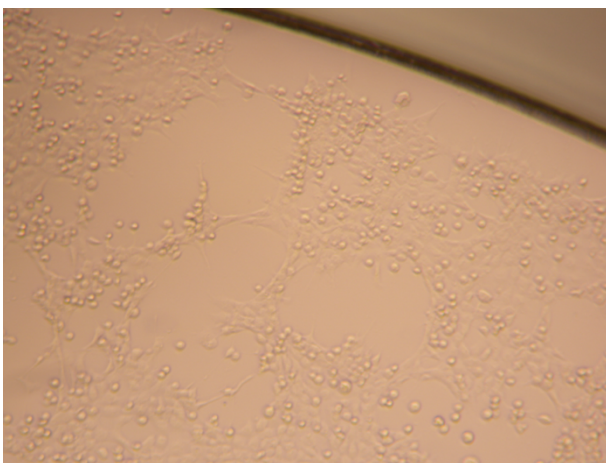
Slika 4-52: Primarna kultura vranice, šarenka (200-kratna povečava).



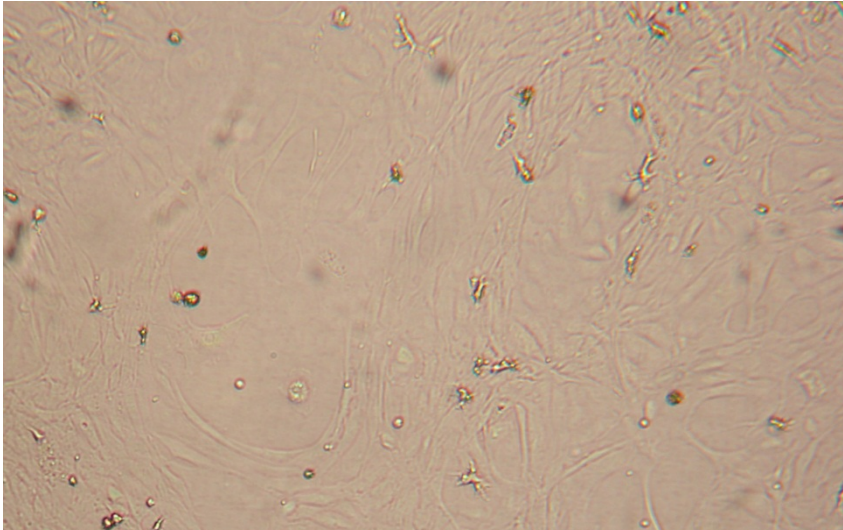
Slika 4-53: Primarna kultura kardiomiocitov, soška postrv (200-kratna povečava).

4.4.1 Testiranje občutljivosti primarne kulture kardiomiocitov na okužbo z virusom IHN z metodo izolacije virusa na celični kulturi

Primarno celično kulturo kardiomiocitov šarenke in soške postrvi smo testirali na občutljivost na okužbo z virusom IHN. Pripravili smo 10-kratne razredčitve referenčnega virusa IHN, N61, katerega titer je bil 10^6 TCID₅₀/ml. Citopatski efekt se je na primarni celični kulturi srčnega tkiva šarenke pojavil četrty dan po inokulaciji 10-kratnih razredčin virusa IHN, in sicer v razredčini virusa 10^{-1} (Slika 4-41, Slika 4-42).

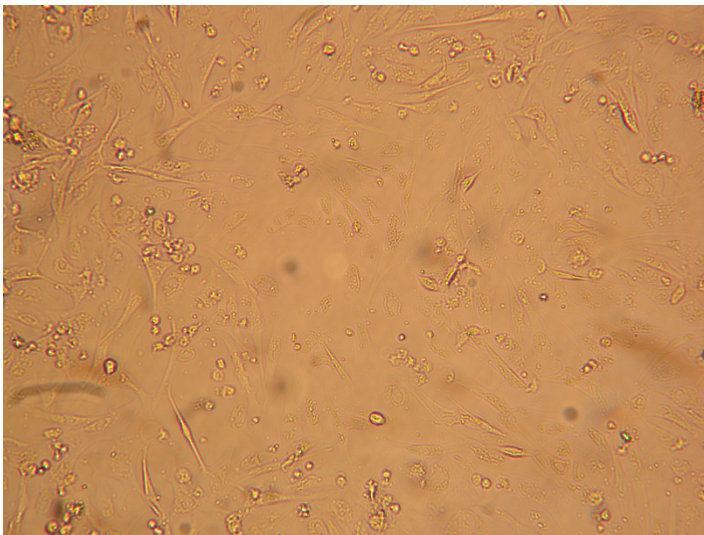


Slika 4-54: CPE na primarni kulturi kardiomiocitov šarenke (200-kratna povečava). Citopatski efekt se je po šestih dnevih pojavil do virusne razredčine 10^{-3} .

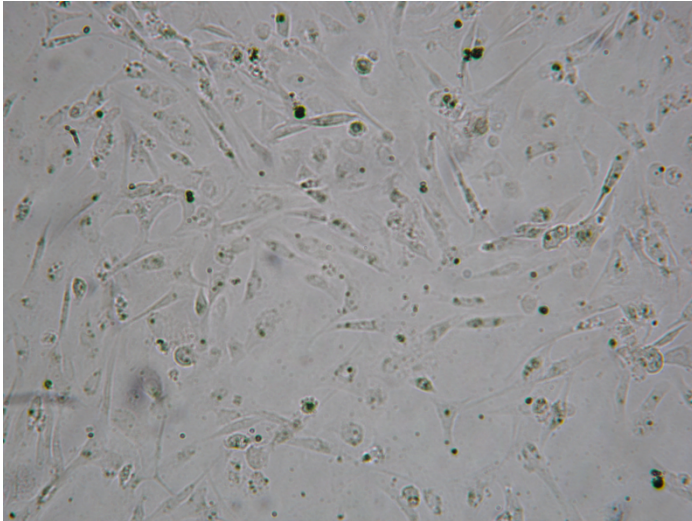


Slika 4-55: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke. Test IP, negativna reakcija (200-kratna povečava).

Prav tako smo testirali primarno kulturo srčnega tkiva soške postrvi. Pripravili smo 10-kratne razredčine virusa IHN z izračunanim titrom 10^6 TCID₅₀/ml in jih inokulirali na jamice mikrotitrne plošče, v kateri smo namnožili 48 ur staro celično kulturo srčnega tkiva soške postrvi. Dnevno smo pregledovali celični sloj na pojav CPE. Po šestih dnevih smo odčitali rezultate. CPE je bil prisoten zgolj v treh jamicah pri virusni razredčitvi 10^{-1} (Slika 4-43, Slika 4-44).



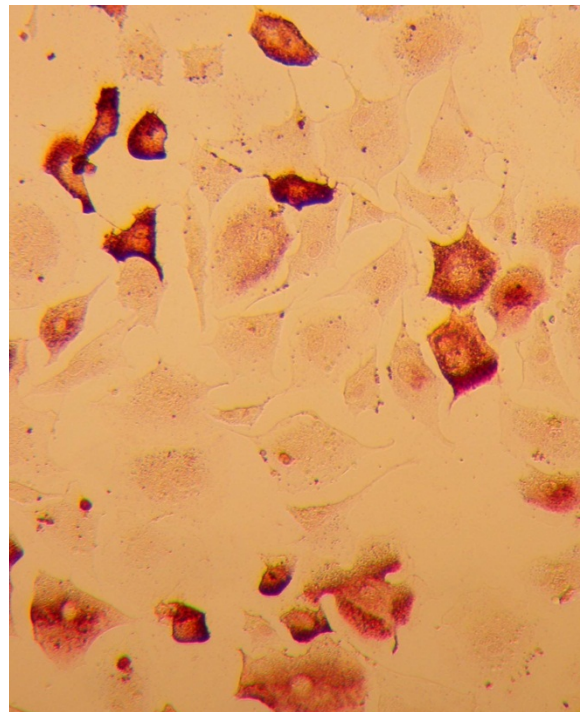
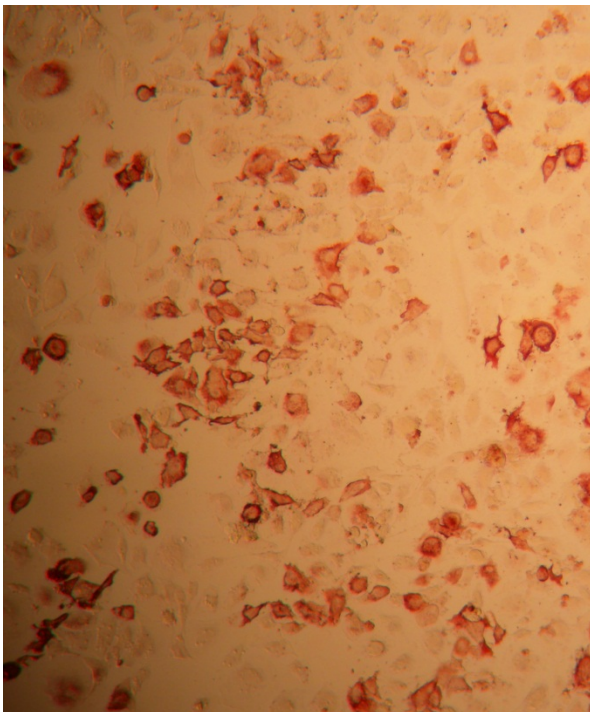
Slika 4-56: CPE na primarni kulturi kardiomiocitov šarenke (200-kratna povečava). Prisotnost virusa smo potrdili še z imunoperoksidaznim testom.



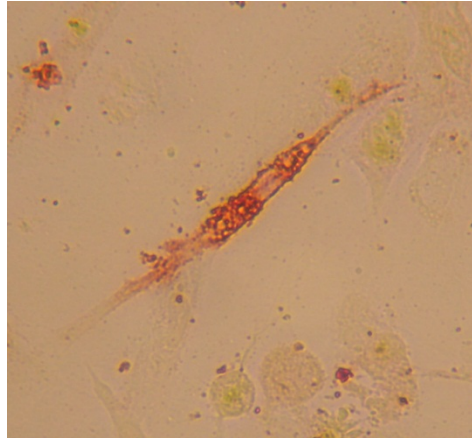
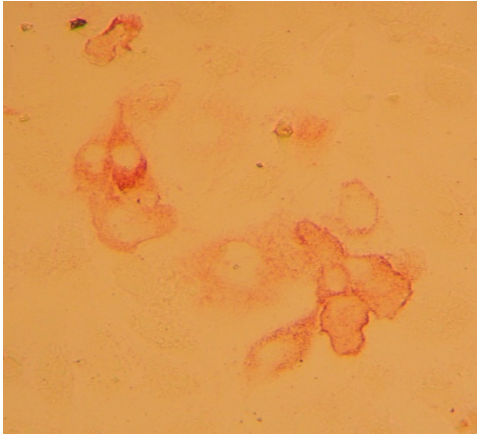
Slika 4-57: Primarna kultura kardiomiocitov soške postrvi. Test IP, negativna reakcija (100-kratna povečava).

4.4.2 Dokaz virusa IHN z imunoperoksidaznim testom

Prisotnost virusa v celicah primarne kulture kardiomiocitov smo potrdili še z imunoperoksidaznim testom (Slika 4-45, Slika 4-46).



Slika 4-58: Primarna kultura kardiomiocitov šarenke. Test IP, pozitivna reakcija (slika levo: 100-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečeva).



Slika 4-59: Primarna kultura kardiomiocitov soške postrvi. Test IP, pozitivna reakcija (slika levo: 200-kratna povečava; slika desno: 200-kratna povečava).

5 RAZPRAVA

Uspešna in zanesljiva diagnostika bolezni IHN je zelo pomembna za hitro odkrivanje in preprečevanje širjenja bolezni. Pri izpopolnjevanju tega so raziskovalci v preteklih letih na podlagi opravljenih raziskav in izkušenj postavili na prvo mesto metodo izolacije virusnega povzročitelja bolezni IHN na občutljivi celični kulturi. Kot neposredne metode potrditve in identifikacije virusa navajajo klasične imunološke in molekularne metode, ki so v današnjem času postale nepogrešljive.

V naši raziskavi smo med letoma 2005 in 2010 pregledali 1781 vzorcev organov in ovarialne ter semenske tekočine iz 11 slovenskih regij. Največ pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa IHN je bilo ugotovljenih na Gorenjskem, in sicer v 5 ribogojnicah. Število pozitivnih vzorcev v tem obdobju petih let na letni ravni ni posebej odstopalo, upoštevajoč predpise ob vzorčenju ob sumu bolezni in ob rednem izvajanju preventivnih ukrepov pri ribah. V Sloveniji vsako leto ugotovimo od 1 do 4 primere bolezni IHN (Tabela 4-1). V raziskavo smo vključili tudi vzorce, pozitivne na prisotnost virusa IHN, ki so bili pridobljeni v letih 1997–2004.

Leta 1997 smo v virološkem laboratoriju Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete uvedli diagnostiko virusnih bolezni sladkovodnih rib. Osnovni diagnostični metodi, izolaciji virusa na celični kulturi, ki še danes predstavlja temeljno diagnostično metodo in »zlati standard«, je sledila naknadna identifikacija virusa z imunološkimi metodami. Omenjene diagnostične metode danes ustrezno dopolnjujemo z molekularnimi in serološkimi metodami za dokaz virusnega povzročitelja bolezni.

Izolacija virusa na celični kulturi je ena izmed priporočenih metod izolacije virusa IHN (OIE, 2009). V našem raziskovalnem delu smo vse prejete vzorce najprej inokulirali na občutljivo celično linijo EPC. Ob pojavu CPE smo z neposrednim imunoperoksidaznim testom dokazovali prisotnost virusa IHN v vzorcih.

V Diagnostičnem priročniku OIE (2009) je za izolacijo virusa IHN na celični kulturi predlagana uporaba celične linije EPC. Leta 1983 so Fijan in sodelavci pri poskusu dokaza osepnic krapov iz tumorsko spremenjenih delov kože krapa pridobili celično linijo EPC, ki še danes velja za zelo občutljivo in tudi najpogosteje uporabljeno celično linijo v diagnostiki virusnih bolezni sladkovodnih rib. Primerna je za izolacijo virusnih povzročiteljev bolezni, kot so IHN, VHS, EHN, nekoliko manj občutljiva je za virus IPN (Kuznar in sod., 1995; De las Heras in sod., 2008).

Med letoma 1996 in 2010 smo v testiranih vzorcih organov in ovarialni ter semenski tekočini na občutljivi celični kulturi dokazali CPE pri 51 vzorcih. Z neposrednim imunoperoksidaznim

testom kot eno izmed priporočenih metod identifikacije virusa IHN, opisanih v Diagnostičnem priročniku OIE (2009), smo v vseh 51 vzorcih virus IHN tudi potrdili.

Pri izbiri metod moramo opozoriti na kritične točke, ki bi lahko vplivale na rezultat.

Temperatura hranjenja in transporta vzorcev je eden pomembnejših dejavnikov pri metodi izolacije virusa na celični kulturi. Gosting s sodelavci (1981) je poročal o termalni inaktivaciji virusa IHN, obsežnejšo študijo je opravil tudi Hostnik s sodelavci (2002). V primerjavi vpliva temperature hranjenja vzorcev tkiva rib na uspešnost izolacije virusa na celični kulturi ter v končni fazi tudi uspešnost dokaza virusne nukleinske kisline z metodo RT-PCR je z rezultati študije dokazal, da je metoda RT-PCR v primeru hranjenja vzorcev na različnih temperaturah bolj občutljiva in zanesljiva. Pri izolaciji virusa na celični kulturi lahko težavo povzročajo tudi kompleksi antigen-protitelo, saj dokazano negativno vplivajo na titer virusa, nimajo pa vpliva na uspešnost dokaza virusne RNA z metodo RT-PCR (Hostnik in sod., 2002). V takih primerih lahko vzorce, pri katerih nismo zaznali CPE, ocenimo kot negativne.

De las Heras je s sodelavci (2008) v raziskavi z metodo pretočne citometrije opazoval vezavo in vstopanje treh virusov, IHN, VHS in IPN, v celice različnih celičnih linij (BF-2, CHSE-214 in EPC). Celična linija EPC se je izkazala kot zelo primerna tudi za izolacijo virusa IPN. Visoko stopnjo vezave virusa na celične receptorje so zaznali v zgodnji fazi interakcije med virusom in celicami. Padec infektivnosti, ki se kasneje pokaže v slabše izraženem CPE, naj bi bil posledica izgube infektivnosti virusa znotraj omenjenih celic. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Imajoh in sodelavci (2003). Ugotovili so, da se virus IHN slabše veže na celice celične linije EPC v primeru koinfekcije z virusom IPN, niso pa opazili sprememb že vezanega virusa IHN na celice EPC v postopku internalizacije. Vzrok naj bi bil fibronektin, ki je glavni receptor za ribje rabdoviruse in eden izmed celičnih receptorjev tudi za virus IPN (Bearzotti in sod., 1999). V tem primeru moramo izpostaviti kompeticijo za vezavo omenjenih virusov na virusne receptorje in koreceptorje. Pri pojavu virusnih koinfekcij je vedno kritična prva stopnja, torej pripenjanje virusa na celice (De las Heras in sod., 2008). Celice celičnih linij so pred inokulacijo virusov obdelali z amantadinom, ki velja za učinkovito antivirusno zdravilo. Pri vezavi virusov IPN in VHS nismo opazili sprememb pri vezavi virusov na celice, pri virusu IHN pa se je stopnja vezave zmanjšala za več kot 30 %. Uporaba tributilamina je celo zavrla pojav CPE, ki ga na celični liniji povzroči virus IHN.

Hostnik in Jenčičeva (2000) sta v svojem poskusu dokazala, da so sveže tripsinizirane, hitro rastoče celice EPC bolj občutljive kot pa 24 ur star, konfluenten sloj celične linije EPC. V postopku titracije je bil titer virusa v suspenziji celic 10-krat višji kot virus, inokuliran na 24 ur star celični sloj EPC. V Diagnostičnem priročniku OIE (2009) priporočajo uporabo celične

kulture, ki ni starejša od 48 ur. Zelo pomembno je, da v primeru negativnega rezultata izolacije virusa na celični kulturi pomislimo tudi na ta vidik in kot dopolnilno metodo uporabimo molekularne metode dokaza virusnega obolenja. Ta vidik bi lahko bil zelo pomemben v primeru okužbe z virusnimi izolati nizke virulence ali nizke stopnje preživetosti virusa.

Če vzorec odvezamemo v času akutne okužbe z virusom IHN, dobimo visoke titre virusa IHN že po prvi pasaži na celicah EPC. Pozorni moramo biti tudi pri tripsinizaciji celic EPC, saj daljša izpostavljenost celic celične linije EPC tripsinu poškoduje receptorje za glikoprotein G, ki je odgovoren za vezavo virusa IHN na celico. Tako bi lahko zmanjšana občutljivost celic sicer zelo občutljive celične linije EPC dala lažno negativen rezultat (Hostnik in Jenčič, 2000).

Tudi večje število ciklov zamrzovanja in taljenja vzorcev (33 ciklov) ter posledično negativen vpliv intracelularnih encimov negativno vplivajo na titer virusa (Hostnik in sodelavci, 2002). Hostnik in sodelavci (2002) zato priporočajo hranjenje vzorcev na 4 °C do začetka preiskave, ki mora biti opravljena znotraj 48 ur. V nasprotnem primeru moramo material zamrzniti. Pri vzorcih, za katere ne vemo, na kateri temperaturi so bili hranjeni do prinosa v laboratorij, pa priporočajo uporabo molekularnih metod za dokaz virusa. Vsa ta dejstva smo v naši nalogi tudi upoštevali.

Danes so na tržišču dostopna monoklonska protitelesa, ki so usmerjena za dokaz virusnega glikoproteina G, in monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo za neposreden dokaz virusnega proteina N. Da je glikoprotein G najbolj variabilni gen v genomu virusa IHN, potrjuje tudi študija Fichtnerja s sodelavci (2000). Z metodo imunofluorescence s komercialnimi monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti virusnemu glikoproteinu G, niso uspeli dokazati virusnega izolata DF 04/99, medtem ko so z monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti nukleokapsidnemu proteinu, dokazali vse virusne izolate, vključene v raziskavo. Razlike v uspešnosti vezave monoklonskih protiteles so najverjetneje posledica sprememb v aminokislinskem zaporedju glikoproteina G.

V naši raziskavi smo zato za dokaz in potrditev virusa IHN uporabili monoklonska protitelesa, usmerjena proti virusnemu proteinu N. V vseh primerih smo virus IHN potrdili tako z imunoperoxidaznim testom kot z metodo RT-PCR.

V preteklih letih so v diagnostiko bolezni vpeljali molekularne metode zato, da bi povečali občutljivost in učinkovitost dokazovanja virusa (Miller in sod., 1998). Zaradi relativno nestabilne RNA virusa in možnosti kontaminacije vzorca, Bergmann (2007) priporoča uporabo metode RT-PCR za laboratorijske vzorce ali vzorce, ki smo jih pridobili v

kontroliranih pogojih, na primer iz eksperimentov. V primeru pozitivnega rezultata dokaza virusa pri določenem vzorcu moramo vedno izključiti možnost kontaminacije vzorcev pri rokovanju z ribami in posledično z okuženo opremo pri odvzemu vzorcev. V tem primeru bi z obema metodama, tako s klasično virološko kot molekularno, ob ustrezni hrambi vzorcev na terenu in v laboratoriju dokazali v vzorcu prisotnost virusa. Z obema metodama bi tako dobili lažno pozitiven rezultat.

Pri vzorcih, v katerih smo z imunoperoksidaznim testom dokazali virus IHN, smo virusno nukleinsko kislino dokazovali tudi z metodo RT-PCR. S tremi pari začetnih oligonukleotidov (E1/E3n, N-f/N-r in NV-f/ NV-r) smo pomnoževali tri različne odseke (ORF1, ORF4 in ORF5) v genomu IHNV.

Za dokaz tarčnega odseka virusnega glikoproteina G smo uporabili začetne nukleotide, ki pomnožujejo del virusnega genoma, regijo mid-G (Emmenegger in sod., 2000).

Z začetnimi oligonukleotidi na za virus IHN, ki specifično pomnožujeta mid-G regijo, so dokazali le virus IHN, ne pa tudi virusa VHS (Miller in sod., 1998).

S pomnoževanjem odseka nukleokapsidnega gena, ki se v okuženi celici najprej sintetizira, in gena NV, ki je visoko ohranjen v primerjavi z drugimi deli virusnega genoma, smo zanesljivost molekularne metode RT-PCR le še potrdili. Rezultati pomnoževanja vseh treh odsekov virusne RNA so bili pri vseh testiranih vzorcih dobro vidni po elektroforezi v agaroznem gelu. Na osnovi velikosti dobljenih produktov testiranih vzorcev v primerjavi z velikostjo produkta pozitivne kontrole smo jih opredelili kot pozitivne.

Pri vseh 51 vzorcih smo dokazali produkte pričakovane velikosti in rezultate ovrednotili kot pozitivne.

Rezultat metode RT-PCR je bil v primeru dokaza virusne nukleinske kisline s pomnoževanjem vseh treh odsekov genoma IHNV vedno močno pozitiven. Tej trditvi v prid govori dejstvo, da že po 24 urah po okužbi z virusom IHN v okuženih celicah nastane dovolj mRNA, ki jo lahko iz celic ekstrahiramo in dokažemo z molekularnimi metodami (Winton in Einer-Jensen, 2010). Glede na to, da je bilo vzorčenje opravljeno v večini primerov ob postavljenem sumu bolezni, v akutni fazi bolezni, je bila koncentracija virusa v telesu obolelih rib visoka. Slovenskemu izolatu 1654/08 smo v postopku titracije z metodo po Reed-Muenchu določili titer oziroma 50-odstotno infektivno dozo $TCID_{50}$. Titer virusa je bil $10^{6,6}$ $TCID_{50}/ml$ (4×10^6 $TCID_{50}/ml$). Ker je bila intenzivnost sevanja UV-svetlobe produktov PCR močna in enako intenzivna, lahko sklepamo, da so bili pri vseh pozitivnih vzorcih v organih virusni titri visoki.

Z metodo RT-PCR lahko IHNV dokazujemo pri šarenki še 32 tednov po okužbi (Winton in Einar-Jensen, 2010). Razvili so številne modifikacije RT-PCR metode, s katerimi lahko dokazujemo prisotnost virusa v tkivih, ki so fiksirani v formalinu in prepojeni s formalinom, tudi še po enem letu (Chiou in sod., 1995; Drolet in sod., 1995). Kot matrico za pomnoževanje tarčne RNA virusa IHN lahko uporabimo nukleinsko kislino virusnih delcev, ki jih lahko pridobimo iz celične kulture tudi s pomočjo imunomagnetnih kroglic (Kim in sod., 1999).

Rezultati dokaza nukleinske kisline IHN z metodo RT-PCR se v naši nalogi 100-odstotno ujemajo z rezultati klasičnih diagnostičnih preiskav (Tabela 4-6). Za dokaz specifičnosti metode RT-PCR smo v preiskavo vključili tudi 20 naključno izbranih vzorcev, ki na celični kulturi niso povzročili CPE. Vzorci so bili ustrezno odvzeti, do prispetja v laboratorij ustrezno hranjeni in v laboratoriju tudi ustrezno obdelani po postopkih, ki smo jih opisali v poglavju 3.1.1.1 in 3.1.1.3. Knüsel s sodelavci (2007) poroča o večji občutljivosti molekularne metode RT-PCR v primerjavi z metodo IVCK, saj so z metodo RT-PCR v testirani populaciji rib v organih dokazali 2 primera okužbe z virusom IHN, ki ju z metodo izolacije virusa na celični kulturi niso. V raziskavi, ki jo je opravila Barlič-Maganja s sodelavci (2002), so v primerjavi dveh metod, izolacije virusa IHN na celični kulturi in RT-PCR, poročali o primerljivi občutljivosti obeh metod.

Obe izbrani metodi dokaza virusa IHN, IVCK in RT-PCR, imata svoje prednosti in slabosti. Pri izolaciji virusa na celični kulturi kot negativno lastnost pogosto opišemo čas trajanja izolacije. V primerjavi z molekularnimi metodami je izolacija virusa na celični kulturi zelo uporabna, saj dokazujemo aktivno fazo okužbe. Pri molekularnih metodah lahko poleg aktivne okužbe dokazujemo tudi prisotnost neaktivnih virusnih partiklov, ki sicer ne povzročajo obolenja, so pa patognomonični in lahko kažejo tudi na neustrezno ravnanje z vzorcem.

Knüsel (2007) je v svoji raziskavi opisal tudi finančni vidik diagnostičnih metod. Primerjal je porabo finančnih sredstev pri metodi izolacije virusa na celični kulturi in metodi identifikacije virusa, v tem primeru IFAT, v primerjavi z molekularno diagnostično metodo RT-PCR. Ugotovil je, da so molekularne metode bolj uporabne in finančno bolj upravičene v primerih akutnega izbruha bolezni, v epizootioloških študijah pa molekularne metode predstavljajo komplementarno diagnostično orodje klasični izolaciji virusa na celični kulturi.

Yoshinaka s sodelavci (1998) poroča, da je bila diagnostika bolezni IHN najbolj zanesljiva ob uporabi klasične diagnostične metode izolacije virusa na celični kulturi v kombinaciji z molekularnimi metodami. Rezultati pomnoževanja ohranjene regije gena N z metodo

»nested« PCR so pokazali še večjo občutljivost (OIE, 2009). Uvedba molekularne metode RT-PCR v realnem času nam je omogočila obdelavo vzorcev v bistveno krajšem času. Metodo smo delno optimizirali. Pri delni optimizaciji metode RT-PCR v realnem času smo testirali različne koncentracije začetnih oligonukleotidov (200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 700 nM, 900 nM) in določili optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov IHNV-Tf in IHNV-Tr 500 nM. Pri koncentraciji začetnih oligonukleotidov 500 nM je naklon standardne krivulje znašal $-3,496$, kar pomeni najboljšo učinkovitost pomnoževanja pri izbranih pogojih reakcije (Slika 4-13).

Glede na rezultate testiranih slovenskih virusnih izolatov z metodo RT-PCR v realnem času lahko trdimo, da je metoda zelo občutljiva, saj je bila povprečna vrednost C_t v območju med 15 in 25 (Slika 4-14).

Z RT-PCR v realnem času smo pri dokazovanju prisotnosti virusa IHN v 51 vzorcih virusa tudi potrdili. Pri 20 vzorcih, ki so bili negativni tako pri klasičnih metodah dokaza virusa IHN kot pri metodi RT-PCR, virusa tudi z RT-PCR v realnem času nismo dokazali. S parom začetnih oligonukleotidov IHNV-Tf in IHNV-Tr smo testirali tudi 5 vzorcev iz medlaboratorijske kontrole, ki so bili pozitivni na virus IHN, VHS, IPN, SVC, in EHNV. Izmed 5 vzorcev smo virus dokazali le v enem vzorcu, ki je vseboval virus IHN, pri ostalih vzorcih je bil rezultat reakcije negativen. S tem smo določili, da so izbrani začetni oligonukleotidi specifični za dokaz virusa IHN (Tabela 4-5).

Povprečna vrednost C_t našega standarda oziroma pozitivne kontrole je bila $C_t = 28$. Se pravi, da v nobenem primeru ni šlo za dvomljive rezultate.

Rezultati preiskave RT-PCR v realnem času v primerjavi z rezultati izolacije virusa na celični kulturi in imunoperoksidaznega testa ter rezultati RT-PCR niso odstopali in so se povsem ujemali. S primerjavo metod izolacije virusa na celični kulturi in RT-PCR v realnem času smo dokazali, da sta metodi enako občutljivi.

Ugotovili in dokazali smo, da so metode IVCK, RT-PCR in RT-PCR v realnem času povsem primerljive metode v diagnostiki bolezni IHN (Tabela 4-6).

17 nukleotidnih zaporedij slovenskih virusnih izolatov IHN je bilo osnova za filogenetsko analizo IHNV in evolucijsko primerjavo s 43 nukleotidnimi zaporedji referenčnih izolatov iz Avstrije, Nemčije, Italije, Francije, Severne Amerike in Japonske. Pri urejanju in analizi nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov nas je presenetilo dejstvo, da je bilo veliko zaporedij identičnih, kljub temu da velja analizirana regija za najbolj variabilno v genomu virusa IHN.

Kljub velikemu številu dokazano pozitivnih vzorcev na prisotnost virusa IHN smo za filogenetsko analizo uporabili le 17 izbranih izolatov virusa IHN. 303 nukleotidov dolga tarčni odsek gena za virusni glikoprotein G, imenovan mid-G regija, predstavlja antigenske determinante in je najbolj informativna regija virusa IHN za filogenetsko analizo.

S primerjalno analizo mid-G regije pri 60 izbranih izolatih virusa IHN smo dokazali obstoj treh glavnih genskih skupin, ki jih označujemo kot U, M in L genska skupina, in tudi obstoj četrte genske skupine JRt, v katero so razvrščeni azijski izolati virusa IHN (Nichol in sod., 1995). Slovenski izolati virusa IHN so vsi uvrščeni v gensko skupino M. Znotraj genske skupine M, ki jo delimo na dve genski podskupini, M-Eur-1 in M-Eur-2, pa so slovenski virusni izolati razporejeni povsem neodvisno (Slika 4-11).

Virusne izolate, uvrščene v gensko skupino M, so v večini dokazali pri šarenki (Troyer in Kurath, 2003; Troyer in sod., 2000). To velja tudi za vse slovenske izolate, saj so bili vsi izolirani pri šarenkah.

Prvi pozitivni vzorec na virus IHN, ki smo ga obdelali v filogenetski analizi, smo dokazali leta 1996 in izvira iz Koroške regije. Vzorec z identičnim nukleotidnim zaporedjem smo dokazali še istega leta v Posavski regiji in v letih 1998 v Podravski ter Obalno-kraški regiji, 1999 v Posavju, leta 2001 ponovno na Koroškem, in sicer dvakrat, in leto kasneje, se pravi leta 2002, v Osrednjeslovenski regiji. Vsi omenjeni virusni izolati so imeli identična nukleotidna zaporedja in so združeni v samostojno monofiletsko skupino, gensko podskupino M-Eur1. V isto skupino so uvrščeni tudi virusni izolati iz Avstrije, Francije in en izolat iz Italije. V isto gensko podskupino sta uvrščena še dva virusna izolata, in sicer Slo-c (GU571166) in Slo-d (571173), dokazana v Posavju leta 2001 in 2005. Vsak zase sta samostojni veji znotraj M-Eur1 (Slika 4-11).

V M-Eur2 so uvrščeni 4 slovenski izolati virusa IHN, ki znotraj te genske podskupine oblikujejo samostojno monofiletsko skupino z visoko statistično podporo (86 %). Vzorci, ki smo jih dokazali leta 2001 (Koroška regija), 2002 in 2003 (Osrednjeslovenska regija), leta 2004 (Savinjska regija) in leta 2006 (Savinjska regija), so morda dokaz novega genotipa, ki še ni bil poprej opisan.

Identična nukleotidna zaporedja treh slovenskih izolatov, označenih kot sekvenčna skupina Slo-f (GU571161, GU571165, GU5711749) in skupina Slo-g (GU571164), ki smo jih izolirali v Obalno-kraški regiji (1998), na Gorenjskem (1999) in v Posavju (2005), kaže na najverjetnejši prenos virusa IHN iz Obalno-kraške regije preko Gorenjske v Posavje. V skupini Slo-b pa se nahaja virusni izolat, ki smo ga dokazali leta 1999 v Posavju. Vsi štirje

izolati so uvrščeni v gensko skupino M, vendar izven evropskih podskupin M-Eur1 in M-Eur-2. Položaj skupin Slo-b in Slo-f kaže na relativno samostojen in ločen razvoj (Slika 4-11).

Velja, da je različnost virusov IHN vezana na geografsko področje, kjer se je določen izolat virusa pojavil, in ni odvisna niti od vrste gostitelja niti od časa izolacije posameznega virusnega izolata. Omejenost pojava virusa IHN pri različnih gostiteljskih vrstah je v svoji študiji opisal Kurath s sodelavci (Kolodziejek in sod, 2008).

Rezultati analize delnih nukleotidnih zaporedij gena za glikoprotein G so pokazali nizko stopnjo genetske raznolikosti med slovenskimi izolati virusa IHN, saj je bilo ujemanje od 97,7- do 100-odstotno.

Rezultati naše analize se ujemajo z rezultati raziskave, ki sta jo opravila Nichol s sodelavci (1995) in Enzmann s sodelavci (2005). Na osnovi dobljenih rezultatov sta zaključila, da je stopnja genetske raznolikosti virusov IHN v Severni Ameriki manj kot 5-odstotna, pri evropskih izolatih pa je stopnja različnosti na nukleotidnem nivoju od 0- do 2,3-odstotna. V primerjavi delnih zaporedij slovenskih izolatov z vključenimi referenčnimi izolati smo ugotovili več kot 91,4-odstotno ujemanje na nukleotidnem nivoju.

Tudi Kolodziejek (2008) poroča le o 4,4-odstotni različnosti v nukleotidnem zaporedju avstrijskih izolatov virusa IHN. To samo potrjuje, da je bil genom virusa IHN izpostavljen le manjšim mutacijam.

Na aminokislinskem nivoju je bil odstotek ujemanja med slovenskimi izolati 98–100, v primerjavi z referenčnimi sevi virusa IHN pa 86,1.

V 303 nt dolgem tarčnem odseku, mid-G regiji, smo ugotovili samo 7 različnih nukleotidov, kar pomeni 97,7-odstotno identičnost in nakazuje evolucijski razvoj iz skupnega prednika. Ta rezultat potrjuje našo hipotezo, da so slovenski izolati virusa IHN zelo homogeni. Po pričakovanju so vsi tudi uvrščeni v gensko skupino M, v katero so uvrščeni tudi vsi evropski izolati virusa IHN. S filogenetsko analizo smo dokazali, da so slovenski izolati virusa IHN sorodni nemškimi, italijanskimi, francoskimi in avstrijskim izolatom. Ta podatek nam pove, da so slovenski ribogojci v preteklih 15 letih zelo intenzivno trgovali s temi državami in v Slovenijo uvažali tudi okužene ribe.

Glede na rezultate filogenetske analize lahko sklepamo na intenziven, a žal nekontroliran promet z okuženim zarodom ali konzumnimi ribami. Tako se je virus v kratkem času raznesel po vsej Sloveniji. Dokazali smo ga v 11 slovenskih regijah od skupno 12 slovenskih regij (Slika 4-9).

Na različnost virusnih izolatov naj bi vplivalo specifično okolje akvakulture, ki ob vsakoletni naselitvi nove, neimune populacije rib, omogoča pogosto virusno replikacijo in nekaj vročih

točk mest za nesinonimne mutacije v mid-G regiji, ki prav tako vplivajo na različnost in relativno hitro evolucijo virusa IHN (Troyer in Kurath, 2003).

Virus IHN lahko v naravnem habitatu preživi veliko let (Bootland in Leong, 1999), dokler so prisotne dovzetne vrste rib in na voljo ustrezni okoljski pogoji (npr. temperatura). Virus IHN lahko v ribogojnico vnesemo z nekontroliranim transportom okuženih rib iz ribjih farm neznanega statusa. Okužba z virusom IHN sproži nastanek nevtralizacijskih protiteles (Amend in Smith, 1974).

V organih rib je virus IHN lahko prisoten v zelo nizkih koncentracijah in ne povzroča smrtnosti ali kliničnih znakov obolenja, sproži pa imunski odziv. V začetni fazi imunskega odgovora na okužbo z virusom IHN te ribe predstavljajo za okolico vir okužbe kot asimptomatski prenašalci virusa IHN (OIE, 2009). V tej fazi bolezni prisotnosti virusa IHN ali virusne nukleinske kisline pogosto ni mogoče dokazati.

Izbrana metoda nevtralizacije virusa IHN je v izvedbi postopka zelo podobna testu PNT, ki je zelo uporaben pri študijah nadzora nad boleznijo VHS, vendar je manj občutljiv kot metoda ELISA. Slabost testa ELISA je navzkrižna reaktivnost protiteles proti virusu VHS in virusu IHN (Knüsel in sod., 2007).

V naši raziskavi smo kot analogno metodo PNT pri testiranju serumskih vzorcev na prisotnost protiteles proti virusu IHN uporabili virus nevtralizacijski test v skladu z navodili AFSSA (Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija).

V preiskavo smo vključili krvne vzorce plemenk iz ribogojnice A, v kateri je bil v zimskih mesecih dokazan izbruh bolezni IHN. V 12-mesečnem obdobju je bilo izvedenih več vzorčenj tako za virološke kot serološke preiskave. Pregledali smo 197 serumskih vzorcev šarenk. Največ vzorcev, pri katerih smo s testom virusne nevtralizacije v krvnih vzorcih dokazali titre protiteles $\geq 1:80$, je bilo odvzetih meseca junija (70,89 %–75 %), 5 mesecev po okužbi (Slika 4-17, Slika 4-18). Septembra so bila protitelesa v krvnih vzorcih še vedno prisotna, odstotek pozitivnih vzorcev je bil nekoliko nižji (65 %–73,69 %) (Slika 4-19, Slika 4-20). Po enem letu smo s testom virusne nevtralizacije protitelesa dokazali le še pri 42,86 % vzorcev (Slika 4-21). Naši rezultati virus nevtralizacijskega testa sovpadajo z rezultati študije Hattenberger-Baudouy in sodelavcev (1989), ki poročajo, da pri mladih šarenkah med epizootijo IHN niso dokazali nevtralizacijskih protiteles, po 4,5–6 mesecih po okužbi pa so pri več kot polovici preživelih rib dokazali signifikanten humoralni imunski odgovor. Do 8. meseca po okužbi je število rib, pri katerih so dokazali protitelesa, upadlo, pri ribah se je znižal tudi titer protiteles. Cain s sodelavci (1996) je poročal, da so se pri mladich šarenke po eksperimentalni okužbi z virusom IHN nevtralizacijska telesa pojavila že od 21. do 28. dneva po okužbi.

Določeno stopnjo odpornosti na okužbo z virusom IHN so dokazali pri zarodu imuniziranih rib, kar kaže na morebiten prenos imunosti iz matere na zarod (Castillo in sod., 1993). Oshima s sodelavci (1996) je to domnevo tudi dokazal, in sicer je imunost pri zarodu trajala do 25. dneva po izvalitvi. Ker je v tem obdobju prehranjevanje vezano še na rumenjarkovo vrečko, obstaja možnost, da je imunost povezana z maternalnimi protitelesi.

Traxler s sodelavci (1997) je trditev, da lahko virus IHN dokažemo le pri ribah, ki nimajo protiteles, ovrgel, in poroča, da so pri rdečem lososu v času drsti opazili povečano stopnjo odziva humoralne imunosti na okužbo z virusom IHN, kar je dober pokazatelj imunokompetence. Pri ribah, ki so jih pregledali na prisotnost protiteles v jeseni, je titer protiteles naraščal, kljub temu da so virus uspeli dokazati le pri eni ribi od 19. Pri drugi skupini pa poroča o nespremenjenih titrih protiteles pri ribah, pri katerih so virus IHN dokazali v 42 % populacije.

Test virusne nevtralizacije je primerna in uporabna metoda dokazovanja prebolele okužbe z virusom IHN v klinično zdravi populaciji rib.

Simptomi in patološke spremembe, ki so se pojavile pri ribah v biološkem poskusu, so se nekoliko razlikovali od doslej splošno znanih kliničnih znakov, karakterističnih za bolezen IHN.

Doslej objavljeni podatki o patogenezi virusnih obolenj pri ribah so osnovani v glavnem na opisih v posameznih, spontanih primerih izbruha bolezni, ni pa veliko podatkov, ki bi temeljili na podatkih, pridobljenih v eksperimentalno okuženih ribjih populacijah.

V našem poskusu smo samo pri posameznih primerih rib opazili spremembe, značilne za okužbo z virusom IHN. Nekoliko temnejša koža, eksoftalmus, razprte škrge in razširjen abdomen so klinični znaki, ki smo jih opisali. Patoanatomsko pa smo prepoznali hiperemijo in povečanje anteriornega dela ledvic pri šarenkah, ki smo jim aplicirali 100 µl delovne razredčine virusa. Petehialne krvavitve smo opazili v hrbtni mišičnini pri samo eni ribi v isti skupini. Matras s sodelavci (2006) poroča o pojavu podobnih kliničnih znakov, kot smo jih opisali mi. Noga (1996) poroča o prvem poginu šarenk po 5. dnevu okužbe, Matras s sodelavci (2006) pa poroča o relativno poznem pojavu prve moribundne ribe, in sicer 8. dan po infekciji. V našem poskusu smo prvi pogin opazili pri šarenkah (skupina A) 5. dan po okužbi. Po podatkih, ki sta jih objavila Ogut in Reno (2004), resne epizootije nastopijo znotraj šestih dni po okužbi. Naši rezultati biološkega poskusa se ujemajo z rezultati raziskave, ki so jih opravili Noga (1996) ter Ogut in Reno (2004), saj smo prvi pogin šarenke v skupini A opazili 5. dan.

V biološkem poskusu smo uporabili suspenzijo virusa z dvema različnima koncentracijama virusa IHN (10^5 TCID₅₀/ ml in 10^3 TCID₅₀/ ml). Namen našega poskusa je bil, dokazati, da je soška postrv manj občutljiva na okužbo z virusom IHN v primerjavi s šarenko. Na osnovi rezultatov smo pripravili krivulje, ki ponazarjajo dinamiko virusne okužbe (Slika 4-25, Slika 4-26, Slika 4-27, Slika 4-28, Tabela 4-7, Tabela 4-8).

Za primerjavo smo uporabili podatke edine opravljene virološke študije občutljivost soške postrvi na okužbo z virusom IHN in VHS, ki jo je opravil Borghesan s sodelavci (2004). Avtor poroča o slabši dovzetnosti soške postrvi za okužbo (50 % preživelih soških postrvi) v primerjavi s šarenko, vendar podatki niso statistično obdelani. Avtor samo na podlagi izračunanih odstotkov ne more potrditi ali ovreči postavljene hipoteze.

V našem primeru govorimo pri soški postrvi iz skupine A o 60 % preživelih, iz skupine B pa so vse testirane ribe preživele okužbo z virusom IHN.

V skupini A pri šarenkah smo ugotovili visok pogin znotraj 7. dni po okužbi. V vseh odvzetih organih smo virus po predhodno opravljeni izolaciji virusa na celični kulturi dokazali z imunoperoksidaznim testom in tudi z metodo RT-PCR. Pri šarenkah skupine B je bila smrtnost po 10. dnevih po okužbi 100-odstotna, pa smo virus pričakovano dokazali v manjši meri kot pri skupini A (Tabela 4-6 in Tabela 4-7). Pri soških postrvih skupine A je bila smrtnost v primerjavi s skupino A šarenk občutno nižja, in sicer 60-odstotna. Podobno je bilo v primerjavi soških postrvi skupine B s skupino šarenk skupine B. Pri soških postrvih v tej skupini nismo opazili nobenega pogina. Pri soških postrvih smo dokazali virus v organih z metodo IVCK pri skupini A v 5 %, pri skupini B pa virusa IHN nismo dokazali. Z metodo RT-PCR smo pri soških postrvih skupine A prisotnost virusa dokazali v 77,5 %, pri skupini B pa le v 25 %. Rezultate smo statistično ovrednotili. Pri obeh metodah dokaza virusa IHN smo dokazali, da obstaja statistično značilna povezanost med vrsto rib in občutljivostjo rib za okužbo z virusom IHN ($p = 0,000$), ter tako potrdili našo hipotezo, da je soška postrv manj dovzetna na okužbo z virusom IHN. Glede na izračun Pearsonovega koeficienta korelacije, ki daje odgovore na smer in moč korelacije med vrsto ribe in prisotnostjo virusa IHN, lahko trdimo, da je metoda izolacije virusa na celični kulturi v primerjavi z molekularno metodo RT-PCR bolj uporabna, saj koeficient kaže večjo vrednost korelacije, ki pri metodi izolacije virusa na celični kulturi znaša 0,565 ($r_p = 0,565^{***}$), pri RT-PCR pa 0,301 ($r_p = 0,301^{***}$) (Tabela 4-13, Tabela 4-14).

Najverjetneje smo z metodo RT-PCR pri soški postrvi dokazovali neaktivne virusne delce, medtem ko smo z metodo izolacije virusa IHN na celični kulturi dokazovali aktivno fazo okužbe.

Naš poskus je trajal 45 dni. Po podatkih v literaturi lahko pri mladih ribah virus IHN izoliramo do 50. dneva po epizootiji (Amend, 1975; Drolet in sod., 1995). Amend (1975) je v svojem poskusu opozoril tudi na posebnost, saj je v poskusu uspel pri okuženih ribah virus IHN dokazati šele po treh tednih po izbruhu bolezni, pri 33 % testirane populacije rib pa je virus IHN dokazal še po dveh letih po okužbi, torej v obdobju spolne zrelosti rib.

Iz literature je znano, da se virus IHN lahko s kohabitacijo prenese na druge ribe (Pilcher in Fryer, 1980a; Traxler in sod., 1993).

Kljub temu da v našem biološkem poskusu nismo opravili kohabitacije, lahko trdimo, da soška postrv, pri kateri dokažemo prisotnost virusa IHN, predstavlja potencialni vir okužbe za okolje. Seveda okužba z imerzijo predstavlja za ribe manjši stres kot pa intraperitonealna aplikacija virusa. Riba okužena z virusom IHN naj bi pred poginom okužila 1,56 rib. Virusna okužba bi se na ta način med dovzetnimi vrstami rib širila počasi (Ogut in Reno, 2004). Smrtnost je bila v njunem eksperimentu po 14 dnevih 90-odstotna, pri našem poskusu je bila 100-odstotna.

Ogut in Reno poročata (2004), da ima velik pomen na širjenje virusa IHN gostota naseljenosti rib. To lahko razlagamo na dva načina. Gostota rib slabša kvaliteto vode, kar povzroča pri ribah stres in posledično vpliva na imunski sistem, po drugi strani pa velika gostota rib povečuje možnost direktnega kontakta med okuženimi in zdravimi ribami. Do enakih ugotovitev sta prišla Mulcahy in Bauersfeld (1983), ki sta ocenjevala smrtnost pri različnih gostotah iker. Opazila sta kar 90-odstotno smrtnost pri ribah, pri katerih je bila gostota 9×10^5 iker/zaboj, pri gostoti $3,5 \times 10^5$ iker/zaboj je bila le 40-odstotna. Opozoriti moramo, da s tem, ko večamo življenjski prostor ribam, hkrati manjšamo možnost kontakta z obolelimi ribami ali infektivnim agensom (Ogut in Reno, 2004).

Raziskovalci so v eksperimentih do zdaj v večini uporabljali le imerzije. V našem poskusu smo virus aplicirali i/p in dokazali povsem primerljive rezultate, kljub temu da velja, da naj bi bile škrge primarno mesto vstopa virusa IHN v organizem (Yamamoto in Clermont, 1990; Drolet, 1994), po telesu pa naj bi se virus IHN nato širil s krvnim obtokom (Yasutake in Amend, 1972).

V biološkem poskusu smo dokazali 100-odstotno smrtnost populacije šarenk iz testnih skupin A in B. Yasutake in Amend (1972) sta poročala o 90-odstotni smrtnosti v testirani populaciji rib. Titer virusa, ki smo ga uporabili pri šarenkah iz skupine A, je bil 10^5 TCID₅₀/ml, titer virusa, ki sta ga uporabila Ogut in Reno, pa $10^{5,7}$ pfu/ml.

Yasutake in Amend (1972) sta testno populacijo rdečega lososa okužila z imerzijo. Poročala sta, da so se prvi smrtni primeri pojavili 5. dan po okužbi in naraščali še nekaj dni potem. Rezultati našega poskusa v populaciji šarenk so bili zelo podobni (Slika 4-25, Slika 4-26).

Pri nekaterih ribah se virus zelo hitro širi po telesu, medtem ko pri drugih ne (Yamamoto in Clermont, 1990). Znano je, da šarenke postanejo odpornejše v odrasli dobi, najverjetneje pa ima pri tem velik vpliv dobro razvit imunski sistem.

Ciljni organi za virus IHN so hematopoetsko tkivo ledvic in vranice (Yasutake in Amend, 1972). Okužbo z virusom IHN lahko najprej opazimo v endotelni celici ledvic (anteriorni in posteriorni del). Virus lahko v njih dokažemo že 1–3 dni po infekciji (Brudeseth in sod., 2002). Virus napreduje po retikularno endotelijski stromi v intersticiji, kjer v okuženih levkocitih in makrofagih lahko dokažemo prisotnost virusa IHN (Chilmonczyk in sod., 1995). Podatek, da je epidermalno tkivo mesto začetne replikacije virusa IHN pri zarodu šarenke, na osnovi rezultatov opravljene študije zagovarja tudi Yamamoto s sodelavci (1990).

Pozitiven rezultat imunohistokemičnega dokazovanja virusnega antigena v nekrotičnih žariščih je značilen pri multifokalnih nekrozah (Brudeseth in sod., 2002). V jetrih se virus IHN pojavi kasneje, šele 5. dan po infekciji. Kot zanimivost naj omenimo, da virusa niso ugotovili v endotelni celici sinusoid jeter. Možna razlaga tega pojava je, da jetrne endotelne celice nimajo receptorja za virus IHN (Brudeseth in sod., 2002).

Kljub temu da nekatere vrste salmonidnih rib okužba z virusom IHN ne prizadene resno, lahko postanejo prenašalci in rezervoar tega virusa (Hedrick in sod., 1987). Prenašalci imajo pomembno vlogo pri širjenju virusa med občutljivimi vrstami rib v drstitveni sezoni.

Pri tem, da je prišlo do razlik v občutljivosti na okužbo z virusom IHN, moramo upoštevati tudi to, da smo v poskusu okuževali ribe, ki bi lahko bile bolj robustne in odporne na okužbo z virusom IHN, kljub temu da so vzgojene v okolju prostem virusa IHN. Vsekakor pa lahko vpliva tudi boljša kvaliteta hrane.

Z biološkim poskusom smo dokazali, da lahko soške postrvi, ki so bile izpostavljene okužbi z virusom IHN, postanejo prenašalci virusa.

V tkivnih rezinah organov (ledvice, jetra, možgani, vranica in srce) šarenk in soških postrvi smo z imunohistokemično reakcijo dokazovali prisotnost virusnega antigena. Virusni antigen smo pri šarenki ugotovili v več organih, medtem ko ga pri soški postrvi nismo dokazali.

Prisotnost virusa IHN smo pri soški postrvi dokazali le z metodo RT-PCR, ne pa tudi imunohistološko. Ker smo z imunohistološkimi metodami pri soški postrvi dobili negativen rezultat, smo želeli preveriti zmožnost razmnoževanja virusa v celični kulturi in v ta namen pripravili primarno celično kulturo soške postrvi in poskus izolacije virusa na celični kulturi.

Treba se je zavedati, da imunohistologija ni visoko občutljiva metoda. Zaradi tega še vedno obstaja možnost vezave v našem poskusu uporabljenih monoklonskih protiteles na majhno število v tkivu prisotnih virusnih delcev, ki pa je premajhno za zaznavo z imunohistokemično reakcijo.

Pogoj, da se bodo celice, ki smo jih osamili iz tkiva rib, razmnoževale, je, da imajo v rastnem gojišču, v katerem jih gojimo, dovolj hranilnih snovi in rastnih faktorjev. Celice lahko preživijo in se razmnožujejo le v mediju z ustreznima pH in temperaturo.

Sterilne stekleničke za gojenje celic, v katerih smo kulturo gojili, smo inkubirali v termostatu z ustrezno atmosfero. Rastnemu gojišču za gojenje primarne kulture kardiomiocitov šarenke in soške postrvi smo dodali FBS v končni koncentraciji 30 %, ki vsebuje primerno mešanico rastnih hormonov.

Tak postopek gojenja celic zunaj organizma v ustreznih gojiščih imenujemo celična kultura, ki posamezni celici omogoča, da deluje kot neodvisna, samostojna enota. Celice so se sposobne z mitozo toliko časa deliti, dokler imajo na voljo hranilne snovi. Živalske celične kulture, ki jih običajno gojimo, največkrat sestavljajo celice enega tipa, na primer. fibroblasti. Slabost celične kulture je, da se lahko po določenem obdobju rasti karakteristike celic povsem spremenijo v primerjavi s celicami, ki jih najdemo v izvornem tkivu donorske živali. Celice se namreč prilagodijo spremenjenemu mikrookolju, v katerem živijo. Ta adaptacija zajema spremembe v aktivnosti intracelularnih encimov (Butler, 2004).

Smrtnost je lastnost vseh celic, ki izvirajo iz normalnega tkiva vsega živega. Vsaka celica ima svojo biološko uro, ki jo definira število delitev izvirne matične celice (Butler, 2004).

Končno število generacij, ki bodo nastale iz izvirne celice, je značilnost, lastna tipu in starosti celice izvirnega tkiva. To imenujemo Hayflickova limita (Hayflick in Moorhead, 1961). Celice primarne kulture izražajo visoko stopnjo telomerazne aktivnosti. S staranjem se jim telomere krajšajo, zato v kulturi dokaj hitro preidejo v senescenco in odmrejo (Bongso in Richards, 2004).

Odločili smo se za izolacijo celic iz tkiva srca. Uspešnost rasti primarne kulture je najboljša v primeru embrionalnih celic, saj jih najlažje ločimo med seboj v rastnem mediju, imajo odličen rastni potencial, struktura tkiva je visoko ohranjena in sestoji iz različnih celičnih tipov. Zato smo za pripravo primarne celične kulture izbrali tkivo srca mladice šarenke in soške postrvi. Primarno kulturo smo pripravili po modelu eksplantov (Harrison, 1907; Carrel, 1912). Najbolj kritičen moment v pripravi primarne kulture je čas encimske razgradnje tkiva do posameznih celic s proteolitičnimi encimi, saj se lahko v tej stopnji priprave tkiva celična membrana poškoduje. V ta namen smo uporabili tripsin, ki smo mu v enaki količini dodali PBS. Možnost

bakterijske kontaminacije primarne kulture pa smo zmanjšali z dodatkom antibiotika/antimikotika v standardnih koncentracijah.

Celice se lahko delijo le, če so trdno pritrjene na podlago. Za gojenje kardiomiocitov smo uporabili stekleničke za gojenje celic z dnom, prevlečenim s plastjo sestavin zunajceličnega matriksa, s poli-D-lizinom in poli-L-lizinom. Tako smo celicam omogočili in olajšali pritrditev. Med inkubacijo se med sosednjimi celicami vzpostavljajo medcelični stiki, zato se gibanje in delitev celic ustavi (kontaktna inhibicija).

Vedeti moramo, da obstaja največja možnost genetskih sprememb celic v začetnih pasajah gojenja celic, saj se v tem obdobju celice šele privajajo na novo okolje.

Celice pogosto poimenujemo po tkivu, iz katerega izvirajo, in po njihovih značilnih oblikah. Pripravili smo primarno kulturo kardiomiocitov, ki smo jih glede na morfologijo opredelili kot fibroblaste. Fibroblasti imajo odlične rastne karakteristike, se dobro in hitro prilagodijo novemu okolju rasti in razmnoževanja, njihova stopnja rasti s časom podvojevanja pa je 18–24 ur.

Lastnost fibroblastov je intenzivna rast. V pripravljeni primarni kulturi kardiomiocitov so fibroblasti prerasli mišične celice. Tako nam ni bilo treba opraviti ločevanja celic s pomočjo ravnotežnega centrifugiranja z merilcem gostote. Namnoževanje fibroblastov lahko favoriziramo tudi z rastnim medijem, ki je namenjen gojenju fibroblastov.

Z vstopom virusa v celico se spremeni znotrajcelično biološko in fiziološko okolje, ki omogoča optimalne pogoje za virusno razmnoževanje.

Pri okužbah celic z virusi so raziskovalci opozorili na vpliv kalcijevih ionov v citosolu. V primeru celične smrti so prav kalcijevi ioni tisti, ki v celičnem procesu povzročajo ireverzibilne spremembe. Kim s sodelavci (1996) je poročal, da bi bil lahko to možen odgovor na vprašanje, zakaj so različne celične linije različno dovzetne za okužbo z virusi.

Virus lahko v celicah povzroči zvišano koncentracijo Ca^{2+} in sproži verižno reakcijo, ki vodi preko aktivacije endonukleaz, fosfolipaz, ekspresije nekaterih zgodnjih genov (*c-Fos*, *c-Jun*, *c-Myc*) (Trump in Berezsky, 1995) do spremenjenega znotrajceličnega okolja, ki je ustrezno za razmnoževanje virusa. Te spremembe so zelo podobne signalni transdukciji, ki jo inducirajo hormoni in rastni faktorji (Albrecht in sod., 1990). Prehod Ca^{2+} iz zunajceličnega okolja v celico je lahko ena izmed možnosti povečane koncentracije Ca^{2+} v celici, lahko pa na povečanje vpliva tudi sprostitvev Ca^{2+} iz endoplazemskega retikuluma, mitohondrijev ali Golgijevega aparata (Xiaohui in sod., 1995).

Yamamoto in Clermont (1990) sta poročala, da so 7. in 8. dan po okužbi z virusom IHN, visoke titre virusa ugotovili v srcu. Pri mladih, en mesec starih šarenkah, je srce predilekcijsko mesto razmnoževanja virusa IHN.

Za potrditev virusa IHN v primarni celični kulturi kardiomiocitov šarenke in soške postrvi smo izvedli imunoperoksidazni test. Virus smo dokazali v obeh vrstah celic. V primarni celični kulturi kardiomiocitov šarenke smo z imunoperoksidazno metodo identificirali in tako dokazali prisotnost virusa IHN v celicah, medtem ko smo v primarni celični kulturi kardiomiocitov soške postrvi opazili značilno rdeče obarvanje citoplazme le pri posameznih celicah.

Primarna kultura kardiomiocitov soške postrvi se je izkazala za manj občutljivo, kot je bila primarna kultura kardiomiocitov šarenke, obe pa sta bili manj občutljivi kot celična linija EPC.

Kljub temu je primarna kultura zaradi prisotnosti različnih celičnih tipov v kulturi bolj reprezentativen model *in vivo* odgovora na okužbo z virusom IHN kot pa celična linija EPC. Za razliko od sesalcev, celične linije pri ribah, ki izvirajo iz primarne kulture, skoraj vedno postanejo nesmrtni, trajne celične linije (Ostrander, 2000). Transformacija se zgodi spontano ali pa je kemično ali virusno povzročena (Batista, 2005).

Da se virus IHN dejansko lahko razmnožuje v celicah soške postrvi, smo potrdili z izolacijo virusa IHN v primarni celični kulturi. Tako obstaja velika verjetnost, da se virus razmnožuje tudi *in vitro*, kar pomeni, da je lahko soška postrv vsaj krajši čas nosilec virusa. Ti prenašalci lahko virus širijo v okolje preko občutljivih in dovzetnih vrst za virus IHN, če živijo v kohabitaciji. V tem primeru naj bi bila metoda izolacije virusa IHN na celični kulturi, s katero bi dokazovali prenašalce virusa, neuspešna, razen v primeru, ko gre za aktivno okužbo (St-Hilaire in sod., 2001).

V naši raziskavi smo potrdili hipotezo, da je šarenka bolj dovzetna za okužbo z virusom IHN. S statistično obdelavo rezultatov biološkega poskusa smo ugotovili, da je metoda izolacije virusa IHN na celični kulturi v tem primeru primernejša in zanesljivejša kot klasična molekularna metoda RT-PCR.

V opravljeni raziskavi smo dokazali in potrdili pomembnost uporabe klasičnih viroloških tehnik dokazovanja virusa IHN ob hkratni uporabi molekularnih metod (RT-PCR in RT-PCR v realnem času). Poudariti moramo, da so se omenjene metode izkazale za enako zanesljive in občutljive. Izpostaviti moramo le dejstvo, da ob današnjih zahtevah po čimprejšnjem rezultatu preiskave in potrditvi diagnoze kot zelo uporabno štejemo metodo RT-PCR v realnem času, saj so rezultati na voljo že v nekaj urah. Klinično sliko bolezni ustrezno dopolnjuje test

virusne nevtralizacije. Glede na rezultate smo potrdili uporabnost metode dokazovanja nevtralizacijskih protiteles v smislu dokazovanja pretekle okužbe z virusom IHN takrat, ko so metoda izolacije virusa na celični kulturi in molekularne metode nezanesljive. V populaciji rib, pri katerih smo dokazali prisotnost nevtralizacijskih protiteles, lahko v času drsti pričakujemo reaktivacijo virusa IHN in ponovni izbruh bolezni.

Poudariti moramo, da smo poleg dokazanih ugotovitev v opravljenih preiskavah našega raziskovalnega dela, vzpostavili uspešno diagnostično strategijo okužb z virusom IHN, ki jo lahko hitro in učinkovito prenesemo tudi na diagnostiko drugih virusnih okužb pri ribah, predvsem VHS.

6 SKLEPI

- Dokazali smo, da je virus IHN razširjen na celotnem področju Slovenije.
- Virus IHN smo dokazali le pri šarenkah (*Oncorhynchus mykiss*).
- V obdobju 1997–2010 smo od skupno 76 vzorcev pozitivnih na virus IHN v 70 primerih virus dokazali v organih rib, le v 6 primerih smo ga dokazali v ovarialni ali semenski tekočini.
- Z metodo izolacije virusa na celični kulturi in imunoperoksidaznim testom smo v obdobju 2005–2010 virus IHN dokazali pri 51 vzorcih (2,9 %).
- Z molekularno metodo RT-PCR smo dokazovali tri odseke (ORF1, ORF4 in ORF5) genoma virusa IHN pri vzorcih, ki so bili odvzeti v obdobju 1997–2010. Produkte smo potrdili z elektroforezo v agaroznem gelu pri 76 vzorcih.
- Za dokaz virusa IHN smo v laboratorijsko diagnostiko bolezni vpeljali metodo RT-PCR v realnem času. Začetni oligonukleotidi in sonda so se specifično prilegali na tarčni odsek gena G. V vseh 76 vzorcih smo uspešno in ponovljivo dokazali virusno nukleinsko kislino.
- Virus nevtralizacijski test smo uporabili kot presejalno metodo za dokaz pretekle okužbe z virusom IHN v klinično zdravi populaciji rib. Titri nevtralizacijskih protiteles so bili najvišji 7. mesec po okužbi, dokazali smo jih lahko še po letu in pol po okužbi z virusom IHN.
- Metoda izolacije virusa IHN na celični liniji EPC je enako občutljiva kot metoda RT-PCR v realnem času.

- Metoda RT-PCR v realnem času je 10-krat bolj občutljiva kot metoda RT-PCR.
- Metoda izolacije virusne nukleinske kisline s komercialnim kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit se je izkazala bolj učinkovita kot metoda izolacije virusne nukleinske kisline z reagentom TRIzol[®].
- Prvič smo v Sloveniji določili genetske lastnosti virusov IHN. Virusnim izolatom IHN, ki smo jih dokazali pri šarenkah, smo določili nukleotidno zaporedje variabilnega odseka (mid-G) ORF4, ki kodira virusni glikoprotein G.
- S filogenetsko analizo smo slovenske izolate virusa IHN uvrstili v gensko skupino M, v katero so uvrščeni vsi evropski izolati, časovno in geografsko neodvisno razporejeni v genskih podskupinah M-Eur1 in M-Eur2.
- Slovenski izolati virusa IHN so genetsko homogeni. Z analizo delnih nukleotidnih zaporedij ORF4 smo na nukleotidnem nivoju ugotovili od 97,7- do 100-odstotno ujemanje, na aminokislinskem nivoju pa je bilo ujemanje od 98- do 100-odstotno.
- Z biološkim poskusom smo testirali občutljivost šarenke in soške postrvi na okužbo z virusom IHN. Z metodo izolacije virusa na celični kulturi in molekularno metodo RT-PCR smo v vzorcih organov šarenke in soške postrvi dokazovali prisotnost virusa IHN. Na podlagi statistično podprtih rezultatov lahko trdimo, da obstaja statistično značilna povezanost med vrsto rib in občutljivostjo rib na okužbo z virusom IHN. Ocena statistične povezanosti pri dokazovanju virusa IHN z metodo IVCK je bila $\chi^2 = 71,452$ *** ali $p = 0,000$, pri dokazovanju virusa z metodo RT-PCR pa $\chi^2 = 19,847$ *** ali $p = 0,000$. Pri šarenkah je virus prisoten v večjem številu vzorcev, zato veljajo za bolj dovzetno vrsto za okužbo z virusom IHN.
- V tkivnih rezinah organov (ledvice, jetra, možgani, vranica in srce) šarenk in soških postrvi iz biološkega poskusa smo z imunohistokemično metodo dokazovali prisotnost

virusnega antigena. Virusni antigen smo pri šarenki ugotovili v več organih, medtem ko ga pri soški postrvi nismo dokazali.

- V primarni kulturi srčnega tkiva šarenke in soške postrvi, ki smo jo pripravili z modificirano metodo eksplantov, smo z imunoperoksidaznim testom dokazali virus IHN v celicah pri obeh vrstah rib. Dokazali smo, da se virus razmnožuje tako v celicah šarenke kot v celicah soške postrvi. Sklepamo, da se virus IHN razmnožuje tudi v celicah soške postrvi, zato lahko predvidevamo, da je soška postrv vsaj kratek čas lahko prenašalec virusa IHN in predstavlja vir okužbe za druge občutljive vrste rib.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Infekciозна hematopoetska nekroza postrvi (IHN) je akutno sistemsko virusno obolenje, ki se pojavlja pri prostoživečih, še pogosteje pa pri mladih salmonidnih vrstah rib v intenzivni vzreji.

Prvi zapisi o tej resni epizootiji segajo v pozna štirideseta in petdeseta leta prejšnjega stoletja (Rucker in sod., 1953). Bolezen se je najverjetneje s prometom okuženih iker in rib razširila v azijske države in Evropo. Poti vstopa virusa na geografsko območje Slovenije so neznane, najverjetneje pa izvirajo iz trgovanja z ribami iz ribogojnic nepreverjenega statusa iz sosednjih držav.

Zaradi posledično velike gospodarske škode, ki nastane v reji, okuženi z virusom IHN, v okviru programa EU postopnega izkoreninjenja bolezni sistematično spremljamo stanje te bolezni in izvajamo redne preglede v vseh plemenskih jatah postrvi in lipanov. Redni letni pregledi so potrebni tudi v ribogojnicah, ki trgujejo z ikrami ali živimi ribami.

Na okužbo z virusom IHN največkrat posumimo ob masovnih poginih rib (do 100 % pri mladich) z značilnimi kliničnimi znaki pri temperaturi vode med 8 °C in 15 °C. Nedavno okužbo z virusom IHN lahko v jati preživelih rib ob odsotnosti kliničnih znakov dokažemo s prisotnostjo nevtralizacijskih protiteles v serumu. Rezervoar virusa so bolne ribe, pri katerih so klinični znaki bolezni močno izraženi, in prikriti, asimptomatski prenašalci virusa IHN.

Cilj naše raziskave je bil preveriti naslednje hipoteze:

1. Slovenski izolati virusa IHN so genetsko homogeni.
2. Sorodnost med posameznimi izolati virusa IHN je povezana s prometom rib in iker med posameznimi ribogojnicami.
3. Metoda RT-PCR v realnem času je bolj občutljiva kot metoda izolacije virusa na celični kulturi.
4. Prisotnost okužbe z virusom IHN v določeni jati rib je mogoče dokazati tudi s serološkimi preiskavami (test virusne nevtralizacije) in ne le z virološkimi.

5. Soška postrv je odpornejša na okužbo z virusom IHN v primerjavi s šarenko in je lahko prenašalec virusne okužbe.

V prvem delu raziskave smo z izolacijo virusa na celični kulturi pregledali 1781 vzorcev, ki smo jih pridobili v obdobju 2005–2010.

Pri 51 vzorcih (2,9 %), pri katerih se je na celični kulturi pojavil CPE, smo z imunoperoksidaznim testom z uporabo specifičnih, mišjih monoklonskih protiteles, uperjenih proti nukleokapsidnemu proteinu virusa IHN, dokazali prisotnost virusnega antigena.

Virus IHN smo dokazali v 7 slovenskih regijah.

Z molekularno metodo RT-PCR smo pri vseh 51 pozitivnih vzorcih na virus IHN prisotnost virusne nukleinske kisline dokazovali s pomnoževanjem treh odsekov virusnega genoma (ORF1, ORF4 in ORF5). V raziskovalno delo smo vključili še 20 vzorcev pozitivnih na virus IHN, ki smo jih pridobili v obdobju 1997–2004.

Specifične produkte reakcije RT-PCR ustrezne velikosti (252 bp za ORF1, 532 bp za ORF4 in 714 bp za ORF5) smo uspešno dokazali z elektroforezo v agaroznem gelu.

Skupno število vzorcev pozitivnih na IHN, ki so bili vključeni v molekularne preiskave, je bilo 76. Dokazali smo jih v 11 slovenskih regijah. Največ okuženih ribogojnic je bilo na Gorenjskem (7) in v Savinjski regiji (6).

Rezultati klasične izolacije virusa na celični kulturi z imunoperoksidaznim testom in rezultati molekularne metode RT-PCR so se 100-odstotno ujemali.

Opravili smo primerjalno analizo nukleotidnih zaporedij »mid-G« regije ORF4. Vključili smo 17 nukleotidnih zaporedij slovenskih izolatov in 43 nukleotidnih zaporedij izolatov virusa IHN iz Avstrije, Nemčije, Italije, Francije, Severne Amerike in Japonske. S filogenetsko analizo variabilne »mid-G« regije smo ugotavljali sorodstvene odnose med slovenskimi izolati in evropskimi, severnoameriškimi ter japonskimi izolati IHN. Filogenetska analiza je pokazala, da se slovenski izolati v okviru glavnih genskih skupin U, M in L (Nichol in sod., 1995) uvrščajo v gensko skupino M, znotraj te pa so časovno in geografsko neodvisno razporejeni v dve genski podskupini, M-Eur1 in M-Eur2. Na nukleotidnem nivoju smo med slovenskimi izolati ugotovili od 97,7- do 100-odstotno ujemanje, na aminokislinskem nivoju pa celo od 98- do 100-odstotno, zato lahko zaključimo, da so slovenski izolati virusa IHN homogeni.

Z metodo RT-PCR v realnem času, ki smo jo uvedli v laboratorijsko diagnostiko bolezni IHN, lahko v kliničnih vzorcih hitro in specifično potrdimo prisotnost virusne nukleinske kisline. Z

specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondo MGB smo uspešno pomnožili del virusnega genoma ORF4.

Primerjava metod izolacije virusa na celični kulturi in RT-PCR v realnem času je pokazala, da sta metodi enako občutljivi.

V nadaljevanju dela smo primerjali dva kompleta za izolacijo celokupne RNA referenčnega izolata N61 in celokupne RNA iz kliničnih vzorcev. Izkupiček virusne RNA je bil po izolaciji s kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit večji kot po izolaciji virusne RNA z reagentom TRIzol[®]. Tudi učinkovitost reakcije je bila v primeru izolacije RNA s kompletom QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (0,998), ki smo jo ugotavljali s primerjavo standardnih krivulj, boljša od učinkovitosti reakcije, kjer smo RNA izolirali z reagentom TRIzol[®] (0,981).

S testom virusne nevtralizacije smo v klinično zdravi populaciji rib dokazali prisotnost nevtralizacijskih protiteles. Pregledali smo 197 serumskih vzorcev šarenk. Tako smo potrdili predhodno okužbo reje z virusom IHN. Prikriti prenašalci virusa IHN, ki jih s to metodo dokazujemo, predstavljajo neposreden vir okužbe za dovzetne vrste rib, predvsem v času drsti, ko se virus reaktivira. Nevtralizacijska protitelesa smo dokazovali v obdobju 2 let v 2 ribogojnicah (A in B), v katerih so leto poprej dokazali prisotnost virusa IHN. Titri protiteles so naraščali do 7. meseca po okužbi, ko smo jih v ribogojnici A dokazali pri več kot 70 % odvzetih vzorcev. Po enem letu smo protitelesa dokazali le še pri 42,86 % vzorcev (ribogojnica A). V reji B so bili titri nevtralizacijskih protiteles po 7. mesecih po okužbi še višji. Protitelesa smo v visokih titrih ($> 1 : 320$) dokazali kar pri 94,45 % vzorcev.

Ker virusa IHN do zdaj niso ugotovili pri avtohtoni soški postrvi, smo z biološkim poskusom proučevali in primerjali občutljivost šarenk in soških postrvi na okužbo z virusom IHN. Z metodo izolacije virusa na celični kulturi in molekularno metodo RT-PCR smo v vzorcih organov iz treh testnih skupin šarenk (A, B, in C) in treh testnih skupin soških postrvi (A, B in C) dokazovali prisotnost virusa IHN. Ocena statistične povezanosti pri dokazovanju virusa IHN z metodo IVCK je bila $\chi^2 = 71,452^{***}$ ali $p = 0,000$, pri dokazovanju virusa z metodo RT-PCR pa $\chi^2 = 19,847^{***}$ ali $p = 0,000$. Pri šarenkah je bil virus prisoten v večjem številu vzorcev. Zaključimo lahko, da so soške postrvi manj dovzetna vrsta rib za okužbo z virusom IHN.

Patohistološke spremembe v tkivnih rezinah šarenk in soških postrvi, okuženih z virusom IHN, in rezultat imunohistokemične reakcije na virusni antigen smo ocenili semikvantitativno. Virusni antigen smo pri šarenkah dokazali v več organih, medtem ko ga pri soški postrvi nismo dokazali.

Primarna celična kultura zelo dobro ponazarja dejansko stanje, funkcije in zveze med celicami v organizmu, zato smo z modificirano metodo eksplantov pripravili primarno celično kulturo srčnega tkiva šarenke in soške postrvi. Uporabili smo jo kot detekcijski *in vivo* model, s katerim smo dokazali, da se virus IHN razmnožuje tudi v celicah soške postrvi. Na osnovi teh rezultatov predvidevamo, da je tudi soška postrv vsaj kratek čas po izpostavitvi okužbi z virusom IHN lahko prenašalka virusa IHN.

7.2 SUMMARY

Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonid fish species is an acute systemic viral disease which affects wild fish, yet more frequently it affects rearing fry or juvenile rainbow trout in hatchery/fish farm.

First written records of this serious epizootic disease go back to the late forties and fifties of the previous century (Rucker et al., 1953). Disease was most probably spread by the export of contaminated fish eggs and adult fish from North America to Asia and Europe. The trail of virus entry in the geographical area of Slovenia is not known, the source most probably being fish trade of neighbouring countries hatchery of unknown status.

On account of consequently heavy economic loss that derives from IHN virus infected breeding (t.i. in fish farms where IHNV was found), in the range of the EU programme of eradication of IHNV disease, we systematically check the state of this disease and perform regular examination of all trout and grayling breeding flocks as well as regular annual examination of fish farms that trade with fish eggs or live fish.

The most often suspected consequence of IHNV infection is mass loss of fish (up to 100 % with fry having typical clinical signs, the water temperature being between 8 °C and 15 °C). Recent IHNV infection in the survivor fish lacking clinical signs can be proved by neutralising antibodies in fish serum. Reservoirs of IHNV are both, clinically infected fish with clinical signs of disease heavily expressed and covert carriers, t.i. antisymptomatic carriers of IHN virus.

The aim of our research was to check the following hypothesis:

1. Slovene IHNV isolates are genetically homogeneous.
2. Affinity between separate IHN virus isolates is connected with fish and fish eggs trade among different fish farms.
3. Real time RT-PCR method is more sensitive than method of virus isolation in cell culture.
4. The presence of IHN virus infection in a specific fish population is possible to be proven also by serological research (virus neutralization test), not only by virological research.
5. Marble trout is more resistant to IHNV infection than rainbow trout and can be the carrier of viral infection.

In the first part the of research in which we used the technique of virus isolation in cell culture, 1781 samples acquired in the period from 2005 to 2010 were examined.

In 51 sampels (2,9%), where CPE on cell line appeared, we performed immunoperoxidase assay using specific mouse monoclonal antibodies to detect N protein of IHNV, which proved the presence of viral antigen.

IHN virus was proved to exist in seven Slovenian regions.

Using molecular method RT-PCR, we detected the presence of viral nucleic acid in three genome regions (ORF1, ORF4 and ORF5) with all 51 positive samples to IHNV. In our research work we included another 20 IHNV positive samples acquired in the period from 1997 to 2004.

The whole number of positive samples on IHN virus that have been included into molecular research was 76. They have been proven to exist in 11 regions. Most of infected fish farms were in Upper Carniola (Gorenjska) (7) and in region of Savinja valley (6).

Specific PCR products of specific length (252 bp for ORF1, 532 bp for ORF4 and 714 bp for ORF5) were detected equally successfully and reliably using agarose gel electrophoresis in all different regions of IHN virus genome.

The results of classical technique of virus isolation in cell culture with the conformation method of IHN virus evidence followed by immuneperoxidase assay and results of RT-PCR molecular method corresponded 100%.

We performed comparative analysis of mid-G region nucleotide sequences in ORF4, 17 nucleotide sequences of Slovene IHNV isolates and 43 nucleotide sequences of Austrian, German, Italian, French, North American and Japanese IHNV isolates. The GeneBank sequence database with the data of all mentioned isolates has free access. With phylogenetic analysis of variable mid-G region the evolutionary relationship among Slovene and European and North Americann and Japanese isolates was examined. Our phylogenetic analysis revealed that Slovene isolates in the range of main genogroups U, M in L (Nichol et al., 1995) place in M genogroup, within which they clustered in two genetic subgroups, M-Eur1 in M-Eur2, time and geographically independent. Among Slovene isolates at the nucleotide level identity from 97,7% to 100 % was ascertained, at the aminoacid level even from 98% to 100%, which leads us to the conclusion that the Slovene IHN isolates are homogenous.

With real time RT-PCR method introduced in the laboratory diagnostics of IHNV specific viral RNA in clinical samples can be detected quickly and specifically. Using specific primers and MGB probe a part of the ORF4 viral genome was successfully detected.

With sensitivity comparison of two methods: virus isolation in cell culture vs. real- time RT-PCR method by the N61 reference isolate titration procedure the methods proved to be equally sensitive.

In the course of our work we compared two sets of isolates : N61 total RNA isolation and total RNA of clinical/field samples. Viral RNA yield after isolation of nucleic acids using commercial QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit in comparison to viral RNA isolation using reagent TRIzol[®] was larger. The efficiency of reaction in case of RNA isolation using commercial QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (0,998) based on standard curves comparison showed better results than viral RNA isolation using reagent TRIzol[®] (0,981).

With the neutralisation test the presence of neutralising antibodies in clinically healthy fish population was proved to exist. 197 rainbow trout sera was examined. Consequently, previous fish farm infection with IHN virus was confirmed. Covert carriers of IHNV confirmed by this method represent direct source of virus shedding, above all during spawning when virus reactivates. Neutralizing antibodies were proved to exist in the period of two years in two fish farms (A and B) in which IHN virus had been ascertained a year before. IHNV antibody titers were increasing till the seventh month after contamination when we confirmed their presence in more than 70% samples taken in fish farm A. After one year the antibodies were proved to exist only in 42,86 % samples (fish farm A). In B breeding were the neutralizing antibody titers after seven months of contamination even higher. High-titer antibodies (> 1:320) were confirmed in 94,45 % samples.

Due to the fact that IHN virus has not been proved to exist in autochthon marble trout till now, we studied and compared the susceptibility of rainbow trout and marble trout to IHNV infection using biological experiment. With the method of virus isolation in cell culture and real- time RT-PCR method we proved the presence of IHN virus in fish tissue samples of three test groups of rainbow trout (A,B, and C) and three test groups of marble trout (A,B and C). Statistical connection rate proving the existence of IHN virus by the method of virus isolation on cell culture was $\chi^2 = 71,452^{***}$ or $p = 0,000$, using the method RT-PCR it was $\chi^2 = 19,847^{***}$ or $p = 0,000$). Marble fish showed the presence of virus in higher number of samples. It can be concluded that marble trout is less susceptible species to IHN virus infection.

Pathohistological changes in rainbow trout and marble trout paraffin tissue sections infected with IHN virus and the result of immunohistochemical reaction on viral antigen was assessed as semiquantitative. While viral antigen in rainbow trout was proved to exist in larger organs, viral antigen was not proved to exist in marble trout.

Since primary cell culture perfectly shows actual state, t.i. functions and connections among cells in organism, we prepared primary cell culture of rainbow trout and marble trout heart tissue in our doctoral thesis using modified explant technique. It served as a detector, a vivo model, with which it was confirmed that virus IHN replicates in marble trout cells as well. On the basis of these results we can come to a conclusion that marble trout can be a carrier of IHN virus at least for a short time after the exposure to the IHN virus.

8 ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Hostniku za usmerjanje in potrpljenje skozi skupna raziskovalna leta. Zahvaljujem se vam za strokovno svetovanje in spodbudne besede pri nastajanju doktorskega dela. Tudi, če vesolje teži h kaosu, vaše tirnice ostajajo utečene, sigurne. Hvala za »raziskovalno« svobodo.

Somentorici prof. dr. Darji Barlič Maganja se zahvaljujem »za varno pot korakov« v molekularnem laboratoriju in strokovno pomoč ter svetovanje pri izdelavi naloge.

Hvala prof. dr. Jožetu Gromu za spodbudne besede in strokovne nasvete pri pisanju ter oblikovanju besedila disertacije. Predvsem pa vam hvala za ideje pri »nastajanju« primarne celične kulture.

Prof. dr. Jenčič Vlasti se zahvaljujem za vso podporo, ki mi jo je nudila skozi vsa leta »mladega raziskovalca«, me bodrila in bila vedno dosegljiva, ko sem pomoč najbolj potrebovala. Hvala, ker ste mi omogočili, da je doktorska naloga »ugledala luč sveta«.

Zahvaljujem se »mojim puncam in fantu« na virologiji. Darinka, Melita, Danijela, Natalija, Polona in Miha: hvala vam za vso pomoč, pozitivno energijo, pogovore in »življenjske nauke«. Vedno ste me spravili v dobro voljo, po potrebi potolažili, predvsem pa nikoli razočarali.

Urška in Urška: samo naravnost, pa nič se ne ustavlja, ...Konec se že vidi! Hvala za prijetno družbo v laboratoriju.

Tadej in Ivan – hvala za koristne nasvete in optimizem.

Adela in Sara – hvala vama za skupna leta na virologiji in rešitev, ponavadi »v zadnjem trenutku«.

Zahvaljujem se prof. Poloni Juntos in dr. Tanji Švara za pomoč pri »imunohistološkem delu« disertacije in strokovne popravke .

Hvala dr. Špeli Pezdevšek Malovrh, ki me je uvedla v svet statistike in mi pomagala pri analizi podatkov.

Dominika, hvala, da si me znala poslušati, blažiti moje napade slabe volje in me spravljati v smeh. Tvoja družba je neprecenljiva.

Predvsem pa velja največja, iskrena in osebna zahvala mojim najdražjim, predvsem Borutu. Ni besed, s katerimi bi se vam lahko zahvalila za vse, kar ste naredili zame. Brez vas mi ne bi nikoli uspelo. Hvala za besede tolažbe, vzpodbudo in oporo, ko je bilo najtežje.

9 VIRI

Aguirre-Ghiso JA, Liu D, Mignatti A, Kovalski K, Ossowski L (2001). Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERKMAPK to p38MAPK activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. *Mol Biol Cell* 12: 863-79.

Ahne W (1981). European reference strains for fish virology. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 1: 10-2.

Albrecht T, Boldogh I, Fons M, Lee C et al (1990). Cell-activation responses to cytomegalovirus infection. *Intervirology* 31: 68-75.

Amend DF (1970). Approved procedure for determining absence of infectious hematopoietic necrosis (IHN) in salmonid fishes. U.S. Dept of Interior, Fish and Wildlife Service, Leaflet 31, Washington: 4.

Amend DF (1973). Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout. Washington: University of Washington. PhD thesis.

Amend DF (1975). Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout. *J Wildl Dis* 11: 471-78.

Amend DF, Chambers VC (1970). Morphology of certain viruses of salmonid fishes. In vivo studies of infectious haematopoietic necrosis virus. *Journal of fisheries research board of Canada* 27: 1385-8.

Amend DF, Pietsch JP (1972). An improved method for isolating virus from asymptomatic carrier fish. *Trans Am Fish Soc* 101: 267-9.

Amend DF, Wood JW (1972). Survey for infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus in Washington salmonids. *Progress Fish Culturist* 34: 143-7.

Amend DF, Smith L (1974). Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHN virus. J Fish Res Board Can 31: 1371-8.

Amend DF, Yasutake W, Mead R (1969). A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. Trans Am Fish Soc 98: 796-804.

Ammayappan A, LaPatra SE, Vakharia VN (2010). Molecular characterization of the virulent infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strain 220-90. Virol J 7: 1-10.

Anderson ED, Mourich DV, Fahrenkrug S, Leong JC (1996). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. Mol Mar Biol Biotechnol 5: 114-22.

Anderson ED, Engelking HM, Emmenegger EJ, Kurath G (2000). Molecular epidemiology reveals emergence of a virulent IHN virus strain in wild salmon and transmission to hatchery fish. J Aquat Anim Health 12: 85–99.

Arakawa CK, Deering RE, Higman KH, Oshima KH, O'Hara PJ, Winton JR (1990). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus. Dis Aquat Organ 8: 165-70.

Banerjee AK, Barik S (1992). Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA. Virology 188: 417- 28.

Banicki JJ (2003). An alga a day keeps a doctor away- Engineered Algae as a New Means to Vaccinate Fish. NOAA's office of oceanic and atmospheric research. http://www.research.noaa.gov/spotlite/archive/spot_fishvaccine.html (28.1.2010).

Barja JL, Toranzo AE, Lemos ML, Hetrick FM (1983). Influence of water temperature and salinity on the survival of IPN and IHN viruses. Bull Eur Assoc Fish Pathol 3(4): 47-50.

Barlič-Maganja D, Štrancar M, Hostnik P, Jenčič V, Grom J (2002). Comparison of the efficiency and sensitivity of virus isolation and molecular methods for routine diagnosis of infectious haematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus.

J Fish Dis 25: 73-80.

Basurco B, Benmansour A (1995). Distant strains of the fish rhabdovirus VHSV maintain sixth functional cistron which codes for a nonstructural protein of unknown function. Virology 212: 741-45.

Batista U (2005). Gojenje sesalskih celic v in vitro pogojih. Ljubljana: Beletina, 13-17.

Batts WN, Traxler GS, Winton JR (1991). Factors affecting the efficiency of plating for selected fish rhabdoviruses. In: Fryer JL, ed. Proceedings- 2nd international symposium on viruses of lower vertebrates. Corvallis: Oregon State University, 17-24.

Bearzotti M, Delmas B, Lamoureux A, Loustau A-M, Chilmonczyk S, Bremont M (1999). Fish rhabdovirus cell entry is mediated by fibronectin. J Virol 73: 7703-9.

Berrebi P, Povž M, Jesenšek D, Cattaneo- Berrebi G, Crivelli AJ (2000). The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soča river, Slovenia.

Heredity 85: 277-87.

Benmansour A, Paubert G, Bernard J, de Kinkelin P (1994). The polymerase-associated protein (M1) and the matrix protein (M2) from a virulent and an avirulent strain of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. Virology 198:602-12.

[Bengtén E](#), [Strömberg S](#), [Pilström L](#) (1994). Immunoglobulin VH regions in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): their diversity and relationship to VH families from other species. [Dev Comp Immunol](#) 18: 109-22.

Bergmann S, Sandler O, Sberro H, Shnider S, Schejter E, Shilo BZ, Barkai N (2007). Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. PLoS Biol 5: e46.

Bernatchez L, Guyomard R, Bonhomme F (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. Mol Ecol 1: 161-73.

Bernatchez L, Osinov A (1995). Genetic diversity of trout (genus *Salmo*) from its most easter native range based on mitochondrial DNA and nuclear gene variation. *Mol Ecol* 4: 285-97.

Bernatchez L (2001). The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta*) inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55: 351-79.

Birge WJ, Black JA (1979). Effects of copper on embryonic and juvenile stage of aquatic animals. In: Nriagu JO, ed. *Copper in the environment*. New York: Wiley-Interscience, 373-99.

Bjorklund HV, Higman KH, Kurath G (1996). The glycoprotein genes and gene junctions of the fish rhabdoviruses spring viremia of carp virus and hirame rhabdovirus: analysis of relationships with other rhabdoviruses. *Vir Res* 42:65-80.

Black BL, Rhodes RB, McKenzie M, Lyles DS (1993). The role of vesicular stomatitis virus matrix protein inhibition of host-directed gene expression is genetically separable from its function in virus assembly. *J Virol* 67: 1716-25.

Bly JE, Clem WL (1992). Temperature and teleost immune function. *Fish Shellfish Immunol* 2: 159-71.

Bongso A, Richards M (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18: 827-42.

Bootland LM, Lorz HV, Rohovec JS, Leong JC (1994). Susceptibility of brook trout to infectious hematopoietic necrosis virus Types 1 and 2. *J Aquat Anim Health* 6: 144-8.

Bootland LM, Leong JC (1999). Infectious hematopoietic necrosis virus. In: Woo PTK, Bruno DW, eds. *Fish diseases and disorders*. Vol. 3: Viral, bacterial and fungal infection. Wallingford: CABI Publishing, 57-120.

Boudinot P, Blanco M, De Kinkelin P, Benmansour A (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus induces double-specific protective immunity and nonspecific responses in rainbow trout. *Virology* 249: 297-306.

Borghesan F, Schiavon E, Selli L et al (2004). Susceptibility of marble trout (*Salmo trutta marmoratus*) to viral haemorrhagic septicaemia and infectious haematopoietic necrosis: preliminary observations. *Ittiopatologia* 1: 5-14.

Bourhy H, Kissi B, Tordo N (1993). Molecular diversity of the Lyssavirus genus. *Virology* 194: 70-81.

Bovo G, Giorgetti G, Jorgensen PEV, Olesen NJ (1987). Infectious hematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 7: 124.

Bovo G, Ceschia G, Giorgetti G (1991). Infectious hematopoietic necrosis: situation after 3 years from the first outbreak in Italy. *Boll Soc Itali Patol Ittica* 5: 31-6.

Brattgjerd S, Evensen O (1996). A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in the head kidney phagocytes of experimentally infected Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Vet Pathol* 33: 55-65.

Brudeseth BE, Castric J, Evensen O (2002). Studies on pathogenesis following single and double infection with viral hemorrhagic septicemia virus and infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Pathol* 39: 180-9.

Burke J, Grischkowsky R (1984). An epizootic caused by infectious hematopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hidden Creek, Alaska. *J Fish Dis* 7: 421-9.

Busch RA (1983). Viral disease considerations in the commercial trout industry in Idaho. In: Leong JC, Barila TY, eds. *Proceedings of a Workshop on viral diseases of salmonid fishes in the Columbia River Basin, 1982*. Portland: Bonneville Power Administration, 84-100.

Butler M (2004). Animal cell culture and technology. Oxon: BIOS Scientific Publishers, 1-23.

Cain KD, LaPatra SE, Baldwin TJ, Shewmaker B et al (1996). Characterization of mucosal immunity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* challenged with infectious hematopoietic necrosis virus: identification of antiviral activity. Dis Aquat Organ 27: 161-72.

Carell A (1912). On the permanent life of tissues outside the organism.
J Exp Med 15: 516-28.

Carroll MC, Prodeus AP (1998). Linkages of innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol 10: 36-40.

Castillo C, Sanchez C, Dominguez J, Kaattari J, Villena A (1993). Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. Dev Comp Immunol 17: 419-24.

Chambers P, Millar NS, Platt SG, Emmerson PT (1986). Nucleotide sequence of the gene encoding the matrix protein of Newcastle disease virus. Nucleic Acid Res 14: 9051-61.

Chomysznski P, Sacchi N (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162: 156-9.

Chen SN, Kou GH, Hedrick RP, Fryer JL (1985). The occurrence of viral infections of fish in Taiwan. In: Ellis AE, ed. Fish and shellfish pathology. New York: Academic Press, 313-9.

Chen MF, Aikens CM, Fryer JL, Rohovec JS (1990). Virulence of four isolates of infectious hematopoietic necrosis virus in salmonid fishes and comparative replication in salmonid cell lines. California Fish Game 76: 137-45.

Chilmonczyk S, Voccia I, Monge D (1995). Pathogenesis of viral haemorrhagic septicaemia virus: cellular aspects. Vet Res 26: 505–511.

Chiou PP (1996). A molecular study of viral proteins in the pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis virus. Corvallis: Oregon State University. PhD thesis.

Chong LD, Rose JK (1994). Interaction of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids. J Virol 68: 441-7.

Coll JM (1995). The glycoprotein G of rhabdoviruses. Arch Virol 140: 827-51.

Corbel MJ (1975). The immune response in fish: a review. J Fish Biol 7: 539-63.

Coslett GD, Holloway BP, Obijeski JF (1980). The structural proteins of rabies virus and evidence for their synthesis from separate monocistronic RNA species. J Gen Virol 49: 161-80.

Craig R (1981). The theoretical possibility of reverse translation of proteins into genes. J Theor Biol 88: 757-60.

Crivelli A, Poizat G, Berrebi P, Jesenšek D, Rubin JF (2000). Conservation biology applied to fish: the example of a project for rehabilitating the marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. Cybium 24(3): 211-30.

Danneving BH, Lauve A, Press C, Landsverk T (1994). Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. Fish Shellfish Immunol 4: 3-18.

De Bishnu P, Banerjee AK (1999). Ungrouped mammalian, bird and fish rhabdoviruses. Granoff A, Webster RG, eds. In: Encyclopedia of virology, 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1541-4.

De Kinkelin P, Le Berre M (1979). Mass virus production in fish cell system. Dev Biol Stand 42: 99-104.

De las Heras AI, Rodriguez Saint Jean S, Perez-Prieto SI (2008). Salmonid fish viruses and cell interactions at early steps of the infective cycle. J Fish Dis 31: 535-46.

Dorson M, Torhy C (1993). Viral haemorrhagic septicaemia virus replication in external tissue excised from rainbow trout and hybrids of different susceptibilities. J Fish Dis 16: 403-8.

Direktiva Sveta 2006/88/ES z dne 24. oktobra 2006 o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz ribogojstva ter o preprečevanju in nadzoru nekaterih bolezni pri vodnih živalih. UL L 328: 15-56.

Dorson M, Torchy C, De Kinkelin P (1994). Viral haemorrhagic septicaemia virus multiplication and interferon production in rainbow trout x brook trout hybrids. Fish Shellfish Immunol 4: 369-81.

Dorson M, Quillet E, Hollebecq mg, Torhy C, Chevassus B (1995). Selection of rainbow trout resistant to viral haemorrhagic septicaemia virus and transmission of resistance by gynogenesis. Vet Res 26:361-8.

Dowling K, Mothersill C (1999). Use of rainbow trout primary epidermal cell cultures as an alternative to immortalized cell lines in toxicity assessment: a study with nonoxynol. Environ Toxicol Chem 18: 2846-50.

Dowling K, Mothersill C (2001). The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. Aquat Toxicol 53: 279-89.

Drolet BS, Rohovec JS, Leong JC (1994). The route of entry and progression of infectious hematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemic study. J Fish Dis 17: 337-47.

Drolet BS, Rohovec JS, Leong JC (1994). The route of entry and progression of infectious hematopoietic necrosis virus in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): a sequential immunohistochemical study. J Fish Dis 17: 337-47.

Drolet BS, Chiou PP, Heidel J, Leong JC (1995). Detection of truncated virus particles in a persistent RNA virus infection *in vivo*. J Virol 69: 2140-7.

Eaton WD, Hulett J, Brunson R, True K (1991). The first isolation in North America of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in coho salmon from the same watershed. J Aquat Anim Health 3: 114-7.

Ellis AE (1999). Immunity to bacteria in fish. *Fish Shellfish Immunol* 9:291-308.

Ellis AE (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25: 827-39.

Eigen M, McCaskill J, Schuster P (1989). 'The Molecular Quasi-species.'
Adv Chem Phys 75: 149-263.

Emmenegger EJ, Meyers TR, Burton TO, Kurath G (2000). Genetic diversity and epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus in Alaska.
Dis Aquat Organ 40:163–76.

Emmenegger EJ, Kurath G (2002). Genetic characterisation of infectious hematopoietic necrosis virus of costal salmonid stocks in Washington state. *J Aquat Anim Health* 14: 25–34.

Enzmann PJ, Dangschat H, Feneis B, Schmitt D, Wizigmann G, Schlotfeld HJ (1992). Demonstration of IHN virus in Germany. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 12: 185.

Enzmann PJ, Konrad M, Parey K (1993). VHS in wild living fish and experimental transmission of the virus. *Fisheris Res* 17: 153-61.

Enzmann PJ, Kurath G, Fichtner D, Bergmann SM (2005). Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European isolates from North American genogroup M.
Dis Aquat Organ 66:187-95.

Ertl HCJ, Dietzschold B, Gore M, Otvos L et al (1989). Induction of rabies virus-specific-T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J Virol* 63: 2233-43.

Espenes A, Press CM, Dannevig BH, Landsverk T (1995). Immune complex trapping in the splenic ellipsoid of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res* 282: 41-8.

Estes MK, Cohen J (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* 53: 410-49.

Fänge R, Mattison A (1981). The lymphoid (hemopoietic) system of the atlantic nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. Biol Bull 160: 240-9.

Fichtner D, Bergmann S, Enzmann P et al. (2000). Isolation and characterization of a variant strain of infectious haematopoietic necrosis (IHN) virus. Bull Eur Assoc Fish Pathol 20: 135-42.

Fijan N, Sulimanović D, Bearzotti M et al (1983). Some properties of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). Ann Inst Pasteur Virol 134E: 207-20.

Follett E, Meyers R, Burton TO, Geesin JL (1997). Comparative susceptibilities of salmonid species in Alaska to infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and North American viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV). J Aquat Anim Health 9: 34-40.

Fratnik Steyer A (2010). Neposredno dokazovanje ptičjih paramiksovirusov tipa 1. Ljubljana: Medicinska fakulteta. Doktorsko delo.

Fregeneda-Grandes JM, Olesen NJ (2007). Detection of rainbow trout antibodies against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) by neutralisation test is highly dependent on the virus isolate used. Dis Aquat Organ 74:151-8.

Freshney RI (2005). Culture of Animal Cells. Hoboken: John Wiley & Sons, 175-99.

Fumagalli L, Snoj A, Jesenšek D Balloux F et al (2002). Extreme genetic differentiation among the remnant populations of marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. Mol Ecol 12: 2711-6.

Gilmore RD, Engelking HM, Manning DS, Leong JC (1988). Expression in E. coli of an epitope on the glycoprotein of infectious hematopoietic necrosis virus protects against viral challenge. Biotechnology 6: 295-300.

Giuffra E, Bernatchez L, Guyomard R (1994). Mitochondrial control region and protein coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. Mol Ecol 3: 161-71.

Gonzalez R, Charlemagne J, Mahana W, Avrameas S (1988). Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. Immunology 63: 31-6.

Gonzalez-Laxe F (2004). Fisheries Governance. European Evaluation Society. 6th EES Conference, Berlin.

Gosting L, Mirando DM, Gould RW (1981). Antigen-binding cells in the peripheral blood of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* Walbaum, induced by immersion or intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum* bacterin. J Fish Biol 19: 83-86.

Grinde B, Jolles J, Jolles P (1988). Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Eur J Biochem 173: 269-73.

Groberg WJ (1983). The status of viral fish diseases in the Columbia River Basin. In: Leong JC, Barila T, eds. Proceedings of a Workshop on Viral Diseases of Salmonid Fishes in the Columbia River Basin, 1982. Portland: Bonneville Power Administration, 1-22.

Groberg WJ, Fryer JL (1983). Increased occurrence of infectious hematopoietic necrosis virus in fish at columbia river basin hatcheries: 1980–1982. Technical paper No. 6620. Corvallis: Oregon Agricultural Experimental Station, 7.

Haigler HT (1983). Receptor-mediated endocytosis of epidermal growth factor. Methods Enzymol 98: 283-90.

Hayashi S, Ooshiro Z (1986). Primary culture of the eel hepatocytes in the serum-free medium. Nippon Suisan Gakkaishi 52: 1641–51.

Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25: 585-621.

Harrison RG (1907). Observations on the living developing nerve fibre. Proc Soc Exp Biol Med 4: 140-3.

Hattenberger-Baudouy AM, Danton M, Merle G, Torchy C, de Kinkelin P (1989). Serological evidence for infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout from an outbreak in France. J Aquat Anim Health 1: 126-34.

Hattenberger-Baudouy AM, Danton M, Merle G, de Kinkelin (1995). Serum neutralization test for epidemiological studies of salmonid rhabdoviruses in France. Vet Res 26: 512-20.

Hedrick RP, LaPatra SE, Fryer JL, McDowell T, Wingfield WH (1987). Susceptibility of coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon hybrids to experimental infections with infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). Bull Eur Assoc Fish Pathol 7: 97-100.

Heinz FX, Allison SL (2003). Flavivirus structure and membrane fusion. Adv Virus Res 259: 63-97.

Herraez MP, Zapata AG (1986). Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. Vet Immunol Immunopathol 12: 117-26.

Hill BJ (1992). Impact of viral diseases of salmonid fish in the European community. In: Kimura T, ed. Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases. Sapporo: Hokkaido University Press, 48–59.

Hill BJ (2005). The need for effective disease control in international aquaculture. In: Midtlyng PJ, ed. Progress in fish vaccinology: developments in biological standardization. Basel: Karger, 3-12.

Hogan R J, Stuge TB, Clem LW, Miller NW, Chinchar VG (1996). Anti-viral cytotoxic cells in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Dev Comp Immunol 20: 115-127.

Holway JE, Smith CE (1973). Infectious hematopoietic necrosis of rainbow trout in Montana: a case report. J Wildl Dis 9: 287-90.

Hooper K (1987). IHN virus in Washington chum salmon. *Fish Health Newsl* 15:4.

Hordvik I, Thevarajan J, Semdal I et al (1999). Molecular cloning and phylogenetic analysis of the Atlantic salmon immunoglobulin D gene. *Scand J Immunol* 50: 202-10.

Hostnik P, Jenčič V (2000). Comparison of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolation on monolayers and in suspended cells. *Dis Aquat Organ* 40: 225-8.

Hostnik P, Barlič-Maganja D, Štrancar M, Jenčič V, Toplak I, Grom J (2002). Influence of storage temperature on infectious hematopoietic necrosis virus detection by cell culture isolation and RT-PCR methods. *Dis Aquat Organ* 52: 179-84.

Hsu YL, Engelking HM, Leong JC (1985). Analysis of the quantity and synthesis of the virion proteins of infectious hematopoietic necrosis virus. *Fish Pathol* 20: 331-8.

Hsu YL, Engelking HM, Leong JC (1986). Occurrence of different types of infectious hematopoietic necrosis virus in fish. *Appl Environ Microbiol* 52: 1353-61.

Ikeda Y, Kusuda R (1987). Studies on primary cell culture of eel leucocytes. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 523-7.

Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M (2003). Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the 'ancient fish'. *Mol Phylogenet Evol* 26(1): 110-20.

Imajoh M, Yagyu K, Oshima S (2003). Early interactions of marine birnavirus infection in several fish cell lines. *J Gen Virol* 84: 1809-16.

Jenčič V, Hostnik P (1998). Razširjenost virusnih bolezni postrvi v Sloveniji. *Vet Nov* 24: 285-91.

Jenčič V, Hostnik P, Barlič Maganja D, Grom J (2002). Razširjenost virusnih bolezni postrvi v Sloveniji. *Slov Vet Res* 39: 201-9.

Jensen LE, Hiney MP, Shields DC (1997). et al. Acute phase proteins in salmonids. J Immunol 158: 384-92.

[Johansson](#) T, [Einer-Jensen](#) K, [Batts](#) W, [Ahrens](#) P et al (2009). Genetic and serological typing of European infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) isolates. [Dis Aquat Organ](#) 86: 213-21.

Johansen LH, Sommer AI (1995). Multiplication of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in head kidney and blood leucocytes isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J Fish Dis 18: 147-56.

Jørgensen PEV, Olesen NJ, Lorenzen N, Winton JR, Ristow S (1991). Infectious hematopoietic necrosis virus: detection of humoral antibodies in rainbow trout by plaque neutralization, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assays. J Aquat Anim Health 3: 100-8.

Jug T (2002). Genetska raznolikost soške postrvi (*Salmo marmoratus*) v Sloveniji. Ljubljana: Medicinska fakulteta. Magistrsko delo.

Kaattari S, Irwin MJ (1985). Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. Dev Comp Immunol 9: 433-44.

Kim CH, Winton JR, Leong JC (1994). Neutralization-resistant variants of infectious hematopoietic necrosis virus have altered virulence and tissue tropism. J Virol 68: 8447-53.

Kim J L, Morgenstern KA, Lin C, Fox T **et al** (1996). Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A peptide. Cell 87: 343-55.

Kim CH, Dummer DM, Chiou PP, Leong JC (1999). Truncated particles produced in fish surviving infectious hematopoietic necrosis virus infection: mediators of persistence? J Virol 73: 843-49.

Kimura T, Awakura T (1977). Current status of disease of cultured salmonids in Hokkaido, Japan. In: Fryer JL, Landolt M, eds. Proceedings of the International Symposium on Disease of Cultured Salmonids. Washington: Washington University Press, 124-60.

Klontz GW, Yasutake WT, Parisot TJ (1965). Virus diseases of the Salmonidae in western United States. III. Immunopathological aspects. *Ann N Y Acad Sci* 126:531-42.

Knüsel R, Bergmann SM, Einer-Jensen K, Casey J, Segner H, Wahli T (2007). Virus isolation vs RT-PCR: which method is more successful in detecting VHSV and IHNV in fish tissue sampled under field conditions? *J Fish Dis* 30: 559-68.

Kolodziejek J, Schachner O, Durrwald R, Latif M and Nowotny N (2008). 'Mid-G' region sequences of the glycoprotein gene of austrian infectious hematopoietic necrosis virus isolates from two lineages within european isolates and are distinct from american and asian lineages. *J Clin Microbiol* 46: 22-30.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A et al (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.

Kottelat M (1997). European freshwater fishes. *Biologia* 52: 124-56.

Kurath G, Leong JC (1985). Characterization of infectious hematopoietic necrosis virus mRNA species reveals a nonvirion rhabdovirus protein. *J Virol* 53: 462-8.

Kurath G, Higman KH, Bjorklund HV (1997). Distribution and variation of NV genes in fish rhabdoviruses. *J Gen Virol* 78: 113-7.

Kurath G, Garver KA, Troyer RM, Emmenegger EJ, Einer-Jensen K, Anderson ED (2003). Phylogeography of infectious haematopoietic necrosis virus in North America. *J Gen Virol* 84: 803-14.

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A et al (2000). 3'- minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* 28: 655-61.

Kuznar J, Soler M, Farias G, Espinoza JC (1995). Attachment and entry of infectious pancreatic virus into CHSE-214 cells. Arch Virol 140: 1833-40.

Laikre L, Antunes A, Apostolidis A et al (1999). Conservation genetic management of brown trout (*Salmo trutta*) in Europe. Reported by the Concerted action on identification, management and exploitation of genetic resources in the brown trout (*Salmo trutta*). Silkeborg: Danmarks fiskeriundersøgelser, 91.

Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X (2003). Visualizing infection of individual influenza viruses. Proc Natl Acad Sci USA 100: 9280-5.

LaPatra SE, Groberg WJ (1985). Delayed appearance of IHNV instored summer steelhead eggs. Fish Health Newsl 13: 3.

LaPatra SE, Fryer JL (1990). Susceptibility of brown trout (*Salmo salar*) to infectious hematopoietic necrosis virus. Bull Eur Assoc Fish Pathol 10: 125-7.

LaPatra SE, Fryer JL, Wingfield WH, Hedrick RP (1989). Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in coho salmon. J Aquat Anim Health 1: 277-80.

LaPatra SE, Groberg WJ, Rohovec JS, Fryer JL (1990). The delayed appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in steelhead trout (*Salmo gairdneri*). In: Ahne W, Kurstak E, eds. Viruses of lower vertebrates. Berlin: Springer-Verlag, 430-41.

LaPatra SE, Parsons JE, Jones GR, McRoberts WO (1993). Early life stage survival and susceptibility of brook trout, coho salmon, rainbow trout and their reciprocal hybrids to infectious hematopoietic necrosis virus. J Aquat Anim Health 5: 270-4.

LaPatra SE, Lauda KA, Jones GR, Shewmaker WS, Bayne CJ (1998). Resistance to IHN virus infection in rainbow trout is increased by glucan while subsequent production of serum neutralizing activity is decreased. Fish Shellfish Immunol 8: 435-46.

Laurencin FB (1987). IHN in France. Bull Eur Assoc Fish Pathol 7: 104.

Leong JC, Kurath G (2001). Novirhabdovirus: *Rhabdoviridae*. Tidona CA, Darai G, eds. In: The Springer Index of viruses. Berlin: Springer, 1067-73.

Leong JC, Fendrick JL, Youngman S, Lee A (1981). Effect of polybrene on the infectivity of infectious hematopoietic necrosis virus in tissue culture. J Fish Dis 4: 335-44.

Leong JC, Hsu YL, Engelking HM, Fendrick JL, Durrin LK, Kurath G (1983). Methods for diagnosing IHNV infection in fish. In: Leong JC, Barila T, eds. Proceedings of a workshop on viral diseases of salmonid fishes in the Columbia River Basin, 1982. Portland: Bonneville Power Administration, 23-47.

Lobb CJ, Clem LW (1981). Phylogeny of immunoglobulin structure and function-X. Humoral immunoglobulins of the sheepshead, *Archosargus probatocephalus*. Dev Comp Immunol 5: 271-82.

Logan MJ (2009). Real-time PCR: current technology and applications. Norfolk: Caister Academic Press, 1-284.

Lorenzen N, Olesen NJ, Koch C (1999). Immunity to VHS virus in rainbow trout. Aquaculture 172: 41-61.

Lyons Alacantara M, Tarazona JV, Mothersill C (1996). The differential effects of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. Cell Biol Toxicol 12: 29-38.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002). Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res 30: 1292-305.

Mackay IM (2007). Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization. Norfolk: Caister Academic Press, 1-454.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J (2000). Brock biology of microorganisms. 9th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 272-75.

Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bøgwald J, Dalmo RA (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol* 19: 429-39.

Magnadottir B (2006). Innate immunity of fish: overview.
Fish Shellfish Immunol 20: 137-51.

Manning MJ, Nakanishi T (1996). The specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T, eds. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. San Diego: Academic Press, 160-206.

Matras M, Antychowicz J, Reichert M (2006). Pathogenicity of VHS, IHN and IPN viruses for pathogen free rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry.
Bull Vet Inst Pulawy 50: 299-304.

McAllister PE, Wagner RR (1975). Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses.
J Virol 15: 733–8.

McSweeney JA (1998). Investigation of the effects of Nockle on the growth and survival of primary cells and immortalised cell lines of human and teleost cell lines. Dublin: University of Dublin. PhD Thesis.

Medzhitov R, Janeway CA Jr (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9: 4–9.

Meseguer J, López-Ruiz A, García-Ayala A (1995). Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L): an ultrastructural and cytochemical study. *Anat Rec* 241: 303-9.

Miller TA, Rapp J, Wastlhuber U, Hoffmann RW, Enzmann PJ (1998). Rapid and sensitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction based detection and differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses in organ samples and cultured cells.
Dis Aquat Organ 34: 13–20.

Miller KM, Winton JR, Schulze AD, Purcell MK, Ming TJ (2004). Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus. *Environ Biol Fish* 69: 307–16.

Miller K, Traxler G, Kaukinen K, Li S, Richard J, Ginther N (2007). Salmonid host response to infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus: cellular receptors, viral control, and novel pathways of defence. *Aquaculture* 272: 217-37.

Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB et al (2003). Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 26(1): 121-38.

Monaghan E, Gueorguiev V, Wilkins-Port C, McKeown-Longo PJ (2004). The receptor for urokinase-type plasminogen activator regulates fibronectin matrix assembly in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 1400-7.

Monath TP, Heinz FX (1996). Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*, 3rd edn. New York: Lippincott Raven Publishers, 961-1034.

Morzunov SP, Winton JR, Nichol ST (1995). The complete genome structure and phylogenetic relationship of infectious hematopoietic necrosis virus. *Virus Res* 38: 175–92.

Mulcahy D, Bauersfeld K (1983). Effect of loading density of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), eggs in incubation boxes on mortality caused by infectious hematopoietic necrosis. *J Fish Dis* 6: 189-93.

Mulcahy D, Jenes CK, Pascho R (1984). Appearance and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in female sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) during their spawning migration. *Arch Virol* 80: 171-81.

Mulcahy D, Pascho RJ (1985). Vertical transmission of infectious haematopoietic necrosis virus in sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum): isolation of virus from dead eggs and fry. *J Fish Dis* 8: 393-396.

Mulcahy DM, Pascho RJ (1986). Sequential tests for infectious hematopoietic necrosis virus in individuals and populations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).
Can J Fish Aquat Sci 43: 2515-19.

Mulcahy D, Wood J (1986). A natural epizootic of infectious haematopoietic necrosis in imported Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the enzootic region. J Fish Dis 9: 173-75.

Mulcahy DM, Batts WN (1987). Infectious hematopoietic necrosis virus detected by separation and incubation of cells from salmonid cavity fluid.
Can J Fish Aquat Sci 44: 1071-5.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, JarvisAW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (1995). Part I: Introduction to the universal system of virus taxonomy. In: Murphy FA, eds. Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. NewYork: Springer, 1-13.

Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ (1999). Veterinary virology. 3^{ed} ed. San Diego: Academic Press, 405-9, 429-44.

Nahm MH, Kroese FGH, Hoffmann JW (1992). The evolution of immune memory and germinal centres. Immunol Today 13: 438-40.

Nelson JS (1984). Fishes of the world, 3rd edition. New York: Wiley & Sons.

Nichol ST, Rowe JE, Winton JR (1995). Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus. Virus Res 38: 159–73.

Nicholson BL (1982). Infectious hematopoietic necrosis (IHN). In: Anderson DP, Dorson M, Dubourget P, eds. Antigens of fish pathogens: development and production for vaccines and serodiagnostics. Lyon: Association Corporative des Etudisnts en Médecine de Lyon, 63-79.

Nishizawa T, Kinoshita S, Kim WS, Higashi S, Yoshimizu M (2006). Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis Aquat Organ* 71: 267–72.

Niu L, Zhao Z (1988). The epidemiological IHN and IPN of rainbow trout in northeast China. *J Fish in China* 12: 351-2.

Noga EJ (1996). *Fish disease- diagnosis and treatment*. St. Louis: Mosby, 211-5.

Northwest Alliance for Computational Science & Engineering.

<http://www.nacse.org/home/news/> (28.1.2010).

Odredba o izvajanju preventivnih cepljenj in diagnostičnih ter drugih preiskav v letu 2009 (2009). *Ur List RS* 67 (7): 16441-5.

Ogden JR, Ranajit R, Wagner RR (1986). Mapping regions of the matrix protein of vesicular stomatitis virus which bind to ribonucleocapsids, liposomes and monoclonal antibodies. *J Virol* 58: 860-8.

OIE (2009). *Manual of diagnostic tests for aquatic animals*. 5th ed. Paris: Office International des Epizooties, 209-21.

Ogut H, Reno P, Sampson D (2004). A deterministic model for the dynamics of furunculosis in Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Dis Aquat Organ*, 62: 57–73.

Ormonde P (1995). Characterization of the matrix proteins of the fish rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus. Corvallis: Oregon State University. MSc thesis.

Oshima SI, Hata JI, Segawa C, Yamashita S (1996). Mother to fry, successful transfer of immunity against infectious haematopoietic necrosis virus infection in rainbow trout. *J Gen Virol* 77: 2441- 5.

Ostrander GK (2000). Cell and tissue culture. In Ostrander GK, ed. *The laboratory fish*. London: Academic Press, 631-49.

Overturf K, LaPatra S, Powell M (2001). Real-time PCR for the detection and quantitative analysis of IHNV in salmonids. J Fish Dis 24: 325-33.

Parisot TJ, Pelnar J (1962). An interim report on Sacramento River chinook disease: a virus like disease of chinook salmon. Prog Fish Cult 24: 51-5.

Park MA, Sohn SG, Lee SD, et al (1993). Infectious haematopoietic necrosis virus from salmonids in Korea. J Fish Dis 16: 471-8.

Pastoret PP, Brochier B (1998). Epidemiology and elimination of rabies in western Europe. Vet J 156: 83-90.

Phillips RB, Oakley TH (1997). Phylogenetic relationships among the Salmoninae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. In: Kocher TD, Stepien CA, eds. Molecular systematics of fishes. San Diego: Academic Press, 145-61.

Pietsch JP, Amend DF, Miller CM (1977). Survival of infectious hematopoietic necrosis virus held under various conditions. J Fish Res Board Can 34: 1360-4.

Pilcher KS, Fryer JL (1980a). The viral diseases of fish: a review through 1978. Part 1: Diseases of proven viral etiology. CRC Crit Rev Microbiol 7: 287-363.

Pilcher KS, Fryer JL (1980b). The viral diseases of fish: a review through 1978. Part 2: Diseases in which a viral etiology is suspected but unproven. CRC Crit Rev Microbiol 8: 1-24.

Pilstrom L, Bengten E (1996). Immunoglobulin in fish- genes, expression and structure. Fish Shellfish Immunol 6: 243-62.

Povž M, Sket B (1990). Naše sladkovodne ribe. Ljubljana: Mladinska knjiga, 84-105.

Povž M, Jesenšek D, Berrebi P, Crivelli AJ (1996). Soška postrv (*Salmo trutta marmoratus* Cuvier 1817): v porečju Soče v Sloveniji: varstveni načrt. Arles: Tour du Valat, 9-20, 45-8.

Povž M, Šumer S, Budihna N (1998). Ribe in raki Pokolpja: razširjenost, biologija in ekologija sladkovodnih rib ter naravovarstvene smernice. Ljubljana: i2, 33-6.

Powell DS (2000). Immune system. In: Ostrander GK, ed. The laboratory fish. San Diego: Academic Press, 441-9.

Pravilnik o boleznih živali (2007). Ur List RS 17 (81): e10096-143.

Pravilnik o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz akvakulture ter o preprečevanju in nadzoru določenih bolezni vodnih živali (2008).
Ur List RS 18 (54): e5786-94.

Pravilnik o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz akvakulture ter o preprečevanju in nadzoru določenih bolezni vodnih živali (2008).
Ur List RS 18 (61): e8175.

Press CM, Evensen Ø (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish Shellfish Immunol 9: 309-18.

Purcell MK, Hart SA, Kurath G, Winton JR (2006). Strand-specific, real-time RT-PCR assays for quantification of genomic and positive-sense RNAs of the fish rhabdovirus, infectious hematopoietic necrosis virus. J Virol Methods 132: 18-24.

Ramos-Vara JA (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol 42: 405-26.

Ramos-Vara JA, Kiupel M, Baszler T et al (2008). Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. J Vet Diagn Invest 20: 393–413.

Reed LJ, Muench H (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 27: 493-7.

Ribiška družina Tolmin. <http://www.ribiska-druzina-tolmin.si/ribe.php> (4.2.2011).

Richman RA, Claus TH, Pilakis SJ, Friedman DL (1976). Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. Proc Natl Acad Sci 73: 3589-93.

Ristow SS, de Avila J, LaPatra SE, Lauda K (1993). Detection and characterization of rainbow trout antibody against infectious hematopoietic necrosis virus. Dis Aquat Organ 15: 109-14.

Rodriguez MF, LaPatra S, Williams S, Famula T, May B (2004). Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow and steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. Aquaculture 241: 93-115.

Ross AJ, Pelnar J, Rucker RR (1960). A virus-like disease of chinook salmon. Trans Am Fish Soc 89: 160-3.

Rose JL, Gallione CJ (1981). Nucleotide sequence of the mrnas encoding the vesicular stomatitis virus G and M proteins determined from cdna clones containing the complete coding regions. J Virol 39: 519-28.

Rucker RR, Whipple WJ, Parvin JR, Evans CA (1953). A contagious disease of salmon possibly of virus origin. Fish Bull 54 (76): 35-46.

Sano T, Nishimura T, Okamoto N, Yamazaki T, Hanada H, Watanabe Y (1977). Studies on viral diseases of Japanese fish-VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan. J Tokyo Univ Fish 63: 81-5.

Scapigliati G, Meloni S, Mazzini M (1999). A monoclonal antibody against chorion proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): studies of chorion precursors and applicability in immunoassays. Biol Reprod 60: 783-9.

Schluter SF, Bernstein RM, Bernstein H, Marchalonis JJ (1999). 'Big Bang' emergence of the combinatorial immune system. Dev Comp Immunol 23:107-11.

Schütze H, Enzmann PJ, Kuchling R, Mundt E, Niemann H, Mettenleiter TC (1995). Complete genomic sequence of the fish rhabdovirus infectious haematopoietic necrosis virus. J Gen Virol 76: 2519-27.

Schütze H, Enzmann PJ, Mundt E, Mettenleiter TC (1996). Identification of the non-virion (NV) protein of fish rhabdoviruses viral haemorrhagic septicaemia virus and infectious haematopoietic necrosis virus. J Gen Virol 77: 1259-63.

Secombes CJ (1996). The non-specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T, eds. The fish immune system: organism, pathogen, and environment. Sydney: Academic Press, 63-103.

Secombes CJ, van Groningen JJ, van Muiswinkel WB, Egberts E (1983). Ontogeny of the immune system in carp (*Cyprinus carpio* L.). The appearance of antigenic determinants on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. Dev Comp Immunol 7: 455-64.

Secombes CJ, Zou J, Laing KJ, Daniels GD, Cunningham C (1999). Cytokine genes in fish. Aquaculture 172: 93-102.

Seničar M (2002). Ocena epizootiološkega stanja virusne hemoragične septikemije (VHS) in infekcijske hematopoetske nekroze (IHN) pri posztveh v Sloveniji. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. Magistrsko delo.

Skaala O, Solberg G (1997). Biochemical genetic variability and taxonomy of a marmorated salmonid in river Otra, Norway. Nordic J Freshw Res 73: 3-12.

Spiropoulou CF, Nichol ST (1993). A small highly basic protein is encoded in an overlapping frame within the P gene of vesicular stomatitis virus. J Virol 67: 3103-10.

Statistični urad Republike Slovenije. <http://www.stat.si/> (28.1.2010).

Stearley RF, Smith GR (1993). Phylogeny of the pacific trout and salmons (*Oncorhynchus*) and genera of the family Salmonidae. Trans Am Fish Soc 122: 1-33.

St-Hilaire S, Ribble CS, LaPatra SE, Chartrand S, Kent ML (2001). Infectious hematopoietic necrosis virus antibody profiles in naturally and experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*. Dis Aquat Organ 46: 7-14.

Swiss Institute of Bioinformatics. Viralzone.

http://expasy.org/viralzone/all_by_species/76.html (28.1.2010).

Štrancar M (2000). Molekularna diagnostika aktualnih virusnih obolenj pri salmonidnih vrstah rib. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. Magistrsko delo.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-9.

Thoulouze MI, Bouguyon E, Carpentier C, Brémont M (2004). Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout. *J Virol* 78: 4098–107.

Tort L, Balasch JC, Mackenzie S (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia* 22: 277-86.

Trede NS, Zon LI (1998). Development of T-cells during fish embryogenesis. *Dev Comp Immunol* 22: 253-63.

Traxler GS (1986). An epizootic of infectious hematopoietic necrosis in 2-year-old kokanee, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum) at Lake Cowichan, British Columbia. *J Fish Dis* 9: 545-9.

Traxler GS, Roome JR, Kent ML (1993) Transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in salt water. *Dis Aquat Organ* 16: 111-4.

Traxler GS, Roome JR, Lauda KA, LaPatra S (1997). Appearance of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and neutralizing antibodies in sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* during their migration and maturation period. *Dis Aquat Organ* 28: 31-8.

Troyer RM, Kurath G (2003). Molecular epidemiology of infectious hematopoietic necrosis virus reveals complex virus traffic and evolution within southern Idaho aquaculture. *Dis Aquat Organ* 55: 175-85.

Troyer RM, LaPatra SE, Kurath G (2000). Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture.

J Gen Virol 81: 2823-32.

Trump BF, Berezsky IK (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. FASEB J 9: 219-28.

Tsujii T, Seno S (1990). Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function.

Anat Rec 226: 460-70.

USGS Western Fisheries Research Center.

<http://wfrc.usgs.gov/fieldstations/hq/ihn.html> (28.1.2010).

Verlhac V, Kiron V (2004). Nutrition and immune modulation in aquatic animals.

Aqua Feeds [1](#): 5-9.

Vestergaard Jorgensen PE, Olesen NJ, Lorenzen N (1991). Infectious hematopoietic necrosis (IHN) and viral hemorrhagic septicaemia (VHS): detection of trout antibodies to the causative viruses by means of plaque neutralisation, immunofluorescence, and enzyme-linked immunosorbent assay. J Aquat Anim Health 3: 100-8.

Vozelj M (2000). Temelji imunologije. Ljubljana, Državna založba Slovenije, 47-74, 137-175, 197-212.

Walker PJ, Benmansour A, Calisher CH et al (2000). In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, eds. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.

San Diego: Academic Press, 563-83.

Watts M, Munday BL, Burke CM (2001): Immune responses of teleost fish.

Aust Vet J 79: 570-4.

Watson SW, Guenther RW, Rucker RR (1954). A virus disease of sockeye salmon, interim report. US Fish Wildl Serv Spec Sci Rep Fish 138: 1-36.

Wingfield WH (1968). Characterization of the Oregon Sockeye Salmon Virus. Corvallis: Oregon State University. PhD thesis.

Wingfield WH, Fryer JL, Pilcher KS (1969). Properties of the sockeye salmon virus (Oregon strain). Proc Soc Exp Biol Med 130: 1055-9.

Wingfield WH, Chan LD (1970). Studies on the Sacramento river chinook disease and its causative agent. In: Snieszko SF, ed. A Symposium on diseases of fish and shellfish. Washington: American Fisheries Society, 307-18.

Wingfield WH, Nims L, Fryer JL, Pilcher KS (1970). Species specificity of the sockeye salmon virus (Oregon strain) and its cytopathic effects in salmonid cell lines. In: Snieszko SF, ed. A Symposium on diseases of fish and shellfish. Washington: American Fisheries Society, 319-26.

Winton JR (1991). Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. Annu Rev Fish Dis 1: 83-93.

Winton JR, Einer-Jensen K (2010). Molecular diagnosis of infectious hematopoietic necrosis and viral hemorrhagic septicemia. In: Cunningham CO, ed. Molecular diagnosis of salmonid diseases. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 49-78.

Wolf K (1988). Infectious hematopoietic necrosis. In: Wolf K, ed. Fish viruses and fish viral diseases. New York: Cornell University Press, 83-114.

Wolf K, Quimby MC (1962). Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science 135: 1065-6.

Wood EM, Yasutake WT (1956). Histopathologic changes of a virus-like disease of sockeye salmon. Trans Am Microsc Soc 75: 85-90.

Xiaohui Z, Chandra S, Andrew JR, Morrison GH (1995). Golgi apparatus is involved in intracellular Ca^{2+} regulation in epithelial LLC-PK1 cells. *Am J Physiol* 268: C1133-40.

Yamamoto T, Clermont TJ (1990). Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: organ assay and electron microscopy. *J Aquat Anim Health* 2: 261-70.

Yamamoto T, Arakawa CK, Batts WN, Winton JR (1989). Comparison of infectious hematopoietic necrosis in natural and experimental infections of spawning salmonids by infectivity and immunohistochemistry. In: Ahne W, Kurstak E, eds. *Viruses of lower vertebrates*. Berlin: Springer-Verlag, 411-29.

Yamamoto T, Batts WN, Arakawa CK, Winton JR (1990). Multiplication of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout following immersion infection: whole-body assay and immunohistochemistry. *J Aquat Anim Health* 2: 271-80.

Yamamoto T, Batts WN, Winton JR (1992). In vitro infection of salmonid epidermal tissues by infectious hematopoietic necrosis virus and viral hemorrhagic septicemia virus. *J Aquat Anim Health* 4: 231-39.

Yano T (1996). The nonspecific immune system: humoral defense. In: Iwama G, Nakanishi T, eds. *The fish immune system, organism, pathogen and environment*. Sydney: Academic Press, 105-57.

Yasutake WT (1970). Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. In: Snieszko SF, ed. *A Symposium on diseases of fish and shellfish*. Washington: American Fisheries Society, 341-50.

Yasutake WT, Amend DF (1972). Some aspects of pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis (IHN). *J Fish Biol* 4: 261-4.

Yasutake WT (1978). Histopathology of yearling sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) infected with infectious hematopoietic necrosis (IHN). *Fish Pathol* 14: 59-64.

Yousif AN, Albright LJ, Evelyn TPT (1991). Occurrence of lysozyme in the eggs of coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Dis Aquat Organ* 10: 45-9.

Zapata AG, Chibá A, Varas A (1996). Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama G, Nakanishi T, eds. *The fish immune system: organism, pathogen and environment*. San Diego: Academic Press, 1-62.

Zhao Z, Niu L (1994). Isolation and preliminary study of a rhabdovirus from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Benxi, China. *Acta Hydrobiol* 18: 348-53.

10 PRILOGE

Priloga A: Izvirni znanstveni članek, ki je bil objavljen v reviji *European Association of Fish Pathologists* (Bull Eur Ass Fish Pathol), 31(2) 2011, 47-57.