

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2012-05/35

## ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1076
<b>Naslov projekta</b>	Epidemiološka raziskava virusnih okužb pri sladkovodnih ribah v Sloveniji
<b>Vodja projekta</b>	4272 Vlasta Jenčič
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	5.09.04 Epidemiološka raziskava virusnih okužb pri ribah v Sloveniji
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	1262
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	10.2010 - 09.2012
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 414 Zavod za ribištvo Slovenije
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.04 Zdravstvo živali z vidika očuvanja črede
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	07. Zdravje

#### 2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS<sup>1</sup>

<b>Šifra</b>	4.03
<b>- Veda</b>	4 Kmetijske vede
<b>- Področje</b>	4.03 Veterina

#### 3. Sofinancerji<sup>2</sup>

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje
	Naslov	Dunajska 22, Ljubljana

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### 4. Povzetek projekta<sup>3</sup>

SLO

V raziskavi smo ugotavljali pristnost virusov, povzročiteljev virusne hemoragične septikemije (VHS), infekciozne hematopoetske nekroze postrvi (IHN) in koi herpes viroze (KHV). Na prisotnost virusov IHN (IHNV) in VHS (VHSV) smo preiskali postrvi iz 31 vodotokov iz celotne Slovenije. Lokacije smo izbrali glede na epizootiološko situacijo in morebitne povezave z ribogojnicami, v katerih je bila ugotovljena okužba z VHSV in IHNV. Vzorcili smo šarenke in potočne postrvi ter jih pregledali z metodo izolacije virusa na celični kulturi (EPC, RTG-2), molekularnimi diagnostičnimi metodami (RT-PCR, RT-qPCR, multiplex RT-PCR) in serološko metodo (virus nevtralizacijski test, VNT). Rezultati preiskav izolacije virusa na dveh celičnih kulturah in molekularnih diagnostičnih metod so bili negativni. Za preiskavo na prisotnost protiteles proti virusoma IHN in VHS smo preiskali serume šarenk in potočnih postrvi iz 8 vodotokov in ugotovili protitelesa proti virusu IHN pri postrvih v 37,5% preiskovanih voda. Protiteles proti virusu VHS nismo dokazali. Drugi del raziskave je bil usmerjen na okužbe s KHV. Pri dokazovanju povzročitelja smo v diagnostiko uvedli dve molekularni metodi (PCR, qPCR). Ugotavljanje latentnih okužb z virusom KHV je kompleksno in včasih tudi nezanesljivo, saj virusa pogosto niti ne moremo več dokazati, poleg tega je potrebno krape za preiskavo žrtvovati. V raziskavo smo zato uvedli neinvazivni diagnostični metodi: ugotavljanje virusne nukleinske kisline (DNA) v brisu škrg in VNT za ugotavljanje prisotnosti protiteles pi klinično zdravih krapih. Na prisotnost protiteles proti povzročitelju bolezni KHV smo preiskali krape v 21 izbranih jezerih in ribnikih po vsej Sloveniji. Protitelesa proti KHV smo ugotovili v 28,5% preiskovanih voda. V raziskavi smo razvili tudi postopek za ugotavljanje virusa KHV v vodi, ki je vključeval učinkovito koncentracijo, izolacijo nukleinske kisline in ugotavljanje KHV z metodo qPCR. Vzpostavljen sistem koncentriranja virusnega povzročitelja je dosegel izkoristek, ki je bil dvakrat višji od do sedaj objavljenih rezultatov opravljenih raziskav. Glede na to, da so bile preiskovane vode v povezavi z ugotovljenimi okužbami v ribogojnicah, so rezultati raziskave na področju okužb z virusoma VHS in IHN v slovenskih rekah in potokih relativno optimistični. Vzpodbudno je dejstvo, da v slovenskih vodah nismo ugotovili virusa VHS, v serumu preiskovanih rib pa niti protiteles proti omenjenemu virusu. To je dobra osnova za predlog programa izkoreninjenja te okužbe v Sloveniji. Nasprotno pa so protitelesa proti KHV prisotna v večji meri, kot bi pričakovali, ker razen v dveh primerih do sedaj, ni bilo poročil o kliničnih izbruhih bolezni v Sloveniji. Uvedena serološka metoda, VNT, je zanesljiva diagnostična metoda za ugotavljanje zdravstvenega statusa. Poleg tega je primerna tudi z vidika dobrobiti rib, saj rib za preiskavo ni potrebno žrtvovati.

ANG

In this research, the presence of three viruses, viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) and koi herpes virus (KHV) were analyzed. The presence of IHN and VHS viruses in salmonids from 31 rivers and streams from the entire area of Slovenia, were investigated. Sampling locations were selected according to the analysis of the epizootiological situation and their possible links to the fish farms in which the infection was diagnosed in previous years. Rainbow trout and brown trout were collected for the laboratory analyses. Samples were examined using following methods; i) virus isolation in cell cultures (EPC, RTG-2), ii) molecular diagnostic techniques (RT-PCR, RT-qPCR) and iii) serological method (virus neutralization test, VNT). The results of virus isolation in cell cultures and the results of molecular diagnostic methods were negative. To detect antibodies to IHN and VHS viruses, sera of rainbow trout and brown trout were collected. Using VNT, antibodies to IHN virus were found in 37.5% of the investigated waters. Antibodies against VHSV were not detected. Second part of the study was focused on the KHV of carp. Molecular diagnostic methods (PCR, qPCR) were introduced. Determination of KHV latent infections is complex and sometimes unreliable while viral antigen often can no longer be detected and, in addition, for the investigation carp must be sacrificed. We therefore introduced non-invasive methods: detection of viral nucleic acid (DNA) in the gill swabs and VNT to detect the presence of neutralizing antibodies in clinically healthy fish population. For the presence of antibodies to KHV, 21 selected carp ponds and lakes in Slovenia were sampled. Antibodies were proved in 28.5% of the investigated waters. In addition, we also established a procedure for determining the KHV virus from waters, which includes an effective concentration, nucleic acid isolation and specific detection of KHV by qPCR. The average yield of the established system was increased two-fold when compared with previously published results. The results of VHS in IHN virus infections in Slovene waters are relatively optimistic given that the

investigated waters connected to the IHNV and VHSV positive fish farms. It is especially encouraging that neither VHS virus nor antibodies were found in Slovene waters which give the basis for the eradication of this serious viral infection in the fish farms. However, the presence of KHV antibodies are higher than expected considering that with an exception of two sites no clinical outbreaks in Slovenia were reported before. Introduced virus neutralization test is reliable diagnostic tool for the assessment of health status of fish population. In addition, this method is also appreciated because there is no need to sacrifice the fish which is important for the fish welfare.

#### 5. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>4</sup>

Raziskava je potekala v dveh sklopih: v prvem smo ugotavljali virusne okužbe postrvi, v drugem pa virusne okužbe krapov. Pri postrveh smo ugotavljali virusno hemoragično septikemijo (VHS) in infektivno hematopoetsko nekrozo (IHN), pri krapih pa koi herpes virus (KHV). Vse tri bolezni so v Direktivi Sveta 2006/88/ES z dne 24. oktobra 2008 o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz akvakulture ter o preprečevanju in nadzoru določenih bolezni vodnih živali (Direktiva Sveta 2006/88/ES) na seznamu ne-eksotičnih bolezni rib. Bolezni so zelo nalezljive in povzročajo veliko obolevnost in smrtnost rib ter posledično veliko ekonomsko škodo v ribogojstvu. Prizadevanje k izkoreninjenju okužb in pridobitvi zdravstvenih statusov »ribogojnica uradno prosta določene bolezni« oziroma »cona ali kompartment uradno prost določene bolezni« je zato smiselno. Za pristop k zahtevnim aktivnostim za pridobitev teh zdravstvenih statusov pa je nujno poznavanje stanja glede okužb v odprtih vodah, čemur je bila namenjena naša raziskava.

Prvi sklop, ugotavljanje okužb z virusoma VHS (VHSV) in IHN (IHNV), je potekal v zimskih mesecih v letih 2010/11 in poleti 2011. Pozimi smo na osnovi analize stanja okužb z IHNV in VHSV v izbranih vodotokih, ki so bili povezani z okuženimi ribogojnicami, z elektro agregatom izlovili po 10 postrvi. Če je bilo le mogoče, smo vzorčili šarenko (*Oncorhynchus mykiss*), v kolikor to ni bilo izvedljivo potočne postrvi (*Salmo trutta m. fario*). Ob vzorčenju je bila temperatura vode pod 14°C.

Za preiskavo na prisotnost virusov VHS in IHN smo postrvim odvzeli del prednjega dela ledvic, del vranice, srca in možganov ter, če je bilo mogoče, tudi del testisov in ovarijskega tkiva. Tako pripravljene organe petih rib, ki so predstavljali en vzorec (pool), smo shranili v transportni tekočini. Pazili smo, da so bili organi šarenk in potočnih postrvi ločeni. Vsak vzorec (pool) smo inokulirali na dve različni celični liniji: EPC (Epithelioma papulosum cyprini) in RTG-2 (angl. rainbow trout gonad cells). Vzorce smo v 48-urnih intervalih pregledovali na pojav morebitnega citopatskega efekta (CPE). Opravili smo tudi pasažo vzorca na sveži, 24 ur stari celični kulturi. Po dveh opravljenih pasažah smo preiskavo zaključili. Na ta način smo v 31 vodotokih po vsej Sloveniji preiskali skupno 245 rib (52 poolov), od tega 153 šarenk in 92 potočnih postrvi. Vsi rezultati preiskav na celični kulturi so bili negativni. Vse vzorce smo preiskali tudi z molekularnimi metodami. Z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR), z metodo multiplex RT-PCR in z metodo RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) smo dokazovali prisotnost nukleinske kisline virusov VHS in IHN v vzorcih. Rezultati so bili pri vseh preiskovanih vzorcih negativni.

Poleti, ko je bila temperatura vode višja, pa smo v osmih izbranih vodotokih, prav tako z elektro agregatom, izlovili po 10 šarenk ali potočnih postrvi in jim odvzeli kri za preiskavo na protitelesa proti virusoma IHN in VHS. S serološko metodo smo ugotavljali protitelesa razreda IgM. Pri tem smo uporabili virus nevtralizacijski test (VNT) za dokazovanje nevtralizacijskih protiteles proti IHNV in VHSV. Za izvedbo VNT smo uporabili občutljivo celično linijo EPC, gojeno v rastnem gojišču, komplement in izbrana izolata obeh virusov, pozitivne in negativne serumske kontrole ter serumske vzorce, pri katerih smo določali titre nevtralizacijskih protiteles. Test smo izvajali na mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom v skladu z navodili AFSSA - Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija. Celice smo dnevno opazovali z invertirnim svetlobnim mikroskopom. Če na sloju celične linije EPC nismo opazili CPE (citopatski efekt), je to pomenilo, da so v serumu prisotna protitelesa, ki so virusu IHN in virusu VHS preprečila pritrjevanje in vstop v občutljivo celico. Če pa je bil na celičnem sloju CPE opazen, v preiskovanem serumu ni bilo prisotnih nevtralizacijskih protiteles. Pri vrednotenju rezultatov smo zaradi nespecifičnih reakcij (citotoksičnost) razredčine 1:40 zanemarili. Rezultat je bil pozitiven v primeru, ko smo v preiskovanem serumskem vzorcu določili titer nevtralizacijskih protiteles IgM v razredčini 1:80 ali več. Na ta način smo preiskali 55 serumov šarenk in 20 serumov potočnih postrvi. Nevtralizacijska protitelesa proti virusu IHN smo ugotovili pri štirih postrvih - v 3 od 8 preiskovanih vodotokov, kar predstavlja 37,5% preiskovanih vodotokov. V enem od preiskovanih vodotokov smo ugotovili 25% pozitivnih rib, v drugih dveh pa po 10%. Nevtralizacijskih protiteles proti virusu VHS nismo dokazali.

Drugi sklop raziskave smo namenili ugotavljanju KHV pri krapih (*Cyprinus carpio*), ki je edina

vrsta, ki klinično zboli za to boleznijo. Ker je laboratorijsko dokazovanje virusa pri klinično nezaznavnih okužbah zahtevno in včasih tudi nezanesljivo, saj virusa pogostokrat niti ne moremo več dokazati, smo po nekaj naključnih vzorčenjih ugotavljanja virusa KHV pri morebiti latentno okuženih krapih, ki smo jih morali za preiskavo žrtvovati, opustili. Velik del raziskave smo namenili ugotavljanju virusa KHV v vodi, saj lahko na tak način posredno predvidimo in preprečimo širjenje okužbe. Težišče ugotavljanja KHV pri krapih pa je bilo ugotavljanje prisotnosti protiteles. Nekaterim preiskovanim krapom, ki so bili pred tem za nekaj časa izpostavljeni stresu (spremenjeno okolje), smo po metodi, ki je bila v prakso vpeljana šele pred kratkim, z vatenko odvzeli brise škrg in v njih ugotavljali prisotnost virusa. Obe preiskavi sta potekali poleti 2012, ko smo vzorce krapov pridobivali ob ribolovih, ki so jih v izbranih ribnikih po vsej Sloveniji organizirale ribiške družine. Ulovljenim krapom smo odvzeli kri, če pa so bili ob tem izpostavljeni stresu, smo jim odvzeli tudi brise škrg. Po obeh posegih smo krape vrnili v vodo. Da so bili krapji izpostavljeni stresnim dejavnikom smo upoštevali, če so bili krapji po ulovu in pred odvzemom krvi 24 ur v bazenu.

Ker je prikrite okužbe krapov z virusom KHV težko ugotavljati, smo del raziskave namenili tudi ugotavljanju virusa v vodah. Za koncentriranje virusa KHV smo vzpostavili sistem, ki se največkrat uporablja pri hitrem dokazovanju različnih virusov v vodi in ima najboljši izkoristek. Vzpostavili smo sistem membranske filtracije s pozitivno nabitimi filtri, ki deluje na principu vezavno-izpiralne tehnike. V ta namen in za hitro diagnostiko okužb z virusom KHV smo v laboratoriju vzpostavili dokazovanje virusne DNA s PCR v realnem času (qPCR). Optimizirali smo metodo PCR v realnem času za detekcijo tarčnega dela KHV DNA (z začetnimi oligonukleotidi in sondo Inštituta CVI iz Nizozemske) in ji glede na uporabljen komplet ter aparat za pomnoževanje in detekcijo določili učinkovitost, ki znaša 93%. Njena meja zaznavanja je 1 TCID<sub>50</sub>/ml. Po navedenih dopolnitvah metode koncentriranja smo vzpostavili uspešen postopek določanja virusa KHV iz vod. Ta učinkovit sistem vključuje postopek koncentriranja, izolacijo nukleinskih kislin in specifično detekcijo virusa KHV s PCR v realnem času. Z vzpostavljenim sistemom dosegamo v povprečju 3% izkoristek, kar je dvakrat več kot je bilo do sedaj objavljeno v literaturi. Rezultati kažejo, da lahko z optimizirano metodo v vodi iz ribnikov dokažemo virus KHV, če je v litru vode vsaj 50 TCID<sub>50</sub> KHV.

Pri krapih smo virus KHV ugotavljali z molekularnima metodama (PCR in qPCR), kjer smo virusno nukleinsko kislino dokazovali v brisu škrg. Od posrednih metod za dokazovanje okužbe z virusom KHV pa smo uporabili virus nevtralizacijski test dokazovanja specifičnih protiteles. Za direktne in indirektno laboratorijske metode dokazovanja okužbe z virusom KHV smo potrebne standardne materiale pridobili v Referenčnem laboratoriju EU za ribe v Aarhusu, Danska (pozitivna kontrola virusa KHV za potrebe PCR/qPCR metod), pozitivni in negativni serum za potrebe virus nevtralizacijskega testa v Nemčiji, delovni protokoli pa so plod nekajletnega uspešnega sodelovanja z laboratorijema v Lelystadu in Brestu. Odvzem in protokol priprave vzorca za izolacijo virusne DNA smo povzeli po objavljenem članku (Bergmann in Kempfer, 2011). Brise škrg 36 krapov smo shranili v epruvetah s transportno tekočino. Krapov v tem primeru ni bilo potrebno žrtvovati. Z izbranimi začetnima oligonukleotidoma smo z metodo PCR specifično pomnožili regijo gena, ki kodira encim timidin kinazo.

V molekularno diagnostiko bolezni KHV smo vpeljali tudi metodo PCR v realnem času in sledili delovnim protokolom Inštituta CVI, Lelystad, Nizozemska. Gre za 'in-house' metodo, ki je bila prvič predstavljena na srečanju Nacionalnih referenčnih laboratorijev (NRL) v Aarhusu, Danska, leta 2010.

Vsi rezultati opravljenih molekularnih preiskav so bili negativni.

Težišče raziskave ugotavljanja okužb krapov z virusom KHV smo usmerili v serološko diagnostiko ugotavljanja protiteles z VNT. Uporabili smo občutljivo celično linijo CCB (angl. common carp brain), gojeno v rastnem gojišču, referenčni virusni izolat KHV, pozitivne in negativne serumske kontrole, ki smo jih pridobili v Nacionalnem referenčnem inštitutu za KHV Inštituta Fridrich-Löffler iz otoka Riems, Nemčija, ter serumske vzorce, pri katerih smo določali titre nevtralizacijskih protiteles. Z nevtralizacijskim testom smo v vzorcih serumov krapov dokazovali prisotnost nevtralizacijskih protiteles (IgM) proti virusu KHV. Test smo izvajali na mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom v skladu z navodili AFSSA-Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija. Po inkubaciji smo celice dnevno opazovali z invertirnim svetlobnim mikroskopom. Če na sloju celičnih linij nismo opazili CPE, je to pomenilo, da so v serumu prisotna protitelesa, ki so virusu KHV preprečila pritrjevanje in vstop v občutljivo celico. Če pa je bil na celičnem sloju CPE opazen, v preiskovanem serumu ni bilo prisotnih nevtralizacijskih protiteles. Pri vrednotenju rezultatov smo zaradi nespecifičnih reakcij (citotoksičnost) razredčine 1:40 zanemarili. Rezultat je bil pozitiven v primeru, ko smo v preiskovanem serumskem vzorcu določili titer nevtralizacijskih protiteles IgM v razredčini 1:80 ali več. Na prisotnost protiteles proti virusu KHV smo preiskali 163 serumskih vzorcev krapov iz 21 izbranih ribnikov in jezer po Sloveniji. Protitelesa smo ugotovili v 9 vzorcih na 6 različnih lokacijah, v 154 vzorcih pa protiteles nismo dokazali. Pri krapu, kjer smo opravili tako

preiskavo na protitelesa in kot tudi preiskavo na prisotnost virusa KHV v brisu škrg, je bila prva preiskava pozitivna, druga pa negativna. Prisotnost protiteles proti virusu KHV smo ugotovili na skupno 28,5 % preiskanih lokacij. Grafičen prikaz (zemljevid) lokacij vzorčenj postrvi in krapov v raziskavi je podan v Prilogi 1, lokacije, kjer so bila ugotovljena protitelesa proti virusu IHN in KHV pa na grafičnem prikazu v Prilogi 2 tega poročila.

## 6. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>5</sup>

Raziskava je potekala po načrtu. Poleg uveljavljenih in splošno uporabljenih diagnostičnih metodah izolacije virusa na celični kulturi in molekularnih metodah, smo za diagnostiko bolezni KHV pri krapih uvedli tudi PCR v realnem času (qPCR). Ugotovili smo, da je zaradi oteženega dostopa vzorčenje živih rib problematično, za preiskave pa je ribe potrebno tudi žrtvovati. Zato so primernejše metode ugotavljanja virusov v vodi in posredne, serološke metode, s katerimi ugotavljamo prisotnost protiteles. Za odvzem krvi rib ni potrebno žrtvovati, pozitivni rezultati pa z gotovostjo kažejo na to, da so se ribe okužile z virusi in po vsej verjetnosti predstavljajo tveganje za širjenje okužbe. Pri krapih smo v projektu uporabili tudi povsem novo, šele pred kratkim uporabljeno metodo ugotavljanja virusnega genoma KHV v brisu škrg, katero bomo v prihodnje uporabili pri dokazovanju virusnega povzročitelja ob kliničnih manifestacijah bolezni. Pridobivanje vzorcev za preiskavo je bilo na terenu na določenih mestih zelo oteženo, zato je tudi število rib v posameznih vzorcih zelo neizenačeno. Vzrok za to je bila težka dostopnost do rib na določenih mestih, kjer jih je bilo tudi z elektro agregatom težko izloviti. Pri tem so bile pogosto ovira tudi (pre)visoke vode. Še težje je bilo za preiskave pridobiti žive krape iz jezer in ribnikov, kjer smo bili odvisni od gostote naselitve in od ulova pri športnih ribolovih. Kljub temu menimo, da smo z vzorčenji zajeli postrvske in krapske vode na področju celotne Slovenije in tako dobili okvirno sliko virusnih okužb postrvi ter krapov. Ob koncu moramo poleg pomoči delavcev Zavoda za ribištvo Slovenije, ki je bil formalni sodelavec raziskave, omeniti tudi požrtvovalnost ribičev ribiških družin Ribiške zveze Slovenije, ki so krape tudi izlovili.

## 7. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>6</sup>

Program je potekal po planu in ni bilo sprememb.

## 8. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>7</sup>

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	3330938	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Genotipizacija slovenskih izolatov virusa infektivne hematopoetske nekroze postrvi na osnovi analize nukleotidnih zaporedij »mid-G« regije gena za glikoprotein G
		ANG	Genotyping of Slovenian infectious hematopoietic necrosis virus isolates based on the 'mid-G' region sequences of the glycoprotein gene
	Opis	SLO	<p>Infektivna hematopoetska nekroza postrvi (IHN) je akutna virusna bolezen salmonidnih vrst rib. Pri zarodu in mladiah je lahko smrtnost v populaciji tudi do 100 %, pri odraslih salmonidih pa je ta odstotek nekoliko nižji, med 30-70%.</p> <p>Bolezen IHN povzroča v ribogojstvu veliko gospodarsko in ekonomsko škodo. Bolezen je bila najprej ugotovljena v Severni Ameriki, kjer je danes enzootsko razširjena, od tam pa se je najverjetneje s prometom okuženih iker in rib razširila v Evropo. Leta 1987 je bila bolezen prvič ugotovljena v Franciji in Italiji. Na podlagi dosedanjih podatkov je IHN razširjena tudi v Sloveniji. Prvi primer bolezni v Sloveniji je bil potrjen leta 1996.</p> <p>Kako se je virus IHN vnesel na geografsko področje Slovenije, danes še ni pojasnjeno.</p> <p>V raziskavo je bilo vključeno večje število vzorcev, ki smo jih prejeli v obdobju 1997-2006. Vzorce smo preiskali z izolacijo virusa na občutljivi celični kulturi, kateri sledi dokaz virusne nukleinske kisline z molekularno</p>

		<p>metodo RT-PCR.</p> <p>Z molekularno metodo RT-PCR smo dokazovali 303 nukleotidov dolg tarčni odsek gena za virusni glikoprotein G. Od vseh preiskanih vzorcev smo prisotnost virusne nukleinske kisline potrdili pri 17 vzorcih.</p> <p>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 (Francija) in M-Eur-2 (Italija).</p> <p>Slovenski izolati virus IHN so uvrščeni v gensko skupino M. Znotraj genske podskupine M-Eur-2 slovenski izolati oblikujejo samostojno monofiletsko skupino.</p>
	ANG	<p>Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) is the causative agent of infectious hematopoietic necrosis (IHN) a lethal disease of salmonid fish. Mortality in juvenile fish populations can reach up to 100% and in adult fish between 30-70% mortality has been reported. IHN is an economically serious disease of salmonid aquaculture. In Slovenia IHN is widespread and was first isolated in our laboratory in 1996. Following isolation by cell culture, a one-step RT-PCR was performed to confirm the presence of the virus. In this research study a comprehensive genetic characterization of 17 Slovene IHNV isolates obtained from 1997 to 2006 was performed using a 303bp nucleotide fragment of the glycoprotein (G) gene. Probably due to an intensive trade of infected eggs and fish, IHNV was introduced into Europe from USA. In 1987, IHN was detected in France and Italy for the first time. Consequently, IHNV was then distributed to other European countries, however the route of IHNV introduction to Slovenia is unknown. European IHN viruses within M genogroup could be distinguished in 2 subgroups: M-Eur1 comprises isolates that originally stem from France, whereas M-Eur2 includes more isolates of Italian origin. The phylogenetic analysis revealed that 13 of 17 IHNV Slovene isolates cluster together with other European IHNV isolates in two subgroups (M-Eur1 and M-Eur2) within genogroup M and that all the Slovene isolates analysed expressed a low genetic diversity. It is important to note that 4 Slovenian isolates within genetic subgroup M-Eur2 were clearly separated from other European IHNV isolates inside M-Eur2.</p>
	Objavljeno v	<p>European Association of Fish Pathologists; Bulletin of The European Association of Fish Pathologists; 2011; Vol. 31, no. 2; str. 47-57; Impact Factor: 0.288; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.672; WoS: JU, PI; Avtorji / Authors: Grilc Fajfar Aleksandra, Jenčič Vlasta, Mankoč Sara, Barlič-Maganja Darja, Hostnik Peter</p>
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	3442810
		Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p>SLO Ugotavljanje in molekularna karakterizacija koi herpes virusa (KHV) v Sloveniji</p> <p>ANG The detection and molecular characterization of koi herpesvirus (KHV) in Slovenia</p>
	Opis	<p>SLO Vzrok za bolezen koiherpes pri krapovskih vrstah rib je cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3), o katerem poročajo iz najmanj 30 držav. Prvo poročilo o kliničnem primeru bolezni v Sloveniji je iz leta 2008 v ribniku Betnava pri Mariboru. Avgusta 2008 je bila okužba ugotovljena še v dveh ribnikih ob reki Dravi, v Vidmu pri Ptujju. V septembru 2008 je bila okužba potrjena v dveh ribnikih pri mariboru in v ribniku Gorišnica pri Ptujju. Dve leti pozneje, leta 2010 je bilo potrjenih sedem izbruhov v Rogoznici blizu Ptujja. V vzorcih rib je bil v vseh primerih potrjen genom KHV. Na genu za timidin kinazo smo z metodo sekvencioniranja smo dokazali 100% sorodnost med posameznimi izolati. To je prvo poročilo o KHV v Sloveniji.</p>

		<p>Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) is the aetiological agent of koi herpesvirus disease (KHVD), responsible for the high mortalities of common carp (<i>Cyprinus carpio carpio</i>), ghost carp (<i>Cyprinus carpio goi</i>) and koi carp (<i>Cyprinus carpio koi</i>) reported from at least 30 countries. The first clinical outbreak in Slovenia was reported from a pond in Betnava, near Maribor, in July 2008. In August 2008, another two ponds were confirmed as KHV-positive, one near the first outbreak and the other down the river Drava in Videm, near Ptuj. In September 2008, KHV was detected in two ponds near Maribor and in a pond in Gorišnica, near Ptuj. Two years later, in July 2010, a seventh outbreak of KHV was confirmed in Rogoznica, near Ptuj. Samples from all seven clinical outbreaks contained the KHV genome, as shown by polymerase chain reaction (PCR). The partial nucleotide sequences of thymidine kinase (TK) from the seven KHV outbreaks reported confirmed a 100% nucleotide identity with each other and with other KHV strains such as KHV-U and KHV-I. This is the first report of KHV in Slovenia.</p>
	Objavljeno v	European Association of Fish Pathologists; Bulletin of The European Association of Fish Pathologists; 2011; Vol. 31, No. 6; str. 219-226; Impact Factor: 0.288; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.672; WoS: JU, PI; Avtorji / Authors: Toplak Ivan, Grilc Fajfar Aleksandra, Hostnik Peter, Jenčič Vlasta
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	3277178 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<p><i>SLO</i> Prva izolacija in genotipizacija virusov pri nedavnih izbruhih virusne hemoragične septikemije (VHS) v Sloveniji</p> <p><i>ANG</i> First isolation and genotyping of viruses from recent outbreaks of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Slovenia</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Okužbo z virusom VHS smov Sloveniji prvič ugotovili v novembru in decembru 2007 v dveh ribogojnicah v Sloveniji. V letu 2008 in 2009 se je okužba razširila na štiri druge ribogojnice šarenk. V času okužbe je bila opažena visoka stopnja smrtnosti s tipičnimi kliničnimi znaki bolezni. Virus VHS je bil dokazan z testom izolacije virusa na celični kulturi, imunoperoksidaznim testom, testom verižne reakcije s polimerazo in filogenetsko analizo produkta. Na osnovi rezultatov določanja nukleotidnega zaporedja na prvem segment (1524 nukleotidov) in 9 segmentu (600 nukleotidov) gena za glikoprotein je imelo vseh 9 izolatov VHS visoko stopnjo sorodnosti (99 – 100% sorodnost. Uvrstili smo jih v podskupino Ia genotipa I, ki so zelo sorodni Nemškimi izolatom. Na podlagi filogenetskih analiz in epidemiološke študije je bilo potrjeno, da je bil virus VHS vnešen v Slovenijo z uvozom živih rib, kakor tudi okužba med posameznimi ribogojnicami. molekularna diagnostična metoda RT-PCR predstavlja uporabno orodje za hitro postavitve diagnoze oz. dokaz virusnega povzročitelja, analiza nukleotidnih zaporedij pa identifikacijo virusnega izolata in posledično tudi pota širjenja okužbe. To je prvo poročilo o izbruhu VHS v Sloveniji po eradikaciji te bolezni izvedene leta 1977.</p> <p><i>ANG</i> In November and December 2007, the virus causing viral haemorrhagic septicaemia (VHS) was detected in rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> from 2 fish farms in Slovenia. During 2008 and 2009 the infection spread only among rainbow trout farms and 4 new outbreaks were confirmed. High mortality and clinical signs of VHS were observed among the diseased fish. VHSV was confirmed by virus isolation, immunoperoxidase test, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and phylogenetic analysis. Based on 1 complete (1524 nucleotides [nt]) and 9 partial (600 nt) glycoprotein gene nucleotide sequences, 9 VHSV isolates from the 6 VHS outbreaks were genetically closely related (99 to 100% identity), and were classified into the Subgroup I-a of Genotype I, most closely related to the German isolates Dstg21-07, Dstg36-06, and Dstg54-1-07 (99 to 100% identity). Phylogenetic analysis and epidemiological investigations</p>



		confirmed that the VHS virus had been (re)introduced with imported live fish, and that subsequent outbreaks were linked to the initial infection. Our study shows that direct nucleotide sequencing of RT-PCR products, amplified from the tissue of VHSV-infected fish, represents a reliable tool for fast routine genotyping in diagnostic laboratories. This is the first report of a natural epidemic associated with VHSV infection in Slovenia since the eradication of the disease in 1977.
Objavljeno v		Inter-Research; Diseases of aquatic organisms; 2010; Vol. 92; str. 21-29; Impact Factor: 1.572; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.937; A': 1; WoS: JU, ZC; Avtorji / Authors: Toplak Ivan, Hostnik Peter, Rihtarič Danijela, Olesen Niels Jorgen, Skall Helle Frank, Jenčič Vlasta
Tipologija	1.01	Izvirni znanstveni članek

### 9. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine<sup>8</sup>

Družbenoekonomsko relevantni dosežki		
1.	COBISS ID	3520378 Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Krapogojstvo in zdravstveno varstvo v Sloveniji <i>ANG</i> Carp production and health management in Slovenia
	Opis	<i>SLO</i> Na posvetu v zvezi z izvajanjem ukrepov iz Direktive 2006/ES na področju KHV v državah evropske skupnosti, ki jo je organizirala Evropska komisija v sodelovanju z avstrijsko veterinarsko upravo smo poročali o proizvodnji krapov, o organizaciji zdravstvenega varstva v Sloveniji in jih tudi seznanili s raziskavo na področju virusnih okužb pri sladkovodnih ribah s poudarkom na ugotavljanju KHV. <i>ANG</i> At the conference on the implementation of the measures from the Directive 2006/EC for the KHV in the european countries, organized by the European Commission in the cooperation with the Austrian veterinary administration, we reported on carp production, organization of the veterinary service in Slovenia and also talk about the research project of viral infections in freshwater fish, with emphasize on the detection of KHV.
	Šifra	F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
	Objavljeno v	European Commision Brussels; Programm; 2012; Str. [1-30]; Avtorji / Authors: Jenčič Vlasta, Arič Tina
	Tipologija	1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci

### 10. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>9</sup>

Dr. Peter Hostnik: predsednik Strokovnega sveta Nacionalnega veterinarskega inštituta

Dr. Aleksandra Grilc Fajfar: zaključila doktorsko disertacijo z naslovom: Uporabnost nekaterih viroloških metod v diagnostiki infektivne hematopoetske nekroze postrvi (IHN) ter molekularna opredelitev slovenskih izolatov virusa IHN (Application of some diagnostic methods for infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) disease and molecular determination of Slovene IHNV isolates, 186 str.

### 11. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>10</sup>

#### 11.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>11</sup>

*SLO*



Uvedena metoda koncentriranja virusov rib v vodi in njena validacija ter standardizacija predstavljajo pomemben prispevek v razvoju metod koncentracije virusov iz vode in bo po objavi rezultatov v znanstvenem članku dostopna javnosti. Tudi metoda za koncentracijo virusa KHV in uporaba koncentrata v diagnostični metodi qPCR še ni opisana. Z opisanim načinom koncentriranja smo povečali koncentracijo KHV v vzorcu v povprečju za 100X. Dokazovanje okužbe neposredno iz vode je možno, vendar ima v fazi kronične okužbe zaradi nizke koncentracije virusa v vodi določene omejitve. Najboljše rezultate za nadzor bolezni vsekakor prinese kombinacija rezultatov različnih metod. V kronični fazi bolezni v prvi vrsti priporočamo odvzem krvnih vzorcev rib v starosti od enega leta dalje, vzorec vode iz bazena in vzorčenje morebitno klinično bolnih rib. S kombinacijo teh metod lahko prisotnost okužbe dokažemo tudi v času, ko ribe ne kažejo kliničnih znamenj bolezni, kar je novost v diagnostiki okužb z virusi IHN, VHS in KHV. Posebej je treba poudariti, da pri seroloških metodah rib za preiskavo ni treba žrtvovati, kar je težnja v diagnostiki bolezni rib v prihodnosti v celotni Evropski uniji.

ANG

The introduced method of concentrating the fish viruses in the water, its validation and standardization represent an important contribution to the knowledge of the virus concentration from the water and will be after publishing in the scientific article available to the broader society. A method for the KHV concentration and the use of the concentrate in the qPCR diagnostic method has not been described, yet. We have proved that the virus concentration method sensitivity is up to 100x.

The evidence of the KHV infection directly from water is possible; however in the chronic phase of the infection due to the low concentration of the virus in water has the limitations. The best results for the diseases control are definitely achieved by combining results from the different diagnostic methods.

In the chronic stage of the disease in the fish older than one year is the first choice the serology of the blood samples, than the water samples and sampling potentially clinically diseased fish is recommended. With the combination of these methods the presence of the infection at any the time and also when the fish show no clinical signs of diseases the viruses IHN, VHS and KHV could be proven, which is new in fish diseases diagnostic. It should also be emphasized that the development of diagnostic methods, which do not require to scarifying fish, are the tendency for the diagnosis of fish diseases in the European Union in the future.

## 11.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>12</sup>

SLO

V Sloveniji ima ribogojstvo dolgoletno tradicijo in je pomembno iz gospodarskega in naravovarstvenega stališča. Vedno smo imeli organiziran nadzor v ribogojnicah in visoke zdravstvene standarde. Za dober zdravstveni status je potrebno raziskovanje in nadgrajevanje znanja kot osnovo za ustrezen mehanizem nadzora. Dosledno spremljanje zdravstvenega stanja akvakultur je bistveno za učinkovito preprečevanje novih okužb in zmanjševanje smrtnosti v okuženi jati ob izbruhu bolezni. Z vstopom v Evropsko unijo se je spremenila zakonodaja na področju trgovanja, ki dovoljuje trgovanje z ribami med ribogojnicami in območji z enakim zdravstvenim statusom. Možno je tudi trgovanje med okuženimi ribogojnicami, kar predstavlja veliko tveganje za vnos in širjenje bolezni. Težnja evropske zakonodaje je, da bi imelo čim več ribogojnic, posameznih območij ali področje celotne države zdravstveni status prost VHS in/ali IHN ter KHV. Za pridobitev teh statusov je nujno tudi poznavanje stanja glede virusnih okužb rib v odprtih vodah. Rezultati naše raziskave, ki dajejo vpogled v stanje glavnih odprtih voda, ki so bile v kakršnem koli stiku z ugotovljenimi okužbami, so temelj za morebitne odločitve o pristopih ribogojnic oziroma območij k pridobivanju statusov »bolezni prosta ribogojnica in/ali cona, kompartment«. To je zlasti pomembno za ribogojnice, ki vzrejajo ribe za poribljavanje oziroma repopulacijo odprtih voda. Na osnovi dobljenih rezultatov bomo lahko postavili strategijo pristopa k aktivnostim za pridobitev statusa »VHS in/ali IHN prosta ribogojnica« ali »VHS in/ali IHN prosta cona ali kompartment«, saj so rezultati viroloških preiskav postrvi v odprtih vodah spodbudni. Zlasti je treba poudariti, da v nobenem serumskem vzorcu postrvi nismo ugotovili protiteles proti virusu VHS. Ugotovitev protiteles proti virusu KHV pa kaže, da so se krapi v naših ribnikih pogosto srečali z virusom in je pri vzreji in morebitnih poslabšanih

pogojih vzreje, ko je pričakovati klinične pojave bolezni in pogine potrebna pozornost, saj je bolezen izrazito povezana s stresom.  
V raziskavi smo razvili in uvedli tudi način vzorčenja in laboratorijske diagnostične metode, ki nam bodo omogočale praktičen in hiter pristop k nadaljnjemu ugotavljanju zdravstvenega stanja rib v naših ribogojnicah in odprtih vodah. Zlasti dobrodošlo je ugotavljanje virusa KHV v brisu škrg in ugotavljanje protiteles proti vsem trem preiskovanim boleznim, pri katerih rib za preiskavo ni treba žrtvovati.

ANG

Aquaculture, which has a long tradition in Slovenia, is very important from the economic and conservation point of view. We always had organized health control of fish farms that ensured high health standards. Permanent research and advanced knowledge are the basis to maintain the best possible health status and to set up appropriate control mechanism. Strict monitoring of the health status of fish in the aquaculture is essential for the effective prevention of the new infections and reducing the mortality during the disease outbreaks.  
Entering to the European Union the legislation has changed and allowed fish trade between the farms and areas with the same health statuses.  
It is also possible to trade between the infected fish farms, which represents a high risk of introducing and spreading new diseases. The objective of the Council Directive 2006/88/EC and the relevant Slovene regulations is to have as many fish farms, regions or entire countries with health statuses "free of VHS or/and of IHN, as well KHV". In order to obtain such statuses it is necessarily to be aware of the viral infections of fish in the open waters.  
The results of our research provide the insight of the viral infections of fish in the major open water, which had been in contact with the identified infections in the fish farms. The obtained results are encouraging for the trout viruses and could be the base for the strategy of obtaining health statuses "VHS and/or IHN free" farm or zone/compartiment which is particularly important for the fish farms where fish are bred for restocking fishing waters.  
In particular, it should be emphasized that neither virus nor antibodies against VHS were detected in any trout sample. However, the presence of antibodies against KHV in the ponds and lakes are relatively high given that only in two sites clinical outbreaks of the KHV were reported before.  
In addition, were also developed the sampling methods and introduced laboratory diagnostic procedures introduced which will enable us fast and practical approach for the further determination the fish health statuses in fish farms and in the open waters in the future.  
It is also important that the detection the KHV in the gill swabs was established and the diagnostic procedures for the detecting of all three viruses: IHN, VHS and KHV were introduced. These diagnostic methods are also appreciated because there is no need to sacrifice the fish which is important for the fish welfare.

## 12. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine.

### 12.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

**Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?**<sup>13</sup>

Rezultati raziskave so zanimivi in uporabni za široko ribiško in ribogojno javnost. Rezultate bodo lahko uporabili sodelavci Zavoda za ribištvo, ribiči Ribiške zveze Slovenije, člani Društva rejcev vodnih živali in širša javnost.

### 12.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih

pri mednarodnih uporabnikih

**Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>14</sup>

- Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland
- National Veterinary Institute, Technical University of Denmark
- Central Veterinary Institute of Wageningen, NRL for Fish diseases, Nederland
- Friderich Löffler Institut, Nationales Referenzlabor für Koi-Herpes-Virusinfektion, Insel Riems, Germany
- AFSSA Lab.D'études et de Recherches en Pathologie des poissons, Brest, France

**Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:**<sup>15</sup>

Dolgoletno sodelovanje z omenjenimi inštituti in laboratoriji je dobrodošlo in se obrestuje predvsem pri reševanju aktualnih diagnostičnih problemov, pridobili pa smo tudi referenčni material (pozitivne in negativne kontrole serumskih vzorcev, virusni izolati) in diagnostične protokole za nekatere vpeljane diagnostične metode. Plod uspešnega sodelovanja je tudi skupna objava in objave, ki jih še načrtujemo po objavi rezultatov, ki smo jih pridobili v končani raziskavi »Epidemiološka raziskava virusnih okužb pri sladkovodnih ribah v Sloveniji«.

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino letnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi študijo ali elaborat, skladno z zahtevami sofinancerjev

**Podpisi:**

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza v Ljubljani, Veterinarska  
fakulteta

Vlasta Jenčič

**ŽIG**

Kraj in datum:

**Oznaka prijave: ARRS-CRP-ZP-2012-05/35**

<sup>1</sup> Zaradi spremembe klasifikacije je potrebno v poročilu opredeliti raziskovalno področje po novi klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

<sup>2</sup> Podpisano izjavo sofinancerja/sofinancerjev, s katero potrjuje/jo, da delo na projektu potekalo skladno s programom, skupaj z vsebinsko obrazložitvijo o potencialnih učinkih rezultatov projekta obvezno priložite obrazcu kot priponko (v skeniranem PDF formatu) in jo v primeru, da poročilo ni polno digitalno podpisano, pošljite po pošti na Javno agencijo za raziskovalno dejavnost RS. [Nazaj](#)

<sup>3</sup> Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku) [Nazaj](#)

## Zaključno poročilo o rezultatih ciljnega raziskovalnega projekta - 2012

<sup>4</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>5</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>6</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

<sup>7</sup> Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

<sup>8</sup> Znanstveni in družbeno-ekonomski dosežki v programu in projektu so lahko enaki, saj se projektna vsebina praviloma nanaša na širšo problematiko raziskovalnega programa, zato pričakujemo, da bo večina izjemnih dosežkov raziskovalnih programov dokumentirana tudi med izjemnimi dosežki različnih raziskovalnih projektov.

Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbenoekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen, kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno ekonomsko relevantnega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. v preteklem letu vodja meni, da je izjemen dosežek to, da sta se dva mlajša sodelavca zaposlila v gospodarstvu na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovila svoje podjetje, ki je rezultat prejšnjega dela ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

<sup>9</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

<sup>10</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja [Nazaj](#)

<sup>11</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>12</sup> Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

<sup>13</sup> Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>14</sup> Največ 500 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

<sup>15</sup> Največ 1.000 znakov vključno s presledki (velikosti pisave 11) [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2012-05 v1.00c  
C4-2D-FE-7C-C8-D0-33-AB-0F-EB-6A-F2-8A-24-10-1C-19-61-7E-EF

Priloga: daljša vsebina zaključnega poročila o rezultatih opravljenega raziskovalnega dela na projektu ciljnega raziskovalnega programa (CRP) z naslovom:

## **Epidemiološka raziskava virusnih okužb pri sladkovodnih ribah v Sloveniji**

V raziskavi smo ugotavljali razširjenost virusnih okužb sladkovodnih rib v odprtih vodah. Pri postrvih smo ugotavljali povzročitelja virusnih obolenj, virusne hemoragične septikemije (VHS) in infektivne hematopoetske nekroze (IHN), pri krapih pa povzročitelja koi herpes viroze (KHV). Vse tri bolezni se nahajajo na seznamu ne-eksotičnih bolezni Direktive sveta 2006/88/ES z dne 24. oktobra 2006 o zahtevah za zdravstveno varstvo živali in proizvodov iz akvakulture ter o preprečevanju in nadzoru določenih bolezni vodnih živali. Bolezni so zelo nalezljive. Povzročajo veliko obolevnost in smrtnost rib ter posledično veliko ekonomsko škodo v ribogojstvu. Cilj Evropske direktive je postopno izkoreninjenje bolezni v državah in pridobivanje zdravstvenih statusov (VHS in/ali IHN prosta ribogojnica, VHS in/ali IHN prosto manjše ali širše področje ali celotna država). Za strategijo pristopov k zahtevnim postopkom za pridobitev teh statusov pa je nujno tudi poznavanje stanja okužb rib v naravi, čemur je bila namenjena naša raziskava. Raziskava je vsebovala terenski in laboratorijski del in je bila razdeljena v dva sklopa. V prvem sklopu smo proučevali okužbe z virusoma VHS in IHN pri postrvih. Analizirali smo položaj ribogojnic, kjer so bile ugotovljene okužbe z omenjenima virusoma in ugotovili, od kje se ribogojnice napajajo in kam se iz njih izteka voda ter s pomočjo sodelavcev Zavoda za ribištvo Slovenije (ZRRS) naredili seznam vodotokov, kjer bi bile lahko okužene ribe. Ker se obe virusni bolezni v klinični obliki pojavljata pri nizkih temperaturah, smo ribe za preiskavo vzorčili v zimskih mesecih 2011, ko temperatura vode v vodotokih ni presegala 14°C. Ribe smo odlavljali skupaj s sodelavci ZRRS, ki so za to primerno opremljeni in usposobljeni. Na vsakem odlovnem mestu smo, če je bilo le mogoče, odlovili po 10 postrvi, v prvi vrsti šarenk (*Oncorhynchus mykiss*), če pa teh ni bilo dovolj pa tudi potočne postrvi (*Salmo trutta m fario*) ter izjemoma še druge vrste postrvi. Ob odlovu smo določili koordinate mesta odlova in temperaturo vode (°C) ter vsebnost kisika v njej (mg/l). Na tak način smo izlovili ribe v 31 izbranih vodotokih. V laboratoriju smo ribe izmerili in stehali, jim odvzeli luske za določitev starosti in opravili patoanatomsko sekcijo. Pri sekciji smo ugotovili številne nespecifične pato-anatomske spremembe, ki bi bile lahko značilne za različne kužne bolezni, diferencialno diagnostično pa bi prišli v poštev tudi VHS in/ali IHN. Ob sekciji smo ribam za preiskavo na povzročitelje virusnih bolezni odvzeli prednji del ledvic, del vranice, del srca, del možgan, pri spolno zrelih ribah pa tudi del testisa ali ovarija ter vse skupaj shranili v vnaprej pripravljene transportni tekočini (gojišče MEM, kateremu smo dodali antibiotik in antimikotik). V eni transportni tekočini smo združili organe petih rib, kar je predstavljalo en vzorec (pool). Pazili smo, da so bile v vzorcu samo šarenke ali samo potočne postrvi. Vzorce parenhimskih organov smo laboratorijsko obdelali in pripravili za izolacijo virusov na celični kulturi. Vsak vzorec (pool) smo inokulirali na dve različni celični liniji: EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) in RTG-2 (angl. rainbow trout gonad cells). Inokulirane vzorce smo v 48-urnih intervalih pregledovali na pojav morebitnega citopatskega efekta (CPE). Po 10-ih dneh smo opravili pasažo vzorca na sveži, 24 ur stari celični kulturi. Po opravljeni inokulaciji vzorca na celično linijo in pasaži smo preiskavo zaključili. Na ta način smo v 31 vodotokih po vsej Sloveniji preiskali skupno 245 postrvi (52 poolov), od tega 153 šarenk in 92 potočnih postrvi. Vsi rezultati preiskav izolacije virusov IHN in VHS na celični kulturi so bili negativni. Vse vzorce smo preiskali tudi z metodo verižne reakcije s polimerazo s predhodno reverzno transkripcijo (RT-PCR) in metodo RT-PCR v realnem času (RT-qPCR) ter metodo multiplex RT-PCR, s katero smo iskali morebitno prisotnost nukleinske kisline virusov VHS in IHN. Rezultati molekularnih diagnostičnih metod so bili pri vseh preiskovanih vzorcih negativni. Imena vod, datumi vzorčenja, število in vrsta postrvi ter pripadajoči rezultati so navedeni v Prilogi 1 tega poročila.

Pri večini do zdaj omenjenih laboratorijskih diagnostičnih metodah je potrebno za pridobitev ustreznega vzorca ribe žrtvovati. S pomočjo virus nevtralizacijskega testa, serološke metode, ki temelji na detekciji protiteles proti omenjenima virusoma, pa lahko določimo status



bolezni v ribogojnici brez žrtvovanja rib. V jeseni 2011 smo, prav tako glede na epizootiološko situacijo, pregledali 8 vodotokov. Z elektro ribolovom smo odljavljali v prvi vrsti šarenke, v kolikor njihovo število ni bilo zadostno pa tudi potočne postrvi. Na ta način smo vzorčili 55 šarenk in 20 potočnih postrvi, skupaj torej 75 postrvi, povprečno 10 iz vsakega vodotoka. Ribe smo narkotizirali, jim odvzeli kri ter jih vrnili v vodo.

Virus nevtralizacijski test je specifična metoda dokazovanja nevtralizacijskih protiteles (IgM) proti virusu IHN in virusu VHS in je primeren način spremljanja okužbe v posamezni jati rib. 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, virusna izolata 1654/08 (IHN) in 98/4 (VHSV), pozitivne in negativne serumske kontrole ter serumske vzorce, pri katerih smo določali titre nevtralizacijskih protiteles.

. Test smo izvajali v mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom v skladu z navodili AFSSA - Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija.

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

Celice smo 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 in virusu VHS preprečila pritrjevanje in vstop v občutljivo celico. Če v preiskovanem serumu ni bilo prisotnih nevtralizacijskih protiteles, smo na celičnem sloju opazili CPE.

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.

Nevtralizacijska protitelesa proti virusu IHN smo ugotovili pri eni šarenki in eni potočni postrvi iz Letuškega potoka, ki se izteka v Savinjo, eni potočni postrvi iz reke Save pri Radovljici in eni šarenki iz Kokre. Skupaj smo protitelesa proti virusu IHN ugotovili v 3 od 8 preiskovanih potokov. V eni od preiskovanih voda je rezultat preiskave predstavljal 25% pozitivnih rib v testirani populaciji, v drugih dveh pa po 10%, kar je skupaj predstavljalo 37,5% preiskovanih voda. Nevtralizacijskih protiteles proti virusu VHS nismo dokazali. Imena vodotokov, čas vzorčenja, vrste rib in rezultati so v Prilogi 2 tega poročila.

V drugem delu raziskave smo ugotavljali povzročitelja KHV pri krapih, ki je po do sedaj poznanih podatkih, edina vrsta rib, ki klinično zbolijo. KHV smo pri krapih v Sloveniji prvič ugotovili leta 2008 in videti je, da se okužba širi. Zaradi načina vzreje v krapskih ribnikih klinično sliko bolezni včasih težko pravočasno ugotovimo, problematično pa je tudi vzorčenje in izbira primernih metod dokazovanja povzročitelja glede na potek oz. fazo bolezni. Iz podatkov v literaturi smo ugotovili, da ima za zgodnje odkrivanje bolezni KHV pomembno vlogo dokazovanje prisotnosti virusa v vodi. Je pa na tem področju še veliko nepojasnjenega, kot npr. natančen sistem kroženja virusa v naravnem okolju, neposredno mesto vstopa virusa ob okužbi ali količina virusa, ki ga v okolje izloča okužena riba, kot tudi kolikšna koncentracija virusa v vodi bi bila potrebna, da se riba okuži. Vodni ekosistemi so zelo pestri in raznoliki, variirajo lahko po vrednosti pH vode, vsebnosti klorofila, organskih snovi, različnih soli in mineralov, kar v večji ali manjši meri moti uspešno dokazovanje virusov v vodi. V naši raziskavi smo vpeljali sistem membranske filtracije s pozitivno nabitimi filtri, ki deluje na principu vezavno-izpiralne tehnike, ki ima veliko prednosti kot so prilagodljivost in odprtost sistema, cenovna ugodnost in zmanjšana možnostjo kontaminacije. V sistem smo vključili tudi predfiltracijo s filtrom iz steklenih vlaken, za kar smo potrebovali večjo količino virusa. Ugotovili smo, da se s predvideno izpiralno raztopino virus KHV zelo slabo izpira iz filtrov, zato smo spremenili postopek. Nadzirali in uravnavali smo pH vode, ki lahko vpliva na uspešnost vezave virusov na membrano. Za določanje izkoristka koncentriranja

potrebujemo tudi učinkovito kvantitativno detekcijsko metodo, za kar smo v laboratoriju vzpostavili dokazovanje virusne DNA s PCR v realnem času. Optimizirali smo metodo PCR v realnem času za detekcijo tarčnega dela KHV DNA in ji glede na uporabljen komplet ter aparat za pomnoževanje in detekcijo določili učinkovitost, ki znaša 93%. Njena meja zaznavanja je 1 TCID<sub>50</sub>/ml! V testirane vzorce smo vključili tudi interno kontrolo. V vzorčenih ribniških vodah pred in po koncentriranju zaviralcev nismo zaznali, zaznali pa smo negativen vpliv v vzorcih neposredno testiranih steklenih predfiltrih in sedimentnih vod. Z vzpostavljenim sistemom dosegamo v povprečju 3% izkoristek, ki je dvakrat višji kot je bilo do sedaj objavljeno v literaturi. Rezultati kažejo, da z optimizirano metodo lahko iz ribniške vode dokažemo KHV, če je v litru vode vsaj 50 TCID<sub>50</sub> KHV. V teh sistemih je težko zagotavljati ponovljivost, ki lahko znaša tudi 3 logaritme in več, zato predstavlja le 18% koeficient variacije in standardna deviacija 0,5 ugoden rezultat. S tem načinom koncentriranja povečamo koncentracijo KHV v povprečju za 100-krat. Metodo smo uporabili pri treh ribnikih, kjer je bil v preteklosti dokazan virus KHV ali pa je obstajal sum na to bolezen, vendar KHV v njih nismo zaznali. Zaradi zahtevnosti postopkov in za to namenjenega finančnega okvira smo v nadaljevanju vzorčenje in detekcijo KHV usmerili v ribnike, kjer je aktivno potekala okužba s KHV in s tem povečali verjetnost, da bi bile v vodi večje oz. zadostne količine virusa. Vzorčenje ribniških vod smo usmerili na ribnike, kjer je bila v tej sezoni dokazana okužba s KHV pri ribah. Testirali smo vodo dveh ribnikov, kjer smo v juliju in avgustu dokazali KHV pri ribah, vendar virusa v vodi tudi po koncentriranju nismo zaznali. Prav te vode, kjer je obstajala večja verjetnost, da je virus v njih prisoten, smo koncentrirali še po postopku tangencialne ultrafiltracije, druge najbolj uporabne metode koncentriranja, ki je predvidena za čistejše vode in potrebuje še sekundarno koncentriranje. Tudi po tem postopku KHV v vodi nismo dokazali.

Pri Ribiški zvezi Slovenije (RZS) smo pridobili seznam vseh voda (jezera, ribniki, akumulacije) in vzorčna mesta odbrali tako, da smo zajeli vso Slovenijo. Vzpostavili smo stik z ribiči posameznih lokalnih ribiških družin (RD), da bi za raziskavo vzorčili krape v vodah na svojem področju. Povečini so se ribiči zelo pozitivno odzvali in nas navadno ob vikendih, ko so imeli organizirane športne ribolove, povabili, da smo ulovljenim krapom odvzeli kri. Po odvzemu pa so krape vrnil v vodo. Klinični pojav KHV je izrazito povezan s stresom. Če je bilo mogoče, so ribiči krape za preiskavo, ki so bili odlovljeni prejšnji dan, še največ 24 ur hranili v manjših bazenih, kar je predstavljalo dejavnik stresa. Tem krapom smo z vatenko odvzeli bris škrge, ki so predilekcijsko mesto vstopa virusa. Brise škrge, ki smo jih odvzeli 36 živim krapom, smo shranili v epruvetah s transportno tekočino. Z izbranimi začetnima oligonukleotidoma smo z metodo PCR specifično pomnožili regijo gena, ki kodira encim timidin kinazo. V molekularno diagnostiko bolezni KHV smo poleg metode verižne reakcije s polimerazo (PCR) vpeljali tudi metodo PCR v realnem času in sledili delovnim protokolom Instituta CVI, Lelystad, Nizozemska. Gre za 'in-house' metodo, ki je bila prvič predstavljena na srečanju Nacionalnih referenčnih laboratorijev (NRL) v Aarhusu, Danska, leta 2010. Vsi rezultati opravljenih preiskav so bili negativni.

Ker je včasih dokazovanje virusnega povzročitelja po izzveneli klinični manifestaciji bolezni v navidezno zdravi ribji populaciji nezanesljivo, smo se poleg direktnega ugotavljanja virusa usmerili tudi na posredno ugotavljanje virusa z dokazovanjem protiteles proti KHV v krvnem serumu preiskovanih rib. Odločili smo se za virus nevtralizacijski test. Pri tej serološki metodi rib ni potrebno žrtvovati, saj jih po odvzemu krvi za preiskavo vrnemo v vodo. Za preiskavo na prisotnost protiteles proti KHV smo poskusno preiskali tudi nekaj serumov krapov, ki smo jih odlovili v ribnikih, v katerih smo predvidevali, da bi bili lahko glede na epizootiološko situacijo okuženi s KHV.



Za direktne (molekularne metode) in indirektne (virus nevtralizacijski test) laboratorijske metode dokazovanja okužbe z virusom KHV smo potrebne standardne materiale pridobili v Referenčnem laboratoriju EU za ribe v Aarhusu, Danska (pozitivna kontrola virusa KHV za potrebe PCR/qPCR metod), pozitivni in negativni serum za potrebe virus nevtralizacijskega testa v Nemčiji, delovni protokoli pa so plod nekajletnega uspešnega sodelovanja z laboratorijema v Lelystadu in Brestu. Odvzem in protokol priprave vzorca za izolacijo virusne DNA smo povzeli po objavljenem članku (Bergmann in Kempster, 2011).

Za virus nevtralizacijski test smo uporabili občutljivo celično linijo CCB (angl. common carp brain), gojeno v rastnem gojišču, referenčni virusni izolat KHV, pozitivne in negativne serumske kontrole, ki smo jih pridobili v Nacionalnem referenčnem inštitutu za KHV Inštituta Fridrich-Löffler z otoka Riems, Nemčija ter serumske vzorce, pri katerih smo določali titre nevtralizacijskih protiteles. Z nevtralizacijskim testom smo v vzorcih serumov krapov dokazovali prisotnost nevtralizacijskih protiteles (IgM) proti virusu KHV.

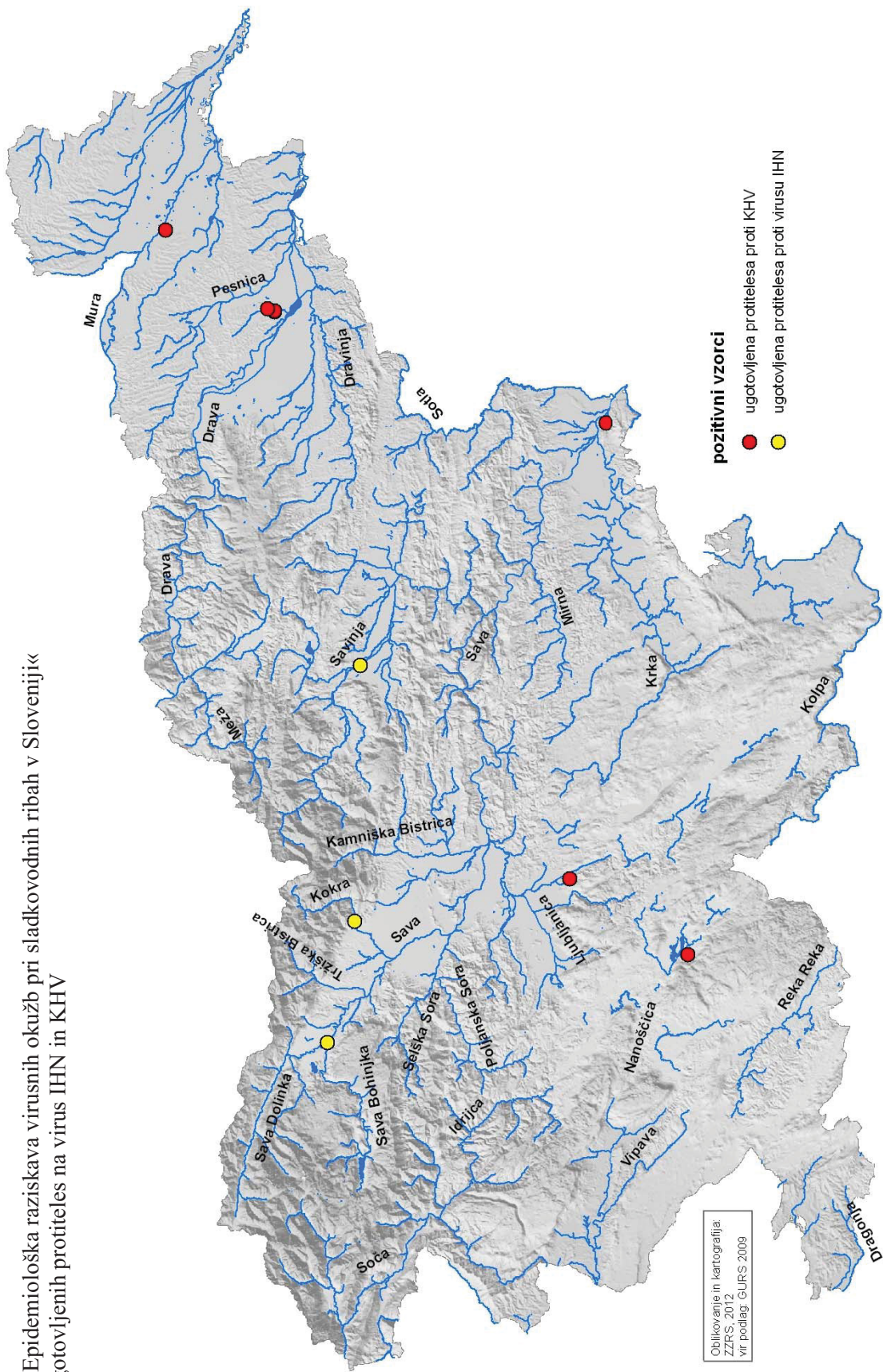
Test smo izvajali na mikrotitrskih ploščah z ravnim dnom v skladu z navodili AFSSA-Laboratorij za patologijo vodnih živali, Brest, Francija.

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

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

Na prisotnost protiteles proti virusu KHV smo preiskali 163 serumskih vzorcev krapov iz 21 izbranih ribnikov in jezer po Sloveniji. Protitelesa smo ugotovili v 9 vzorcih na 6 različnih lokacijah, v 154 vzorcih pa protiteles nismo dokazali. Protitelesa proti virusu KHV smo ugotovili pri dveh od 11 krapov iz ribnika Hrastje Mota, pri enem od 10 krapov iz ribnika Draga, Ig, pri dveh od 19 krapov iz ribnika Prilipe v okolici Brežic, pri enem od 6 krapov iz Cerknškega jezera, pri enem od 11 krapov iz Rogoze 1 ter dveh od 3 krapov iz Rogoze 2. Pri krapu, kjer smo opravili tako preiskavo na protitelesa in kot tudi na prisotnost virusa KHV v brisu škrge, je bila prva preiskava pozitivna, druga pa negativna. Prisotnost protiteles proti virusu KHV smo ugotovili na 28,5% preiskanih lokacij. Imena vod, datumi vzorčenja in pripadajoči rezultati preiskav so podani v Prilogi 3 tega poročila.

Priloga 2: »Epidemiološka raziskava virusnih okužb pri sladkovodnih ribah v Sloveniji«  
Lokacije ugotovljenih protiteles na virus IHN in KHV





Priloga 1: »Epidemiološka raziskava virusnih okužb pri sladkovodnih ribah v Sloveniji«  
 Lokacije vzorčenj postrvi in krapov

