

PRØVEUTTAKSVEILEDNING: VEVSPRØVER

Riktig prøveuttak og behandling av prøvematerialet er viktig for å sikre best mulig kvalitet på analysene. Denne veiledningen inneholder PatoGen sine retningslinjer for uttak og håndtering av vevsprøver for Real-Time PCR-analyser.

Generelt anbefales det at prøveuttak utføres av personale med god erfaring. Etter avtale kan PatoGen forestå prøveuttak eller opplæring av personale i rutiner for prøveuttak. For lovpålagte analyser skal prøveuttak foretas av autorisert veterinær, fiskehelsebiolog eller utpekt medhjelper. For bestemmelser ved bruk av medhjelper til deler av prøveuttaket henvises det til §6 i FOR 2017-08-29-1318: Forskrift om tiltak for å forebygge, begrense og bekjempe pankreassykdom (PD) hos akvakulturdyr.

PatoGen prøveinnsamlingspakke: Pakken er utviklet som et ledd i kvalitetssikringen av PatoGen sine analyser, og består av ferdig merkede prøverør med RNAlater™, kjøleelement og emballasje for innsending. Systemet er utviklet for å hindre ombytting av prøver og sikre god kvalitet på vevsprøvene som kommer til PatoGen sitt laboratorium. Prøverør med RNAlater™ har holdbarhet på 6 måneder (se datostempling på prøverørspakke), og oppbevares i romtemperatur frem til bruk.

Anbefalte vev:

Analyse	Anbefalt vev	Andre vev som kan kjøres
<i>Aeromonas salmonicida</i> sp. - type 5 ⁴	Nyre	
<i>Aeromonas salmonicida</i> sp. - type 6 ⁹	Nyre	
<i>Aeromonas salmonicida</i> spp. ^{2,3}	Nyre	
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	Nyre	
Atlantic salmon paramyxovirus (ASPV)	Gjelle	Hud
Berggyllt birnavirus ^{1,2}	Yngel, Nyre	
<i>Candidatus Branchiomonas cysticola</i>	Gjelle	Nyre
<i>Candidatus Piscichlamydia salmonis</i>	Gjelle	Nyre
Epizootic hematopoietisk nekrose virus (EHNV)	Nyre	
<i>Flavobacterium psychrophilum</i> [*]	Nyre	Gjelle, Hud
<i>Francisella noatunensis</i> subsp. <i>noatunensis</i> [*]	Nyre	Milt
<i>Gyrodactylus salaris</i>	Hud	Finne
<i>Ichthyobodo necator</i>	Gjelle	Hud
<i>Ichthyobodo salmonis</i>	Gjelle	Hud
Infeksiøs hematopoietisk nekrose virus (IHNV)	Nyre	
Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) [*]	Nyre	
Infeksiøst lakseanemi virus (ILAV) ^{*,6}	Hjerte	Nyre, Gjelle
Infeksiøst lakseanemi virus HPR0 - avirulent (ILAV-HPRO) ²	Gjelle	Hjerte, Nyre
Lumpsucker virus	Nyre	Lever
<i>Moritella viscosa</i>	Nyre	Hud, Gjelle
Nodavirus	Hjerne	Milt
<i>Nucleospora cyclopteri</i>	Nyre	
<i>Paramoeba perurans</i> (AGD)	Gjelle	
<i>Paranucleospora theridion</i> (Microsporidie)	Gjelle	Nyre, Hjerte
<i>Parvicapsula pseudobranchicola</i> (Myxosporidie) ⁸	Gjelle	Pseudobranch, Nyre, Hjerte
<i>Pasteurella skyensis</i> O2 ²	Nyre	Hjerte, Gjelle
<i>Pasteurella</i> sp.	Nyre	Hjerte (kun laks)
<i>Pasteurella</i> sp. + <i>Pasteurella skyensis</i> O1	Nyre	Hjerte (kun laks)
Piscine orthoreovirus 1 (PRV-1) [*]	Nyre, Hjerte	
Piscine orthoreovirus 3 (PRV-3)	Nyre, Hjerte	
Piscint myokarditt virus (PMCV)	Hjerte	Nyre
<i>Piscirickettsia salmonis</i> [*]	Nyre	
<i>Renibacterium salmoninarum</i> [*]	Nyre	
Salmon gill poxvirus (SGPV) ¹	Gjelle	
Salmonid alfavirus (SAV)/Pancreas disease virus (PDV) [*]	Hjerte	Nyre
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Gjeller	Nyre, Hud
<i>Vibrio anguillarum</i> ^{2,5}	Nyre	
Viral hemoragisk septikemi virus (VHSV) ^{*,7}	Hjerne	Nyre
<i>Yersinia ruckeri</i>	Nyre	
SmoltTimer®	Gjellebue	
Discovery (sykdomsoppklaring)	Hjerte, Gjelle, Nyre	

Yngel v-cut anses å inneholde nyre, hjerte og gjelle og kan brukes i alle tilfeller der ett av disse vevene er blant anbefalte vev.

*Akkrediterte analyser

¹Patent pending

²Analyse under utvikling, validering gjennomført på begrenset mengde materiale

³Påviser type I-VI

⁴Påviser type 5, vanligst på berggyllt.

⁵Påviser type O1, O2, O3

⁶For lovpålagt ILA-overvåking: Hjerte, og i noen tilfeller også nyre. ILA-frie områder (nyetablering, re-etablering eller utvidelse av ILA-fritt område): Analysering av både hjerte og nyre er et krav. Overvåking av ILAV-HPRO: Gjelle anbefales.

⁷Nyre i tidlig fase, hjerne i sen fase

⁸Nyre eller gjelle før sykdom, pseudo-branch etter sykdom

⁹Påviser type 6, vanligst på rognkjeks



Forberedelse:

Før prøveuttak og innsending bør man ha blant annet:

- Sterile pinsetter og skalpeller
- Klorin (3-10%-blanding), eventuelt gassbluss og sprit (70%), for fortløpende sterilisering av pinsett og skalpellskaft
- PatoGen prøveinnsamlingspakke
- Tørkepapir
- Skrivesaker
- Stabilt og rent underlag

Unngå kontaminering av vevsprøven med vaksine fra bukhulen

Forskning utført hos PatoGen indikerer en risiko for at vaksinerester påvises med PCR i fisk vaksinert mot PDV, IPNV, Yersinia eller Flavobakter. Risikoen reduseres imidlertid over tid etter vaksinering, og ved å unngå kontakt med vaksinen i buken under prøveuttak. For PDV og IPNV skiller vaksinert fisk fra infisert fisk ut fra hvilken virusvariant som påvises, mens det for resten enda ikke finnes gode metoder for å skille tilsvarende. Ved prøveuttak for analyse av IPNV, Yersinia og Flavobakter unngås kontaminering av nyreprøven med vaksinen ved at prøvene tas via nakken. Ved prøveuttak for PDV-analyse, unngås kontaminering av hjerteprøven med vaksine ved at prøven tas ut med et snitt inn i hjertehulen uten at bukhulen blir åpnet.

Sterilteknikk

Bruk sterilteknikk ved uttak av prøver for å unngå forurensing mellom prøver fra ulike fisk. Vi anbefaler å bruke et nytt skalpellblad for hver fisk. Ved gjenbruk av utstyr anbefaler vi å rengjøre med papir for å fjerne vevsrester, før det bades i 3-10% klor, eventuelt så kan man bade utstyret i 70% sprit og brenne av. Tips: Bruk innsiden av skalpellblademballasjen til trimming av vevsbitene.

Uttak av vevsbiter

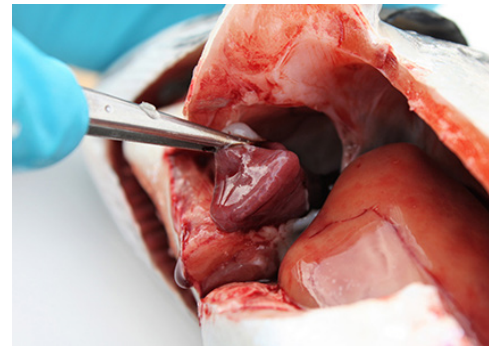
Åpne fisken med skalpellbladet slik at aktuelt organ blir tilgjengelig. Ta ut aktuell prøve, på liten fisk kan større deler av organene tas med. Om det skal tas ut gjellevev i tillegg til andre vev anbefaler vi at gjelle tas ut først (husk å bytte eller sikre at utstyret er skikkelig desinfisert før du åpner fisken etter prøveuttak av gjelle).



Gjelle



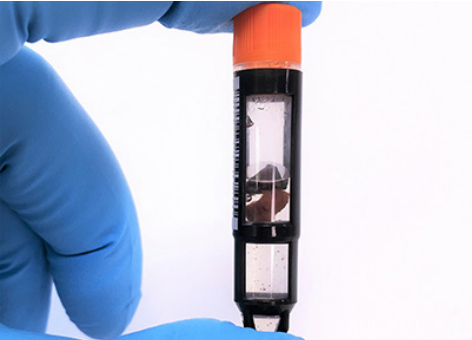
Nyre (ta prøve av hodenyre (fremre del))



Hjerte (ta prøve av hjertespiiss)



Trimming av vev på skalpellemballasjen



Pass på at vevsbitene er dekket av RNAlater



Innsending av prøverørene i en lynlåsepose

Trimming av vevsbiter

Legg vevsbiten på innsiden av skalpellblademballasjen og trim vevsbiten til to vevsbiter på ca 2x2x2mm (som et fyrstikkhode). Det er viktig at vevsprøvene ikke er for store da det vil kunne medføre dårlig konservering av prøvene. Viktig at det tas to vevsbiter for hvert organ som skal analyseres (en A- og B-prøve).

Overføring av vevsbiter til prøverør

Prøvene fra en fisk legges på ett og samme rør, og det kan maksimalt legges fire vevsbiter på hvert rør. Dersom flere vev skal tas ut (3, 5 osv.) anbefales det at gjelle legges på eget rør. Legg gjelle på første rør, og for eksempel hjerte og nyre på andre rør. Dersom flere vev skal tas ut (2, 4 osv.) kan gjelle legges på samme rør som et annet vev. Se til at vevet ligger ned i væsken i røret, og ikke sitter igjen på kanten uten å være dekket av væske.

Registrering av informasjon

Registrer prøveuttaket elektronisk i Patolink eller noter detaljer om prøvene i bestillingsskjema som fulgte prøveinnsamlingspakken. Kontakt oss om du har spørsmål om tilgang til eller bruk av Patolink. Alle prøveuttak som registreres i Patolink får kortere leveringstid - 4 virkedager svartid mot normalt 5 virkedager.

Oppbevaring frem til forsendelse

Når prøverørene er tatt i bruk skal de legges på is/kjøøl fortløpende. Ved prøveuttak over flere dager kan brukte prøverør lagres i kjøleskap inntil en uke før forsendelse på kjøøl. For lengre oppbevaring anbefales det at prøverørene fryses ned etter først å ha vært oppbevart i kjøleskap i 24 timer.

Forsendelse

Dersom ikke hele kittet brukes opp kan prøverørene legges i en plastpose og sendes inn, slik at resten av kittet kan brukes senere. Prøvene sendes til PatoGen med kjøleelement/ispose. Pakken sendes med ekspress over natt. Send sporingsnummer til sample@patogen.no eller +47 957 07 910. Alle fra Nordland, Troms og Finnmark skal sende prøvene til PatoGen Nord i Bodø, bortsett fra SmoltTimer- og LiceAdvisor-prøver, disse skal fortsatt til Ålesund.