

# Zarazna hematopoetska nekroza pastrva na hrvatskom ribogojilištu: utvrđivanje i iskorjenjivanje



Snježana Zrnčić, Dražen Oraić, Peter Hostnik i Sven M. Bergman

## Uvod

Zarazna hematopoetska nekroza (ZHN) je akutna virusna bolest mlađa i starijih kategorija različitih salmonidnih vrsta riba s mortalitetima koji sežu do 90% (Bootland i Leong, 1999.). Uzročnik izaziva opsežne nekroze hematopoetskog tkiva te je stoga bolest nazvana zarazna hematopoetska nekroza (Amend i sur., 1969.). Virus pripada rodu *Novirhabdovirus* iz skupine *Rhabdoviridae*. Prvi je puta izdvojen iz „srebrnog lososa“ (*Oncorhynchus nerka*) na pacifičkoj obali SAD ((Rucker i sur., 1953., Wolf, 1988., Bootland i Leong, 1999.), a uskoro se uvozom zaražene ikre s Aljaske proširio u Japan (Sano i sur., 1977.). U Europi je bolest prvi puta opisana u Francuskoj (Baudin-Laurencin, 1987.) i Italiji (Bovo i sur., 1987.), a nekoliko godina kasnije i u Belgiji (Hill, 1992.). Bolest se može širiti vertikalno ili horizontalno s oboljele ribe na neinficiranu ribu, putem fecesa, urina i ovarijalane ili seminalne tekućine (Bootland i Leong, 1999.).

Virus ZHN je vrlo otporan na okolišne uvjete, može preživjeti nekoliko mjeseci u vodi i tada inficirati zdravu ribu (Mulcahy i sur., 1983.). Zaražena je voda potencijalni izvor zaraze, ali po svoj prilici virus ne može preživjeti niske temperature izvan ribe domaćina. Primljivost riba na ovu virusnu infekciju pada s porastom dobi i težine te stoga kod mlađa do 2 mjeseca izaziva 90% mortaliteta, a kod ribe u dobi od 6 mjeseci taj se postotak smanjuje na 50% (La Patra i sur., 1994.). Najvažniji okolišni čimbenik koji utječe na virulenciju je temperatura (Nicholson, 1982.). Bolest se najčešće javlja u proljeće i jesen pri temperaturama između 10 i 12 °C. Iako je uopćeno mišljenje da se bolest ne razvija pri temperaturama iznad 15 °C, opisani su slučajevi bolesti između 2 i 18 °C. Sprječavanje i kontrola bolesti su usmjereni ponajprije na sprječavanje unošenja bolesti i jedini učinkoviti način sprječavanja unošenja bolesti je kontrola kretanja žive ribe između uzgajališta (Barlič-Maganja i sur., 2002.).

Dr. sc. Snježana ZRNČIĆ, dr. med. vet., viša znanstvena suradnica, dr. sc. Dražen ORAIĆ, dr. med. vet., viši znanstveni suradnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb; dr. sc. Peter HOSTNIK, dr. med. vet., Veterinarski fakultet, Ljubljana, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija; dr. sc. Sven M. BERGMAN, dr. med. vet., Friedrich-Loeffler-Institut, Državni istraživački institut za zdravlje životinja, Infektološki institut, Greifswald-Insel Reims, Njemačka

Uzgoj salmonidnih vrsta u Hrvatskoj, ponajprije kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i u manjem udjelu potočne pastrve (*Salmo trutta fario*) odvija se kroz 24 uzgajališta s godišnjom proizvodnjom od dvadesetak do nekoliko stotina tona (CROSTAT, 2009.). Znatno je udio punosistemskih uzgajališta što znači da održavaju svoj vlastiti matični plov, proizvode mlađ za vlastite potrebe te uzgajaju ribu do konzumne veličine. Međutim, dio uzgajališta ovisi o mlađu s drugih ribogojilišta ili uvozu oplođene ikre ili mlađa iz inozemstva.

Hrvatska su pastrvska uzgajališta slobodna od značajnih virusnih bolesti, virusne hemoragične septikemije (VHS) i zarazne hematopoetske nekroze (ZHN), koje podliježu prijavi prema svjetskim (OIE, 2010.), europskim (EC, 2006.) i nacionalnim propisima (MPRRR, 2008.). Kontrola zdravstvenog statusa pastrvskih vrsta riba zasniva se na kliničkim pregledima ribe na uzgajalištima, uzorkovanju spolnih produkata, ribe ili ciljanih organa te konačnog laboratorijskog pretraživanja uzoraka na spomenute uzročnike. U proteklom desetljeću nisu izdvojeni uzročnici virusnih bolesti koje podliježu prijavljivanju, a od virusnih bolesti pastrvskih riba u Hrvatskoj je prisutna samo zarazna nekroza gušterače (Oraić i Zrnčić, 2005., Mladineo i sur., 2011.).

Međutim, na jednom uzgajalištu kalifornijske pastrve u Hrvatskoj uočeno je iznenadno uginuće uvezenog mlađa smještenog u izdvojene bazene. Riba promijenjenog ponašanja su zamijećene uskoro nakon istovara te su uzorci poslani na laboratorijske pretrage, a u materijala oboljelih riba utvrđen je virus zarazne hematopoetske nekroze.

U radu je opisano utvrđivanje pojave zarazne hematopoetske nekroze i mjere koje su provedene s ciljem sprječavanja širenja virusa, parcijalni „Stamping

out” opisan u OIE Kodeksu za zdravlje akvatičnih životinja (OIE, 2004.).

## Materijali i metode

### Uzorci ribe

Dva su uzorka mlađa kalifornijske pastrve sakupljena nasumice u karantenskim bazenima u koje smješteni nakon uvoza dostavljena na laboratorijsku pretragu. Svaki je uzorak sadržavao 30 primjeraka kalifornijske pastrve prosječne težine 26 ( $\pm 2,5$ ) grama.

Nakon izdvajanja i identifikacije virusa zarazne hematopoetske nekroze uzeti su uzorci riba iz svakog bazena na uzgajalištu radi kontrole na prisuće virusa. Kako je na uzgajalištu 12 bazena provedena je kontrola svih bazena neposredno nakon uvoza mlađa. Sljedeće uzorkovanje je poduzeto nakon provođenja parcijalnog „stamping-out-a”, a naknadno su provedena još dva uzorkovanja s ciljem utvrđivanja prisuća virusa zarazne hematopoetske nekroze; prvo nakon mjesec dana, a drugo nakon pola godine. Svaki od uzoraka iz 12 bazena sadržavao je 10 riba pretkonzumne ili konzumne kategorije.

Za virusološke su pretrage pripremani „pool”-ovi visceralnih organa (srca, slezene, bubrega i mozga) od 10 riba (OIE, 2009.) koji su inokulirani na stanične kulture. Organi su homogenizirani i razrijeđeni u otprilike peterostrukim volumenima EMEM-a uz dodatak 10% FBS, 1% antibiotika i Tris-HCl (Invitrogen, Carlsbad, USA), centrifugirani na 5000 rpm kroz 20 minuta na temperaturi od 4 °C. Nadtalozni su filtrirani kroz 0,45  $\mu$ m membranski filter (Millipore, Cork, Irska) i inokulirani na stanične kulture.

### Umnažanje i izdvajanje virusa

EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) (Fijan i sur., 1983.) i BF-2 (bluegill fibroblast) (Wolf i Quimby, 1962.) linije

stanica podrijetlom iz EU referentnog laboratorija u Aarhusu, Danska su korištene za umnažanje i izdvajanje virusa. Obje su stanične linije kultivirane u EMEM-u uz dodatak 10% fetalnog telećeg seruma i Tris-HCl. Suspenzije EPC i BF-2 stanica (otprilike 150.000 stanica u 150  $\mu$ L medija) su raspoređene u dvije 96-well mikroploče. Nakon 24 satne inkubacije EPC linija stanica na 24 °C i BF-2 na 21 °C obje su linije inokulirane deseterostrukim serijskim razrjeđenjima uzoraka ribljih organa. Mikroploče su inkubirane na 15 °C i stanice su redovito kontrolirane na pojavu citopatogenog učinka (CPU). Ako se tijekom 7 dana inkubacije CPU nije pojavio materijal je sakupljen i supkultiviran na svježije pripremljene ploče te inkubiran slijedećih 7 dana.

Materijal iz jažica u kojima je uočen CPU sakupljen je i podvrgnut identifikaciji primjenom imunoperoksidaznog testa i RT-PCR-a.

### **Imunoperoksidazni test**

Da bi potvrdili virus zarazne hematopoetske nekroze (ZHNV) proveli smo imunoperoksidazni test tako da smo na 96-jažice mikrotitar ploče s 24 satnim EPC staničnim linijama inokulirali materijal koji je uzrokovao CPU u četiri deseterostruka razrjeđenja. Kada je zamijećen CPU u nultom razrjeđenju, odstranjen je EMEM sa stanica te su one fiksirane 85% acetonom tijekom 30 minuta na - 20 °C. Komercijalno dostupna monoklonalna protutijela protiv ZHNV (Biox, Belgija) su dodana u količini od 50  $\mu$ L u prethodno osušene jažice. Protutijela su razrijeđena u fosfatnoj puferiranoj otopini u omjeru 1:40. Mikrotitar ploče su inkubirane 1 sat na 37 °C. Nakon ispiranja dodan je anti-mišji konjugat (DAKO, Danska) i ploče su ponovno inkubirane 1 sat na 37 °C. Naposljetku je nakon ispiranja na jažice dodana otopina AEC supstrata (Merck, Njemačka) uz dodatak vodikovog peroksida i ploče su ponovno inkubirane

1 sat na 37 °C. Konačno su isprane i pretražene invertnim mikroskopom.

### **Ekstrakcija RNK**

Ukupna RNK je ekstrahirana primjenom Trizol® Reagent (Invitrogen) prema uputama proizvođača uz male modifikacije. Jedan mL EPC stanične kulture koji je pokazivao 100 % CPU je centrifugiran 20 minuta, na 4000 rpm pri temperaturi od 4 °C (Hettich Centrifuge) da bi se oborio stanični debris. Pelet je ponovno razrijeđen u nadtalogu slobodnom od stanica i izmiješan s 1 mL Trizol® Reagent, lagano protresan tijekom 5 min. i tada prelišen s 200  $\mu$ L kloroforma. Suspenzija je ponovno snažnije protresana kroz 30 sec. Nakon toga je postupak nastavljen prema uputama Invitrogen-a.

### **RT-PCR i potvrdni semi-nested PCR**

RT-PCR i semi-nested PCR su provedeni prema modificiranoj metodi Millera i sur. (1998). RT-PCR je proveden korištenjem 2  $\mu$ g RNK primjenom jednostupanjskog RT-PCR kita (Qiagen) u Eppendorf Mastergradient cyler. Amplikoni (2  $\mu$ L) iz RT-PCR produkta su korišteni za "semi-nested" PCR da bi potvrdili rezultate RT-PCR-a (Bergmann i sur., 2003.).

### **Eradikacija bolesti i laboratorijska provjera učinkovitosti**

Uvezeni je mlađ odmah nakon što je dijagnosticiran virus zarazne hematopoetske nekroze izlovljen i uništen. Bazeni u kojima je boravila riba temeljito su oprani i dezinficirani Virkonom (Bayer) te ostavljeni da se suše tijekom tjedan dana.

Svi su bazeni ribogojilišta u kojima je boravila konzumna riba izlovljeni i riba prodana za ljudsku ishranu dok su pretkonzumne ribe smještene u bazene na kraju ribogojilišta. Manipulacije ribom provođene su s posebnom pozornošću te je oprema između korištenja u dva različita bazena uvijek dezinficirana Virkonom.

## Rezultati

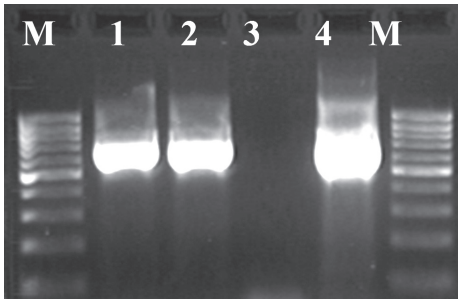
Izdvajanje IHNV virusa iz uzoraka riba te identifikacija imunoperoksidaznim testom

Dva uzorka uvezenog mlađa kalifornijske pastvre testirana su na prisuće virusa koji podliježu obvezi prijavljivanja, virus virusne hemoragične septikemije i virus zarazne hematopoetske nekroze. U oba je uzorka utvrđen CPU koji je bio izraženiji na EPC linijama stanicama, a daljnjim provođenjem imunoperoksidaznog testa identificiran je virus zarazne hematopoetske nekroze. Nakon prvog izdvajanja virusa ZHN iz uzoraka uvezenih na uzgajalište, provedena je pretraga uzoraka pretkonzumnih riba iz svih bazena uzgajališta (n=12) predmetnog ribogojilišta te je 8/12 uzoraka izazvalo CPU na staničnim kulturama. Imunoperoksidaznim testom je u svih 8 pozitivnih uzoraka identificiran virus zarazne hematopoetske nekroze.

U 12 pretraženih uzoraka sakupljenih mjesec dana nakon „stamping-out-“a bila su 2/12 pozitivna na ZHNV, dok su nakon 6 mjeseci svi pretraženi uzorci bili negativni na ZHNV.

### RT-PCR i „semi-nested PCR“

Ukupna RNK izdvojena je iz nadtaloga s EPC staničnih linija s



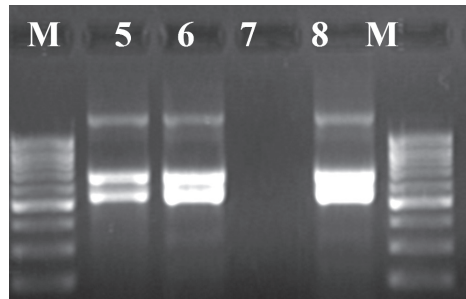
**Slika 1.** Agarozni gel koji pokazuje nalaz virusa zarazne hematopoetske nekroze u nadtalogu stanične kulture RT-PCR-om. M kolone - markeri (100 bp, Peqlab); kolona 1 i 2 - materijal iz riba koji je izazvao CPU na staničnim kulturama; kolona 3 - negativna kontrola; kolona 4 - pozitivna kontrola (njemački izolat virusa ZHN)

izraženim CPU, a inficiranih virusom zarazne hematopoetske nekroze. RNK je podvrgnuta RT-PCR i „semi-nested PCR“ umnažanju korištenjem nukleotidnih početnica specifičnih za G-gen. Rezultat RT-PCR je potvrdio identifikaciju virusa ZHNV u nadtalogu sa stanične kulture, a kao pozitivna kontrola je korišten njemački izolat istog virusa (Slika 1.). Identičan je rezultat postignut primjenom „semi-nested PCR“-a (Slika 2.).

## Rasprava

U proteklih desetak godina nije bilo kliničkih pojava znakova virusnih bolesti koje podliježu obvezi prijavljivanja u uzgoju pastrvskih vrsta riba u Hrvatskoj. Ti su rezultati dokumentirani rezultatima pretraga u okviru kontrole virusnih bolesti na uzgajalištima propisanih Naredbom. Pretraživanja su provedena prema postupcima za utvrđivanje i identifikaciju virusa Zarazne hematopoetske nekroze i Virusne hemoragične septikemije propisanih u dijagnostičkom priručniku OIE-a. Oba virusa su značajni uzročnici bolesti u uzgoju pastrvskih vrsta riba i uzrokuju velike materijalne štete (Einer-Jensen i sur., 2002.). Jedina metoda kontrole bolesti je sprječavanje širenja zarazne bolesti kontrolom širenja virusa.

Kao što se pokazalo u ovoj epizodi izbijanja zarazne hematopoetske



**Slika 2.** Agarozni gel koji pokazuje nalaz virusa zarazne hematopoetske nekroze u nadtalogu stanične kulture „semi-nested“ PCR-om. M kolone - markeri (100 bp, peqlab); kolona 1 i 2 - materijal iz riba koji je izazvao CPU na staničnim kulturama; kolona 3 - negativna kontrola; kolona 4 - pozitivna kontrola (njemački izolat virusa ZHN)



nekroze, trgovina živom ribom predstavlja veliku opasnost u širenju bolesti i samo certifikati nisu potpuna garancija da je uvezena riba slobodna od virusa. Stoga je nužno poboljšati mjere kontrole bolesti temeljem planova uzorkovanja koji propisuju vrijeme i način uzorkovanja te dijagnostičke postupke da bi ustvrdio vjerodostojan zdravstveni status ribe koja se transportira u područje slobodno od virusnih bolesti.

Nadalje, poznato je da je transport stresan za ribu. Odavno je opisano da su kalifornijske pastrve izložene stresu razvile žešće simptome zarazne hematopoetske nekroze nakon eksperimentalne infekcije istim titrom virusa nego one koje nisu bile izložene stresu (Hetrick i sur., 1979.).

Čini se da je metoda „djelomičnog stamping out“-a učinkovita, jer su svi pretraženi uzorci riba s navedenog ribogojilišta bili negativni na prisuće virusa zarazne hematopoetske nekroze.

Usprkos žurno provedenim mjerama, ribogojilište je pretrpilo ekonomski gubitak i još uvijek nije isključena mogućnost ponovnog izbijanja bolesti. Ponekad su tradicionalne dijagnostičke metode pretraživanja nedovoljno osjetljive da utvrde virus u supklinički/latentno zaraženih riba (Miller i sur., 1998.). Molekularni su testovi osjetljiviji od tradicionalnih metoda i mogu biti vrlo korisni za detekciju virusa koji bi mogli izazvati pojavu bolesti odnosno, spriječiti njeno širenje (Barlič-Maganja i sur., 2002.). Osim toga, molekularnim je metodama moguće ustvrditi i prisuće virusnih čestica te se na taj način može spriječiti unos virusnog uzročnika ribom koja se unosi u područje ili uzgajalište slobodno od bolesti.

## Sažetak

Zarazna hematopoetska nekroza (ZHN) je akutna virusna bolest od koje obolijevaju mlađ i starije kategorije različitih salmonidnih vrsta riba s mortalitetima koji sežu i do 90%. Uzročnik, virus roda *Novirhabdovirus* iz skupine *Rhabdoviridae* izaziva opsežne nekroze hematopoetskog tkiva te je bolest nazvana zarazna hematopoetska nekroza. Bolest podliježe obvezi prijavljivanja prema

globalnim, europskim i hrvatskim propisima. U Hrvatskoj je na snazi program kontrole virusnih bolesti riba (VHS i ZHN) i tijekom posljednjih 10 godina nije bilo pozitivnih uzoraka. Međutim, tijekom karantene uvezenog pastrvskog mlađa uočeni su znakovi bolesti u ribogojilištima u Hrvatskoj. Laboratorijskim pretraživanjima uzročnik izdvojen na EPC and BF2 stanicima kulturama, identificiran imunoperoksidaznim testom I potvrđen RT-PCR i semi-nested PCR. Na uzgajalištu je proveden parcijalni „stamping-out“ i primjenom dezinfekcije, zootehničkih mjera i učestalih laboratorijskih pretraga uspjelo je spriječiti širenje bolesti te su nakon deset mjeseci rezultati pretraživanja na ZHN virus bili negativni. Raspravljena je potreba temeljitijih pretraživanja uzoraka riba prije uvoza u područja slobodna od virusnih bolesti.

## Literatura

1. AMEND, D. F., W. T. YASUTAKE and R. W. MEAD (1969): A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 98, 796-804.
2. BARLIČ-MAGANJA, D., M. ŠTRANCAR, P. HOSTNIK, V. JENČIĆ and J. GROM (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.
3. BAUDIN-LAURENCIN, F. (1987): IHN in France. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 7, 104.
4. BERGMANN, S. M., D. FICHTNER, H. F. SKALL, H.-J. SCHLOTFELDT, N. J. OLESEN (2003): Age- and weight- dependent susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to isolates of infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) of varying virulence. *Dis. Aquat. Org.* 55, 205-210.
5. BOOTLAND, L. M. and J. C. LEONG (1999): Infectious haematopoietic necrosis virus. In: *Fish Diseases and Disorders*, Vol. 3 (ed. by P.T.K. Woo & D.W. Bruno), pp. 57-121. CAB International, UK.
6. BOVO, G., G. GIORGETTI, P. E. V. JORGENSEN and N. J. OLESEN (1987): Infectious haematopoietic necrosis: first detection in Italy. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.* 7, 124.
7. CROSTAT (2009.): Statistički ljetopis. Zagreb, Hrvatska.
8. EC (2006): Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals. *Official Journal of the European Union*, 328, 14.
9. EINER-JENSEN, K., H. BJORKLUND, S. ORESHKOVA, I. SCHELKUNOV, T. VESELY and N. LORENZEN (2002): Detection and typing of fish viruses. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 22, 158-165.
10. FIJAN, N., D. SULIMANOVIC, M. BEARZOTTI, D. MUZINIC, L.O. ZWILLENBERG, S. CHILMONCZYK, J. F. VAUTHEROT and P. DE KINKELIN (1983): Some properties of the epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cell

- line from carp (*Cyprinus carpio*). *Annal. Virol.* (Institute Pasteur) 134E, 207-220.
11. HETRICK, F. M., M. D. KNITTEL and J. L. FRYER (1979): Increased Susceptibility of Rainbow Trout to Infectious Hematopoietic Necrosis Virus After Exposure to Copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 198-201.
  12. HILL, B. (1992): Impact of viral diseases of salmonid fish in the European community. In: KIMURA T. (ed.) *Proceedings of International Symposium on Salmonid Diseases*. Hokaido University Press, Sapporo, Japan, pp. 48-59.
  13. LAPATRA S. E., K. A. LAUDA and G. R. JONES (1994): Antigenic variants of infectious hematopoietic necrosis virus and implications for vaccine development. *Dis. Aquatic. Org.* 20, 119-126.
  14. MILLER, T. A., J. RAPP, U. WASTLHUBER, R. W. HOFFMANN and P.-J. ENZMANN (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. Org.* 34, 13-20.
  15. MLADINEO, I., S. ZRNČIĆ, I. LOJKIĆ, D. ORAIĆ (2011): Molecular identification of a new strain of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in a Croatian rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farm. *J. Appl. Ichthyol.* 27, 1165-1168.
  16. MULCAHY, D., R. J. PASCHO, C. K. JENES (1983): Titre distribution patterns of infectious hematopoietic necrosis virus in ovarian fluids of hatchery and feral salmon populations. *J. Fish Dis.* 6, 183-188.
  17. Naredba o mjerama zaštite od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2009. godini. NN, 157/2008.
  18. NICHOLSON, B. L. (1982): Infectious hematopoietic necrosis (IHN). In: *Antigens of Fish Pathogens: Development and Production for Vaccines and Serodiagnostics*. Symposium International de Talloires, May 10-12, 1982. Collection Foundation Marcel Merieux, France, pp. 63-79.
  19. OIE (2004): *Aquatic Animal Health Code*. 7th edition. Office International Des Epizooties, Paris, France.
  20. OIE (2009): *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. 6th edition. Office International Des Epizooties, Paris, France.
  21. OIE (2010): *Aquatic Animal Health Code*. 13th edition. Office International Des Epizooties, Paris, France.
  22. ORAIĆ, D., S and ZRNČIĆ (2005): An Overview of Health Control in Croatian Aquaculture. *Vet. Res. Comm.* 29 (Suppl. 2), 139-142.
  23. Pravilnik o uvjetima zdravlja životinja koji se primjenjuje na životinje akvakulture i njihove proizvode te sprječavanju i suzbijanju određenih bolesti akvatičnih životinja. NN, 42/2008.
  24. RUCKER, R. R., W. J. WHIPPLE, J. R. PARVIN and C. A. EVANS (1953): A contagious disease of salmon, possibly of virus origin. *U.S. Fish. Wild. Serv. Fish. Bull.* 54, 35-46.
  25. SANO, T., T. NISHMURA, N. OKAMOTO, T. YAMAZAKI, H. HANADA and Y. WATANABE (1977): Study on viral diseases of Japanese fishes. VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan. *Journal of the Tokyo University of Fisheries* 63, 81-85.
  26. WOLF, K. (1988): Infectious hematopoietic necrosis. In: *Fish Viruses and Fish Virus Diseases* (ed. by K. WOLF), pp. 83-114. Cornell University Press, Ithaca, New York.
  27. WOLF, K. and M. C. QUIMBY (1962): Established eurythermic line of fish cells. *In Vitro Sci.* 135, 1065-1066.

## INFECTIOUS HEMATOPOIETIC NECROSIS OF TROUTS AT CROATIAN FISH FARM: DIAGNOSTICS AND ERADICATION

Snježana Zrnčić, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Dražen Oraić, DVM, PhD, Senior Scientific Associate, Croatian Veterinary Institute, Zagreb; Peter Hostnik, DVM, PhD, University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Ljubljana, Slovenia; Sven M. Bergman, DVM, PhD, Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute for Infectology, Greifswald-Insel Reims, Germany

Infectious hematopoietic necrosis (IHN) is a viral disease caused by a rhabdovirus from the Novirhabdovirus genus that affects the fry and fingerlings of economically important salmonids, with mortalities of up to 90%. The disease is characterized by extensive necrosis of haematopoietic tissues and the name of disease derives from the main feature of the disease. This is a notifiable disease according to the OIE, EU and Croatian law. A national programme for notifiable disease control (VHS & IHN) is in place in Croatia and during the past 10 years, there have been no positive findings. Apart from these results, there was an occurrence of infectious haematopoietic necrosis in imported rainbow trout fry held

in a quarantine facility at one farm. The IHN was isolated in EPC and BF2 cell cultures, identified by the immunoperoxidase test and confirmed by RT-PCR and semi-nested PCR. Partial stamping out was performed at the rainbow trout farm, and the remaining fish were subjected to continuous control for the presence of the virus. It appears that the partial stamping out method was successful, as the results of virological examination of the samples from all categories of rainbow trout at this farm were negative ten months later. However, the issue arises concerning the application of the proper diagnostic, due to the fact that the imported fish were certified as IHN free.