

Veiledning for uttak og innsending av prøver til realtime RT-PCR

For prøveuttak til realtime RT-PCR anbefales det å ha følgende utstyr tilgjengelig:

- For rognvæske/melke: barkoderør med RLT-buffer fra PHARMAQ Analytiq
- For yngel/vev: barkoderør med RNAlater fra PHARMAQ Analytiq
- Isoporeske
- Kjøleelement
- Pinsett og skalpell
- Rent underlag for å trimme vevsbiter
- Gassbrenner
- Tørkepapir

Medfulgt i pakken med PHARMAQ Analytiq barkoderør er skjema for bestilling av analyser. Vi anbefaler at skjemaet for prøveuttaket utfylles fortløpende ettersom prøvene tas.

Det oppfordres til å registrere alle prøver elektronisk før forsendelse.

Oversikt over agens og anbefalt vev

Virus	Vev	Bakterier	Vev	Parasitter	Vev
Piscine Myokardittvirus (PMCV)	Hjerte, Rognvæske, Melke	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	Nyre, Gjelle	Paramoeba perurans	Gjelle
Piscine Orthoreovirus (PRV)	Hjerte, Rognvæske, Melke	<i>Yersinia ruckeri</i>	Nyre	Paranucleospora theridion	Gjelle
Salmon Gill Poxvirus (SGPV)	Gjelle	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Nyre, Rognvæske, Melke	Parvicapsula pseduobranchicola	Gjelle
Infeksiøs Pankreas Nekrose Virus (IPNV)	Nyre, Rognvæske, Melke	<i>Piscirickettsia salmonis</i>	Nyre	Ichtyobodo sp.* (Costia)	Gjelle
Pancreas Disease Virus* (SAV)	Hjerte	<i>Branchiomonas cysticola</i>	Gjelle	Nucleospora cyclopteri	Gjelle, Nyre
Infeksiøs Lakseanemi virus (ILAV)	Hjerte, Rognvæske, Melke	<i>Clavochlamydia salmonicola</i>	Gjelle		
Viral Hemoragisk Septikemi virus (VHSV)	Nyre	<i>Moritella viscosa*</i>	Sår Nyre		
Nodavirus (VNN)	Nyre, CNS, Rognvæske, Melke	<i>Pasteurella sp.</i>	Nyre		
Infeksiøs hematopoetisk nekrose virus (IHNV)	Nyre	<i>Aeromonas salmonicida*</i>	Nyre		
Kveitereovirus	Lever Nyre	<i>Tenacibaculum sp.</i>	Sår Nyre		
Lumpfish Flavi Virus (LFV)	Nyre /Lever, Melke, Rognvæske	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Sår, Nyre, Gjelle		
Cyclopterus lumpus Coronavirus (CluCV)	Nyre, Melke, Rognvæske	Trippelanalyse for <i>Vibrio anguillarum</i> - analyse for O1, O2α og universell (alle kjente varianter av bakterien)	Nyre		
Cyclopterus lumpus Totivirus (CluTV)	Nyre, Melke, Rognvæske	<i>Vibrio anguillarum</i> O1	Nyre		
		<i>Vibrio anguillarum</i> O2α	Nyre		
		<i>Francisella philomiragia ssp. noatuensis</i>	Nyre		

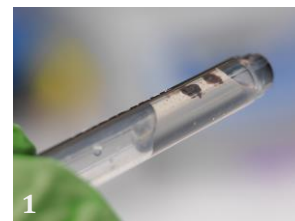
***mulighet for subtyping**

Veiledning for uttak av prøver for settefisk og matfisk:

Uttak av prøver til real-time RT-PCR-analyser skal utføres med sterilteknikk for å unngå kontaminering av prøvene.

- Bruk papir for å fjerne vevsrester fra skalpellbladet
- Bruk gassbrenner for å sterilisere skalpellbladet og pinsetten mellom forskjellige fisk og vev
- Bruk gjerne den sterile innsiden av skalpellpapiret for å trimme vevsbiter
- Prøver av hodenyre og hjerte bør være i minst mulig kontakt med bukhulen

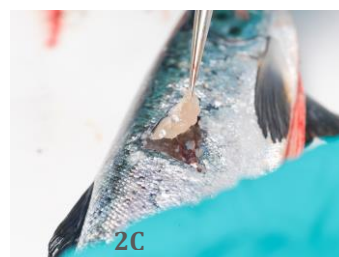
Prøvene skal være på størrelse med et fyrstikkhode, 2x2x2mm. Det er viktig at vevsprøvene er dekket av væsken i rørene (1).



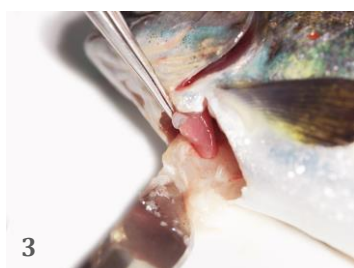
PLOMMESEKKYNGEL: Legges hel på prøverør med RNAlater.
STØRRE YNGEL: Hode kappes bak gjellelokk og deles eventuelt i to før det legges på rør med RNA-later. Få med gjeller, hjerte og nyrer.

SETTEFISK / MATFISK:

01. Gjelle (2. gjellebue)/hudprøver tas først (2A, 2B og 2C)
02. Skjær ut vevet med steril skalpell. Legg vevsbiten på et sterilt underlag og del vevet i 2 like store biter (A- og B-prøve). Legg begge vevsbitene i samme rør med RNAlater



03. Brenn av pinsett og skalpell før en skjærer inn i hjertehulen. Bruk pinsetten til å ta tak i bulbus (hvit forlengelse av hjerte) og skjær løs hjertet (3)
04. Legg hjertet på sterilt underlag og skjær hjertespiessen i 2 deler. Legg begge vevsbitene i ett nytt rør med RNAlater
05. Tørk av vevsrester fra skalpellbladet og brenn av med gassbrenner før en skjærer inn i bukhulen (4)
06. Nyreprøven tas ved å først fjerne svømmeblæren, uten å skjære inn i nyren. Brenn av skalpell og pinsett før en skjærer inn i hodenyren. Skjær ut en firkant av hodenyren og del vevsbiten på et sterilt underlag. Legg begge vevsbitene i et nytt rør med RNAlater (5)





07. Etter man er ferdig med prøvetakingen av en fisk, fyller man ut barkodeskjemaet
08. Noter eventuelle kommentarer til riktig rør (f.eks. frisk, svimer, død og eventuelle skader)
09. Prøverørene legges i bobleplastkonvolutt/isoporeske sammen med skjema for prøvepakken, bestillingskjema og kjøleelement, og sendes ekspress over natt. (6)

Spesifikt for uttak av PD-prøver:

01. Det er anbefalt å starte med en steril pinsett og skalpell og skjære inn i hjertehulen
02. Det er viktig og ikke ødelegge skilleveggen (septum transversum) mellom buk og hjertehule. Skjær derfor skrått ned fra brystfinnen og inn i hulrommet til hjerte
03. Bruk pinsetten og skjær løs hjertet
04. Legg hjertet på sterilt underlag (f.eks. innsiden av skalpellpapiret) og skjær hjertespiessen i 2 deler
05. Legg begge vevsbitene i et rør med RNAlater.

Regelmessig screening

Ved regelmessig screening, anbefales det uttak av risikofisk (svimere og/eller fersk dødfisk), frem til positiv PCR-prøve. Etter at en har påvist et agens på risikofisk, bør en starte med å screene tilfeldig friske individer for å avdekke sykdomsomsfanget i populasjonen.

Veiledning for uttak av prøver for stamfisk:

Uttak av prøver til Realtime RT-PCR-analyser skal utføres med sterilteknikk for å unngå kontaminering av prøvene.

ROGNVÆSKE/MELKE: Minimum 0,2 ml og opp til 1 ml rognvæske eller melke per rør. Ikke slå sammen melke eller rognvæskeprøver fra flere individer.

ROGNKORN: Et rognkorn per rør.

Prøver av rognvæske og melke tas på prøverør med RLT-buffer. Dersom prøvene skal sendes neste dag kan de oppbevares i kjøleskap, men må fryses dersom de skal lagres over lengre tid. Det er svært viktig å sørge for tilstrekkelig kjøling under transport!

Skulle noe være uklart – Ta gjerne kontakt!

Prøvene sendes med ekspress over natt til:

**PHARMAQ Analytiq AS
Thormøhlensgate 53D
5006 Bergen**