

## II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ

## ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 19ης Νοεμβρίου 1992

για τον καθορισμό των τεχνικών δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων για την αναζήτηση και τη διαπίστωση ορισμένων ασθενειών ιχθύων

(92/532/ΕΟΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Οικονομικής Κοινότητας,

την οδηγία 91/67/ΕΟΚ του Συμβουλίου της 28ης Ιανουαρίου 1991 σχετικά με τους όρους υγειονομικού ελέγχου που διέπουν τη διάθεση στην αγορά ζώων και προϊόντων υδατοκαλλιέργειας<sup>(1)</sup>, και ιδίως το άρθρο 15,

Εκτιμώντας:

ότι, σύμφωνα με το άρθρο 15 της εν λόγω οδηγίας, πρέπει να καθοριστούν οι τεχνικές δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τη διαπίστωση ασθενειών που πλήττουν τις υδατοκαλλιέργειες·

ότι έχει ζητηθεί η γνώμη της επιστημονικής κτηνιατρικής επιτροπής που συστάθηκε με την απόφαση 81/651/ΕΟΚ της Επιτροπής<sup>(2)</sup>·

ότι τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της Μόνιμης Κτηνιατρικής Επιτροπής,

*Άρθρο 1*

Οι τεχνικές δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τη διαπίστωση της λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης (ΙΗΝ) και της ιογενούς αιμορραγικής σηψαιμίας (VHS) καθορίζονται στο παράρτημα.

*Άρθρο 2*

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 19 Νοεμβρίου 1992.

*Για την Επιτροπή*

Ray MAC SHARRY

*Μέλος της Επιτροπής*

<sup>(1)</sup> ΕΕ αριθ. L 46 της 19. 2. 1991, σ. 1.

<sup>(2)</sup> ΕΕ αριθ. L 233 της 19. 8. 1981, σ. 32.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΜΕΡΟΣ I

## ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ VHS ΚΑΙ IHN

## I. Δειγματοληψία

## 1. Χρόνος δειγματοληψίας

Οι εκμεταλλεύσεις επιθεωρούνται κλινικά τουλάχιστον δύο φορές το χρόνο κατά την περίοδο από Οκτώβριο έως Ιούνιο ή όποτε η θερμοκρασία του νερού είναι κατώτερη των 14 °C. Τα διαστήματα μεταξύ των ελέγχων πρέπει να διαρκούν τουλάχιστον τέσσερις μήνες. Επιθεωρούνται όλες οι μονάδες παραγωγής (λίμνες, δεξαμενές, ενυδρεία, δικτυοκλωβοί κ.λπ.) ως προς την παρουσία ιχθύων νεκρών, αδύναμων ή ανώμαλα συμπεριφερόμενων. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην περιοχή απορροής νερού (εάν είναι εφικτό), όπου τείνουν να συγκεντρωνούνται αδύναμοι ιχθύες λόγω του υδατικού ρεύματος.

## 2. Επιλογή και συλλογή δειγμάτων

Συλλέγονται 30 έως 150 ιχθύες ή/και υγρά δείγματα από ωοθήκες σε σχέση με τους ελέγχους σύμφωνα με τον πίνακα 1Α. Εάν υπάρχουν ιριδοειδείς πέστροφες, ολόκληρο το δείγμα πρέπει να αποτελείται από ιχθύες του είδους αυτού. Εάν δεν υπάρχουν ιριδοειδείς πέστροφες, το δείγμα πρέπει να περιέχει ιχθύες όλων όσων άλλων ειδών παρόντων οποτεδήποτε τα είδη αυτά είναι ευαίσθητα σε VHS ή/και IHN (όπως καταγράφονται στο παράρτημα Α της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ σχετικά με τις συνθήκες υγιεινής ζώων που διέπουν τη διάθεση στην αγορά ζώων και προϊόντων υδατοκαλλιέργειας). Τα είδη πρέπει να αντιπροσωπεύονται εξίσου στο δείγμα. Κατά την αρχική τετραετή περίοδο ελέγχου που προηγείται της επίτευξης εγκεκριμένης κατάστασης, το μέγεθος δείγματος είναι 150, ώστε να εξασφαλιστεί ανίχνευση σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95 % φορέων ιού σε επικράτηση φορέα 2 %. Κατά τα ακόλουθα χρόνια (διατήρηση εγκεκριμένης κατάστασης) το δείγμα μπορεί να μειωθεί σε 30, ώστε να εξασφαλιστεί ανίχνευση σε επίπεδο 95 % ιού σε επικράτηση 10 % (πίνακας 1Β).

Σε εκμεταλλεύσεις με επίσημο ιστορικό απαλλαγής από VHS και IHN (βασισμένο σε πρόγραμμα τακτικού επίσημου υγειονομικού ελέγχου) μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης το μικρό μέγεθος δείγματος κατά τον αρχικό τετραετή έλεγχο.

Εάν χρησιμοποιούνται για ιχθυοπαραγωγή περισσότερες της μιας πηγές ύδατος, μπορεί να συμπεριληφθούν ιχθύες που αντιπροσωπεύουν όλες τις πηγές ύδατος σε δείγμα 150 ή 30 ιχθύων. Εάν υπάρχουν αδύναμοι, ανώμαλα συμπεριφερόμενοι ή πρόσφατα αποθανόντες (όχι αποσυντεθειμένοι) ιχθύες, πρέπει, καταρχήν, να συμπεριληφθούν στο δείγμα. Εάν δεν υπάρχουν τέτοιου τύπου ιχθύες, το δείγμα πρέπει να αποτελείται από κανονικά εμφανιζόμενους, υγιείς ιχθύες που έχουν συλλεχθεί έτσι ώστε όλα τα τμήματα του εκτροφείου, καθώς και όλες οι τάξεις ηλικίας, να αντιπροσωπεύονται στο δείγμα.

## 3. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων ιχθύων

Πριν την αποστολή ή μεταφορά στο εργαστήριο, απομακρύνονται τμήματα των οργάνων προς εξέταση από τον ιχθύ με αποστειρωμένο ψαλίδι και λαβίδα και μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν υπόστρωμα μεταφοράς, δηλαδή υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας με 10 % ορό μόσχου και αντιβιοτικά. Συνίσταται, για παράδειγμα, ο συνδυασμός 200 UI πενικιλίνης, 200 μg στρεπτομυκίνης και 200 μg καναμυκίνης ανά ml, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα αντιβιοτικά αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας. Το ιστολογικό υλικό προς εξέταση είναι σπλήνα, πρόσθιο νεφρό, εγκέφαλος και, σε μερικές περιπτώσεις, υγρό ωοθήκης (πίνακες 1Α και 1Β).

Τμήματα οργάνων από 5 έως 10 ιχθύες (πίνακες 1Α και 1Β) μπορούν να συλλεχθούν σε ένα σωλήνα και να αντιπροσωπεύουν ένα συγχωνευμένο δείγμα. Ο ιστός σε κάθε δείγμα πρέπει να ζυγίζει τουλάχιστον 1 g, έτσι ώστε το τελικό διάλυμα να είναι 1:10.

Οι σωλήνες τοποθετούνται σε μονωμένα δοχεία (για παράδειγμα κουτιά με παχύ τοίχωμα πολυστυρένιου) μαζί με αρκετό πάγο ή «παγοκλώνες» για να εξασφαλιστεί, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς στο εργαστήριο, η ψύξη των δειγμάτων μεταξύ 0 και 5 °C. Πρέπει να αποφεύγεται η κατάψυξη των δειγμάτων.

Η ιολογική εξέταση πρέπει να ξεκινήσει το δυνατόν συντομότερα και όχι αργότερα από 48 ώρες μετά τη συλλογή των δειγμάτων. Εάν οι ιχθύες προς εξέταση έχουν μήκος μικρότερο από 6 cm, μπορούν να αποσταλούν στο εργαστήριο ολόκληροι μέσα σε πλαστικούς σάκους ψυχθέντες ως ανωτέρω.

#### 4. Συλλογή συμπληρωματικού υλικού

Ανάλογα με τη συμφωνία με σχετικό διαγνωστικό εργαστήριο, μπορούν να συλλεγούν και άλλοι ιστοί ιχθύων και να προετοιμαστούν για τις συμπληρωματικές εξετάσεις.

### II. Προετοιμασία των δειγμάτων για ιολογική εξέταση

#### 1. Ομογενοποίηση οργάνων

Στο εργαστήριο πρέπει να ομογενοποιηθεί εντελώς (με χωνευτήρα, αναμεικτή ή ιγδίο) ο ιστός στους σωλήνες και στη συνέχεια να τοποθετηθεί σε μορφή εναιωρήματος στο αρχικό υπόστρωμα μεταφοράς. Εάν ένα δείγμα αποτελείται από ολόκληρους ιχθύες, δηλαδή ιχθύες μήκους μικρότερου από 6 cm, αυτοί τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι μετά από αφαίρεση του σώματος όπισθεν του ανοίγματος εντοσθίων, ομογενοποιούνται ως ανωτέρω και εναιωρούνται σε αναλογία 1:10 στο υπόστρωμα μεταφοράς.

#### 2. Φυγοκέντρηση του πολτού

Ο πολτός φυγοκεντρείται σε καταψυχόμενη φυγοκέντρο στους 2 °C – 5 °C στα 2 000–4 000 × g επί 15 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό προς εξέταση.

Εάν η αποστολή του δείγματος έγινε μέσα σε υπόστρωμα μεταφοράς (δηλαδή με έκθεση σε αντιβιοτικά), το υπερκείμενο υγρό δεν χρειάζεται περαιτέρω μεταχείριση με αντιβιοτικά.

Εάν το δείγμα έχει αποσταλεί υπό μορφή ολόκληρων ιχθύων, ο πολτός μετά τη φυγοκέντρηση πρέπει να επεκταθεί στα αντιβιοτικά στο υπόστρωμα μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε για επαναιώρηση είτε επί τέσσερις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου είτε ολονυκτίς στους 4 °C.

Η αντιβιοτική μεταχείριση αποσκοπεί στον έλεγχο της βακτηριακής μόλυνσης των δειγμάτων που καθιστά περιττή τη διήθηση μέσω μεμβρανικών φίλτρων.

Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση, αναμειγνύεται ένας όγκος του υπερκείμενου υγρού με ίσα μέρη ενός κατάλληλα αραιωμένου δισθενούς αντιορού στον ιό IPN (στελέχη αναφοράς Sp και Ab) και επωάζονται με αυτό επί τουλάχιστον μία ώρα στους 15 °C ή το πολύ επί 18 ώρες στους 4 °C. Ο τίτλος του αντιορού πρέπει να είναι τουλάχιστον 1/2 000 σε δοκιμή εξουδετέρωσης 50 % της επιφανειακής πλάκας.

Η μεταχείριση όλων των εμβολίων με αντιορό στον ιό IPN (ιός που σε ορισμένα μέρη της Ευρώπης εκδηλώνεται στο 50 % των δειγμάτων ιχθύων) αποσκοπεί στην αποτροπή ανάπτυξης ΚΠΦ, οφειλόμενου στον ιό IPN, σε εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες. Αυτό θα μειώσει τη διάρκεια των βιολογικών εξετάσεων, καθώς και τον αριθμό των περιπτώσεων στις οποίες η εμφάνιση του ΚΠΦ θα έπρεπε να θεωρηθεί δυνάμει ενδεικτική για VHS ή IHN.

Όταν τα δείγματα προέρχονται από μονάδες παραγωγής που θεωρούνται απηλλαγμένες από IPN, μπορεί να παραλειφθεί η μεταχείριση των εμβολίων με αντιορό στον ιό IPN.

### III. Ιολογική εξέταση

#### 1. Κυτταροκαλλιέργειες και υποστρώματα

Αναπτύσσονται κύτταρα BF-2 και είτε EPC είτε FHM στους 20 °C με 25 °C σε Eagle's MEM (ή τροποποιήσεις αυτού) με συμπλήρωμα 10 % βοείου εμβρυακού ορού και αντιβιοτικών σε τυποποιημένες συγκεντρώσεις.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κλειστά φιαλίδια, το υπόστρωμα ρυθμίζεται με διττανθρακικό. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για καλλιέργεια κυττάρων σε ανοικτές μονάδες πρέπει να ρυθμιστεί με Tris-HCL (23 mM) και διττανθρακικό νάτριο (6 mM) σε pH κατά το δυνατό πλησιέστερο του 7,6, που είναι δέλτιστο για πολλαπλασιασμό ιών.

Οι κυτταροκαλλιέργειες που θα χρησιμοποιηθούν για εμβολιασμό με ιστολογικό υλικό πρέπει να είναι πρόσφατες (ηλικίας 4–48 ωρών) και ενεργά αναπτυσσόμενες (όχι συρρέουσες) κατά τον εμβολιασμό.

#### 2. Εμβολιασμός των κυτταροκαλλιεργειών

Εμβολιάζεται εναιώρημα οργάνου επεξεργασμένο με αντιβιοτικά μέσα σε κυτταροκαλλιέργεια σε δύο διαλύματα: το αρχικό διάλυμα και, επιπρόσθετα, μία αραιώση 1:100 αυτού (για να αποφευχθεί ομόλογη αλληλεπίδραση). Πρέπει να εμβολιαστούν τουλάχιστον δύο σειρές κυττάρων (βλέπε III.1). Η αναλογία μεγέθους εμβολίου και όγκου υποστρώματος κυτταροκαλλιέργειας πρέπει να είναι περίπου 1:10.

Για κάθε αραιώση και για κάθε σειρά κυττάρων πρέπει να χρησιμοποιηθεί ελάχιστη κυτταρική επιφάνεια περίπου 2 cm<sup>2</sup>, αντιστοιχούσα σε μία κοιλότητα δίσκου κυτταροκαλλιέργειας των 24 κοιλοτήτων. Συνίσταται η χρήση δίσκων κυτταροκαλλιέργειας, αλλά είναι επίσης αποδεκτές και άλλες μονάδες με παρόμοια ή μεγαλύτερη επιφάνεια ανάπτυξης.

3. *Επώαση των κυτταροκαλλιέργειών*

Επωάζονται εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες στους 15 °C επί επτά ημέρες. Εάν το χρώμα του υποστρώματος της κυτταροκαλλιέργειας αλλάξει από κόκκινο σε κίτρινο, υποδηλώνοντας οξίνιση υποστρώματος, πρέπει να πραγματοποιηθεί προσαρμογή του pH με αποστειρωμένο διάλυμα διττανθρακικού ή ισοδύναμες ουσίες για να εξασφαλιστεί η επιδεκτικότητα των κυττάρων στη μόλυνση από τον ιό.

Πραγματοποιείται ανά έξι μήνες τιτλοδότηση κατεψυγμένων αποθεμάτων ιών VHS και IHN για να πιστοποιηθεί η επιδεκτικότητα των κυτταροκαλλιέργειών στη μόλυνση.

4. *Μικροσκόπηση*

Επιθεωρούνται καθημερινά εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες ως προς την εμφάνιση ΚΠΦ σε μεγέθυνση περίπου 40. Εάν παρατηρηθεί εμφανές ΚΠΦ, πρέπει να αρχίσουν αμέσως διαδικασίες ταυτοποίησης με το τμήμα IV.

Συγχρόνως, αναλαμβάνονται κατάλληλες ενέργειες για να ανασταλεί η εγκεκριμένη κατάσταση της μονάδας παραγωγής από την οποία προήλθε το θετικό για ιό δείγμα, καθώς και κάθε μονάδας παραγωγής που έπεται.

Η αναστολή της εγκεκριμένης κατάστασης πρέπει να διατηρηθεί έως ότου εργαστηριακοί έλεγχοι αποδείξουν ότι ο υπό εξέταση ιός δεν είναι VHS ή IHN. Για τον προσδιορισμό του ιού χορηγούνται το μέγιστο τέσσερις εβδομάδες, συμπεριλαμβανομένου και του απαιτούμενου χρόνου για εξέταση σε εργαστήρια αναφοράς.

5. *Επιμέρους*

Εάν δεν έχει αναπτυχθεί ΚΠΦ μετά από επώαση επτά ημερών, πραγματοποιείται επιμέρους καλλιέργεια σε πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιώντας κυτταρική επιφάνεια παρόμοια με αυτή της αρχικής καλλιέργειας.

Συγκεντρώνονται σύμφωνα με τη σειρά των κυττάρων υποπολλαπλάσια του υποστρώματος από όλες τις καλλιέργειες/κυλότητες αποτελούσες την αρχική καλλιέργεια, ακολουθώντας έναν κύκλο ψύξης-απόψυξης των καλλιερειών και 0,5 ml υποστρώματος αναμειγνύονται με ίσα μέρη αντιορού στον IPN όπως περιγράφεται στο τμήμα II.2 και το μείγμα επωάζεται στους 15 °C επί 60 λεπτά. Μετά, το μείγμα εμβολιάζεται σε ομόλογες κυτταροκαλλιέργειες σε αραιώσεις 1:1 και 1:100, όπως περιγράφεται στο τμήμα III.2. Του εμβολιασμού μπορεί να προηγηθεί προεπώαση των διαλυμάτων με δισθενή αντιορό στο ιό IPN κατάλληλη σε αραιώση.

Μετά, οι εμβολιασμένες καλλιέργειες επωάζονται επί επτά ημέρες στους 15 °C υπό παρακολούθηση, όπως στο τμήμα III.4.

## IV. Προσδιορισμός της ταυτότητας του ιού

1. *Εξουδετέρωση*

Εάν έχει παρατηρηθεί ένδειξη ΚΠΦ σε μία κυτταροκαλλιέργεια, το υπόστρωμα συλλέγεται, τα κύτταρα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας ή διήθηση μέσω μεμβράνης (0,45 μm) και το υπόστρωμα μετά αραιώνεται 1:100 και 1:10 000 με το υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας.

Αναμειγνύονται υποπολλαπλάσια των αραιώσεων και επωάζονται επί 60 λεπτά στους 15 °C μαζί με ίσα μέρη των ακόλουθων αντιδραστηρίων μεμονωμένα:

|                                                                                                        |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| — κατά ομάδα ειδικό αντίσωμα στον ιό VHS (ιός Egtvet)                                                  | 1:50 * |
| — κατά ομάδα ειδικό αντίσωμα στον ιό λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης (IHN)                          | 1:50 * |
| — ειδικός δισθενής αντιορός στον ιό λοιμώδους παγκρεατικής νέκρωσης (IPN) (στελέχη αναφοράς Sp και Ab) | 1:50 * |
| — υπόστρωμα καλλιέργειας                                                                               | 1:1    |

\* ή όπως καθορίζεται από το εργαστήριο αναφοράς σχετικά με την πιθανή κυτταροτοξικότητα του αντιορού.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι ποιότητας αναφοράς σχετικά με τον τίτλο και τον ιδιαίτερο χαρακτήρα.

Τουλάχιστον δύο κυτταροκαλλιέργειες εμβολιάζονται με 50 μl καθεμία από κάθε μείγμα ιού-ορού και μετά επωάζονται στους 15 °C. Ελέγχεται η ανάπτυξη του ΚΠΦ όπως περιγράφεται στο τμήμα III.4.

Εάν η δοκιμή δεν αποδώσει ασφαλή ταυτοποίηση του ιού εντός μίας εβδομάδας, πρέπει να αναληφθεί μία από τις ακόλουθες ενέργειες:

- μεταφορά του ιού σε εθνικό εργαστήριο αναφοράς, για τους ιούς ιχθύων προς άμεση ταυτοποίηση·
- εφαρμογή των τεχνικών IFAT (τμήμα IV.2), ELISA (τμήμα IV.3) ή άλλων τεχνικών ταυτοποίησης ιού με αντιδραστήρια ποιότητας αναφοράς.

## 2. Ανοσοφθορισμός (IFAT)

Για κάθε απομόνωση ιού που πρέπει να ταυτοποιηθεί, επικαλύπτονται τουλάχιστον οκτώ γυάλινα τριδία ή ισοδύναμά τους με κύτταρα EPC σε πυκνότητα που αποδίνει σε συρροή περίπου 60 έως 90 % μετά από 24 ώρες καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό, επιλέγονται τα κύτταρα EPC λόγω της ισχυρής προσκόλλησής τους σε γυάλινες επιφάνειες.

Όταν τα κύτταρα έχουν κατακαθίσει πάνω στη γυάλινη επιφάνεια (περίπου μία ώρα μετά την επικάλυψη), ή όταν οι καλλιέργειες έχουν επωαστεί έως και επί 24 ώρες, εμβολιάζεται ο ιός που πρέπει να ταυτοποιηθεί. Εμβολιάζονται τέσσερις καλλιέργειες σε αναλογία 1:10 κατ' όγκο και τέσσερις καλλιέργειες σε αναλογία 1:100.

Οι καλλιέργειες, 20 με 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό, εκπλύνονται δύο φορές εντός Eagle's MEM χωρίς ορό, σταθεροποιούνται με ακετόνη και έπειτα χρωνίζονται με IFAT διπλής στοιβάδας. Η πρώτη στοιβάδα αντιδραστηρίων αποτελείται από εγκεκριμένο αντιορό (όπως στο τμήμα IV.1). Η δεύτερη στοιβάδα αντιδραστηρίων είναι αντιορός, συζευγμένος με FITC, κατά της ανοσογλοβουλίνης που χρησιμοποιείται στην πρώτη στοιβάδα. Πρέπει να χρωνίζονται τουλάχιστον μία εμβολιασμένη καλλιέργεια υψηλής δόσης και μία χαμηλής δόσης για κάθε έναν από τους δοκιμαζόμενους αντιορούς. Στη δοκιμή πρέπει να συμπεριληφθούν κατάλληλοι αρνητικοί και θετικοί έλεγχοι.

Οι χρωσμένες καλλιέργειες στερεώνονται χρησιμοποιώντας αλατούχο γλυκερίνη. Εξετάζονται υπό προσπίπτον υπεριώδες φως. Χρησιμοποιούνται προσοφθάλμιοι των 10 X ή 12 X και αντικειμενικοί φακοί των X 25 ή X 40 με αριθμητικό άνοιγμα > 0,7 και > 1,3 αντίστοιχα. Οι αραιώσεις του αρχικού αντιορού και συζευγμένης με FITC αντι-ειδικής ανοσογλοβουλίνης θα εξαρτηθούν από την επιλεχθείσα ή διαθέσιμη μικροσκοπική διάταξη.

Μερικά στελέχη του ιού Egtvet αντιδρούν με αντιορό κατά του στελέχους αναφοράς F1 σε IFAT, αν και δεν αντιδρούν έντονα στις δοκιμές εξουδετέρωσης.

## 3. Δοκιμή ανοσοαπορρόφησης μέσω σύνδεσης με ένζυμο (ELISA)

Επικαλύπτονται κοιλότητες σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης (για παράδειγμα Nunc-ανοσοτρυβλία, Maxisorp, Nunc, Denmark) ολονυκτίς με συνιστώμενες αραιώσεις κλασμάτων ανοσογλοβουλίνης των αντιορών που αναφέρονται στο τμήμα IV.1, καθαρισμένης με πρωτεΐνη A.

Αφού εκπλυθούν οι κοιλότητες με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween-20, ο προς ταυτοποίηση ιός προστίθεται στις κοιλότητες σε διαδοχικές διπλές ή τετραπλές αραιώσεις και αφήνεται να αντιδράσει με το επικαλύπτον αντίσωμα επί 60 λεπτά στους 37 °C. Μετά τη έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween-20, προστίθενται βιοτινωλιωμένα αντισώματα εξειδίκευσης αντιστοιχούσης σε αυτή των επικαλυπτόντων αντισωμάτων και αφήνονται να αντιδράσουν επί 60 λεπτά στους 20 °C. Ακολουθεί και άλλη έκπλυση ως ανωτέρω, προστίθεται στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP και αφήνεται να αντιδράσει επί μία ώρα στους 20 °C. Μετά από μία τελευταία έκπλυση, το συνδεδεμένο ένζυμο γίνεται ορατό χρησιμοποιώντας κατάλληλα υποστρώματα ELISA (OPD, TMB ή άλλα).

Η ανωτέρω, βασισμένη σε βιοτινή-αβιδίνη, εκδοχή ELISA δίνεται ως παράδειγμα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες εκδοχές ELISA αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας αντί αυτής.

Πίνακας 1 Α

### Επίτευξη κατάστασης

|                                | Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ανά έτος | Εξέταση οργάνων από αριθμό ιχθύων | Εξέταση υγρών ωοθήκης από αριθμό ιχθύων |
|--------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Ηπειρωτικές ζώνες</b>       |                                        |                                   |                                         |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο      | 2                                      | 120 (1η σειρά)<br>150 (2η σειρά)  | 30 (1η σειρά)<br>0                      |
| β) Εκμεταλλεύσεις με γόνο μόνο | 2                                      | 0                                 | 150 (1η ή 2η σειρά)                     |
| γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο   | 2                                      | 150 (1η και 2η σειρά)             | 0                                       |
| <b>Παράκτιες ζώνες</b>         |                                        |                                   |                                         |
| α) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο   | 2                                      | 30 (1η και 2η σειρά)              | 0                                       |
| β) Εκμεταλλεύσεις με γόνο      | 2                                      | 120 (1η σειρά)<br>150 (2η σειρά)  | 30 (1η σειρά)<br>0                      |

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά δεξαμενή: 5.

## Πίνακας I B

## Διατήρηση κατάστασης

|                                | Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ανά έτος | Εξέταση οργάνων από αριθμό ιχθύων | Εξέταση υγρών ωοθήκης από αριθμό ιχθύων |
|--------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------|
| <i>Ηπειρωτικές ζώνες</i>       |                                        |                                   |                                         |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο      | 2                                      | 15 (1η ή 2η σειρά)                | 15 (1η ή 2η σειρά)                      |
| β) Εκμεταλλεύσεις με γόνο μόνο | 2                                      | 0                                 | 30 (1η ή 2η σειρά)                      |
| γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο   | 2                                      | 30 (1η ή 2η σειρά)                | 0                                       |
| <i>Παράκτιες ζώνες</i>         |                                        |                                   |                                         |
| α) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο   | 1                                      | 30 <sup>(1)</sup> (1η ή 2η σειρά) | 0                                       |
| β) Εκμεταλλεύσεις με γόνο      | 2                                      | 0                                 | 30 (1η ή 2η σειρά)                      |

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά δεξαμενή: 10.

(<sup>1</sup>) Τα δείγματα πρέπει να συλλεχθούν κατά τη διάρκεια των δύο έως έξι μηνών μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε αλατούχο νερό.

## ΜΕΡΟΣ II

## ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΙΗΝ ΚΑΙ VHS ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΥΠΟΨΙΑΣ ΕΠΙΔΗΜΙΑΣ

Η διάγνωση της ΙΗΝ και VHS μπορεί να επιτευχθεί με μία από τις ακόλουθες τεχνικές:

- Α. συμβατική απομόνωση ιού με ακόλουθη ορολογική ταυτοποίηση ιού,
- Β. απομόνωση ιού με ταυτόχρονη ορολογική ταυτοποίηση ιού,
- Γ. τεχνικές ταχείας διάγνωσης (IFAT, ELISA).

Η πρώτη διάγνωση ΙΗΝ και VHS σε εκτροφεία σε εγκεκριμένες ζώνες δεν πρέπει να βασίζεται στη μέθοδο Γ. Πρέπει να χρησιμοποιείται είτε η μέθοδος Α είτε η μέθοδος Β.

Το ιστολογικό υλικό που προορίζεται για ιολογική εξέταση μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να πρέπει να συνοδεύεται από συμπληρωματικό υλικό προς βακτηριολογική, παρασιτολογική, ιστολογική ή άλλη εξέταση για να επιτρέψει μια διαφοροποιημένη διάγνωση. Τέτοιου είδους υλικό πρέπει να συγκεντρώνεται σύμφωνα με διαδικασίες που καθορίζονται από το Διεθνές Γραφείο Επιζωτιών (OIE).

## Α. Συμβατική απομόνωση ιού με ακόλουθη ορολογική ταυτοποίηση ιού

## Α.1.1. Επιλογή των δειγμάτων

Πρέπει να επιλεγούν προς εξέταση τουλάχιστον δέκα ιχθύες που εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα ΙΗΝ ή VHS.

## Α.1.2. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων των ιχθύων

Πριν την αποστολή ή μεταφορά στο εργαστήριο, απομακρύνονται τμήματα των οργάνων προς εξέταση από τον ιχθύ με αποστειρωμένο ψαλίδι και λαβίδα και μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν υπόστρωμα μεταφοράς, δηλαδή υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας με 10 % ορό μόσχου και αντιβιοτικά. Συνίσταται, για παράδειγμα, ο συνδυασμός 200 UI πενικιλίνης, 200 μg στρεπτομυκίνης και 200 μg καναμυσίνης ανά ml, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα αντιβιοτικά αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας. Το ιστολογικό υλικό προς εξέταση είναι σπλήνα, πρόσθιο νεφρό και εγκέφαλος.

Τμήματα οργάνων από 5 έως 10 ιχθύες μπορούν να συλλεχθούν μέσα σε ένα σωλήνα και να αντιπροσωπεύουν ένα συγχωνευμένο δείγμα. Ο ιστός σε κάθε δείγμα πρέπει να ζυγίζει τουλάχιστον 1 g, έτσι ώστε το τελικό διάλυμα να είναι 1:10.

Οι σωλήνες τοποθετούνται σε μονωμένα δοχεία (για παράδειγμα, κουτιά με παχύ τοίχωμα πολυστυρένιου) μαζί με αρκετό πάγο ή «παγοκολώνες» για να εξασφαλιστεί, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς στο εργαστήριο, η ψύξη των δειγμάτων μεταξύ 0 και 5 °C. Πρέπει να αποφεύγεται η κατάψυξη των δειγμάτων.

Η ιολογική εξέταση πρέπει να ξεκινήσει το δυνατόν συντομότερα και όχι αργότερα από 48 ώρες μετά τη συλλογή των δειγμάτων. Εάν οι ιχθύες προς εξέταση έχουν μήκος μικρότερο από 6 cm, μπορούν να αποσταλούν στο εργαστήριο ολόκληροι μέσα σε πλαστικούς σάκους ψυχθέντες ως ανωτέρω.

**A.I.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού**

Ανάλογα με τη συμφωνία με το εμπλεκόμενο διαγνωστικό εργαστήριο, μπορούν να συλλεγούν και άλλοι ιστοί ιχθύων και να προετοιμαστούν για συμπληρωματικές εξετάσεις.

**A.II.1. Ομογενοποίηση οργάνων**

Στο εργαστήριο πρέπει να ομογενοποιηθεί εντελώς (με χωνευτήρα, αναμείκτη ή ιγδίο) ο ιστός στους σωλήνες και στη συνέχεια να τοποθετηθεί σε μορφή εναιωρήματος στο αρχικό υπόστρωμα μεταφοράς. Εάν ένα δείγμα αποτελείται από ολόκληρους ιχθύες, δηλαδή ιχθύες μήκους μικρότερου από 6 cm, αυτοί τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι μετά από αφαίρεση του σώματος όπισθεν του ανοίγματος εντοσθίων, ομογενοποιούνται ως ανωτέρω και εναιωρούνται σε αναλογία 1:10 στο υπόστρωμα μεταφοράς.

**A.II.2. Φυγοκέντρηση του πολτού**

Ο πολτός φυγοκεντρείται σε καταψυχόμενη φυγόκεντρο στους 2 °C – 5 °C στα 2 000 έως 4 000 x g επί 15 λεπτά και συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό προς εξέταση.

Εάν η αποστολή του δείγματος έγινε μέσα σε υπόστρωμα μεταφοράς (δηλαδή με έκθεση σε αντιβιοτικά), το υπερκείμενο υγρό δεν χρειάζεται περαιτέρω μεταχείριση με αντιβιοτικά.

Εάν το δείγμα έχει αποσταλεί υπό μορφή ολόκληρων ιχθύων, ο πολτός μετά τη φυγοκέντρηση πρέπει να εκτεθεί στα αντιβιοτικά στο υπόστρωμα μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε για επαναιώρηση είτε επί τέσσερις ώρες σε θερμοκρασία δωματίου είτε ολονυκτίς στους 4 °C.

Η αγωγή με αντιβιοτικά αποσκοπεί στον έλεγχο της βακτηριακής μόλυνσης των δειγμάτων και καθιστά περιττή τη διήθηση μέσω μεμβρανικών φίλτρων.

Αμέσως μετά τη φυγοκέντρηση, ένας όγκος του υπερκείμενου υγρού αναμειγνύεται με ίσα μέρη κατάλληλα αραιωμένου δισθενούς αντιορού στον ιό IPN (στελέχη αναφοράς Sp και Ab) και επωάζονται με αυτό επί τουλάχιστον μία ώρα στους 15 °C ή το πολύ επί 18 ώρες στους 4 °C. Ο τίτλος του αντιορού πρέπει να είναι τουλάχιστον 1/2 000 σε δοκιμή εξουδετέρωσης 50 % της επιφανειακής πλάκας.

Η επεξεργασία όλων των εμβολίων με αντιορό στον ιό IPN (ιός που σε ορισμένα μέρη της Ευρώπης εκδηλώνεται στο 50 % των δειγμάτων ιχθύων) αποσκοπεί στην αποτροπή ανάπτυξης ΚΠΦ, οφειλόμενου στον ιό IPN, σε εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες. Αυτό θα μειώσει τη διάρκεια των ιολογικών εξετάσεων, καθώς και τον αριθμό των περιπτώσεων στις οποίες η εμφάνιση του ΚΠΦ θα έπρεπε να θεωρηθεί δυνάμει ενδεικτική για VHS ή IPN.

Όταν τα δείγματα προέρχονται από μονάδες παραγωγής που θεωρούνται απηλλαγμένες IPN, μπορεί να παραλειφθεί η μεταχείριση των εμβολίων με αντιορό στον ιό IPN.

**A.III.1. Κυτταροκαλλιέργειες και υποστρώματα**

Αναπτύσσονται κύτταρα BF-2 και είτε EPC είτε FHM στους 20 ° με 25 °C σε Eagle's MEM (ή τροποποιήσεις αυτού) με συμπλήρωμα 10 % βοείου εμβρυακού ορού και αντιβιοτικών σε τυποποιημένες συγκεντρώσεις.

Όταν τα κύτταρα καλλιεργούνται σε κλειστά φιαλίδια, το υπόστρωμα ρυθμίζεται με διττανθρακικό. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για καλλιέργεια κυττάρων σε ανοικτές μονάδες πρέπει να ρυθμιστεί με Tris-HCL (23 mM) και διττανθρακικό νάτριο (6 mM) σε pH κατά το δυνατό πλησιέστερο του 7,6 που είναι βέλτιστο για πολλαπλασιασμό ιών.

Οι κυτταροκαλλιέργειες που θα χρησιμοποιηθούν για εμβολιασμό με ιστολογικό υλικό πρέπει να είναι πρόσφατες (ηλικίας 4–48 ωρών) και ενεργά αναπτυσσόμενες (όχι συρρέουσες) κατά τον εμβολιασμό.

**A.III.2. Εμβολιασμός των κυτταροκαλλιεργειών**

Εμβολιάζεται εναιώρημα οργάνου επεξεργασμένο με αντιβιοτικά μέσα σε κυτταροκαλλιέργειες σε δύο αραιώσεις: το αρχικό διάλυμα και, επιπρόσθετα, μία αραιώση 1:100 αυτού (για να αποφευχθεί ομόλογη αλληλεπίδραση). Πρέπει να εμβολιαστούν τουλάχιστον δύο σειρές κυττάρων (βλέπε A.III.1). Η αναλογία μεγέθους εμβολίου και όγκου υποστρώματος κυτταροκαλλιέργειας πρέπει να είναι περίπου 1:10.

Για κάθε αραιώση και για κάθε σειρά κυττάρων πρέπει να χρησιμοποιηθεί ελάχιστη κυτταρική επιφάνεια περίπου 2 cm<sup>2</sup>, αντιστοιχούσα σε μία κοιλότητα δίσκου κυτταροκαλλιέργειας των 24 κοιλοτήτων. Συνίσταται η χρήση δίσκων κυτταροκαλλιέργειας, αλλά είναι επίσης αποδεκτές και άλλες μονάδες με παρόμοια ή μεγαλύτερη επιφάνεια ανάπτυξης.

A.III.3. *Επώαση των κυτταροκαλλιέργειών*

Επώάζονται εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες στους 15 °C επί επτά ημέρες. Εάν το χρώμα του υποστρώματος της κυτταροκαλλιέργειας αλλάξει από κόκκινο σε κίτρινο, υποδηλώνοντας οξίνιση υποστρώματος, πρέπει να πραγματοποιηθεί προσαρμογή του pH με αποστειρωμένο διάλυμα διττανθρακικού ή ισοδύναμες ουσίες για να εξασφαλιστεί η επιδεκτικότητα των κυττάρων στη μόλυνση από τον ιό.

Πραγματοποιείται ανά έξι μήνες τιτλοδότηση κατεψυγμένων αποθεμάτων ιών VHS και IHN για να πιστοποιηθεί η επιδεκτικότητα των κυτταροκαλλιέργειών στη μόλυνση.

A.III.4. *Μικροσκόπηση*

Επιθεωρούνται καθημερινά εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες ως προς την εμφάνιση ΚΠΦ σε μεγέθυνση περίπου 40. Εάν παρατηρηθεί εμφανές ΚΠΦ, πρέπει να αρχίσουν αμέσως διαδικασίες ταυτοποίησης ιού σύμφωνα με το τμήμα A.IV.

Συγχρόνως, αναλαμβάνονται κατάλληλες ενέργειες για να ανασταλεί η εγκεκριμένη κατάσταση της μονάδας παραγωγής από την οποία προήλθε το θετικό για ιό δείγμα, καθώς και κάθε μονάδα παραγωγής που έπεται.

Η αναστολή της εγκεκριμένης κατάστασης πρέπει να διατηρηθεί έως ότου εργαστηριακοί έλεγχοι αποδείξουν ότι ο υπό εξέταση ιός δεν είναι VHS ή IHN. Για τον προσδιορισμό του ιού χορηγούνται το μέγιστο τέσσερις εβδομάδες, συμπεριλαμβανομένου και του απαιτούμενου χρόνου για εξέταση σε εργαστήρια αναφοράς.

A.III.5. *Υποκαλλιέργεια*

Εάν δεν έχει αναπτυχθεί ΚΠΦ μετά από επώαση επτά ημερών, πραγματοποιείται υποκαλλιέργεια σε πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιώντας κυτταρική επιφάνεια παρόμοια με αυτή της αρχικής καλλιέργειας.

Συγκεντρώνονται υποπολλαπλάσια του υποστρώματος από όλες τις καλλιέργειες/κυττάρες αποτελούσες την αρχική καλλιέργεια, σύμφωνα με τη σειρά των κυττάρων, ακολουθώντας έναν κύκλο ψύξης-απόψυξης των καλλιεργειών και 0,5 ml υποστρώματος αναμειγνύονται με ίσα μέρη αντιορού στο IPN όπως περιγράφεται στο τμήμα A.II.2 και το μείγμα επωάζεται στους 15 °C επί 60 λεπτά. Μετά, το μείγμα εμβολιάζεται σε κυτταροκαλλιέργειες σε αραιώσεις 1:1 και 1:100, όπως περιγράφεται στο τμήμα A.III.2. Του εμβολιασμού μπορεί να προηγηθεί προεπώαση των αραιώσεων με δισθενή αντιορό στον ιό IPN κατάλληλη σε αραιώση.

Μετά, οι εμβολιασμένες καλλιέργειες επωάζονται επί επτά ημέρες στους 15 °C υπό παρακολούθηση, όπως στο τμήμα A.III.4.

A.IV.1. *Εξουδετέρωση*

Εάν έχει παρατηρηθεί ένδειξη ΚΠΦ σε μία κυτταροκαλλιέργεια, το υπόστρωμα συλλέγεται, τα κύτταρα απομακρύνονται με φυγοκέντρηση χαμηλής ταχύτητας ή διήθηση μέσω μεμβράνης (0,45 μm) και το υπόστρωμα μετά αραιώνεται 1:100 και 1:10 000 με υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας.

Αναμειγνύονται υποπολλαπλάσια των αραιώσεων και επωάζονται επί 60 λεπτά στους 15 °C μαζί με ίσα μέρη των ακόλουθων αντιδραστικών μεμονωμένα:

- |                                                                                                        |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| — κατά ομάδα ειδικό αντίσωμα στον ιό VHS (ιός Egtvet)                                                  | 1:50 * |
| — κατά ομάδα ειδικό αντίσωμα στον ιό λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης (IHN)                          | 1:50 * |
| — ειδικός δισθενής αντιορός στον ιό λοιμώδους παγκρεατικής νέκρωσης (IPN) (στελέχη αναφοράς Sp και Ab) | 1:50 * |
| — υπόστρωμα καλλιέργειας                                                                               | 1:1    |

\* ή όπως καθορίζεται από το εργαστήριο αναφοράς σχετικά με την πιθανή κυτταροτοξικότητα του αντιορού.

Επιβάλλεται η χρήση αντιδραστικών ποιότητας αναφοράς σχετικά με τον τίτλο και τον ιδιαίτερο χαρακτήρα.

Τουλάχιστον δύο κυτταροκαλλιέργειες εμβολιάζονται με 50 μl καθεμία από κάθε μείγμα ιού-ορού και μετά επωάζονται στους 15 °C. Ελέγχεται η ανάπτυξη ΚΠΦ όπως περιγράφεται στο τμήμα A.III.4.

Εάν η δοκιμή δεν αποδώσει ασφαλή ταυτοποίηση του ιού εντός μίας εβδομάδας, πρέπει να αναληφθεί μία από τις ακόλουθες ενέργειες:

- α) μεταφορά του ιού σε εθνικό εργαστήριο αναφοράς για τους ιούς ιχθύων προς άμεση ταυτοποίηση.
- β) εφαρμογή των τεχνικών IFAT (τμήμα A.IV.2), ELISA (τμήμα A.IV.3) ή άλλων τεχνικών ταυτοποίησης ιού με αντιδραστικά ποιότητας αναφοράς.



**A.IV.2. Ανοσοφορισμός (IFAT)**

Για κάθε απομόνωση ιού που πρέπει να ταυτοποιηθεί, επικαλύπτονται τουλάχιστον οκτώ γυάλινα τρυβλία ή ισοδύναμά τους με κύτταρα EPC σε πυκνότητα που αποβαίνει σε συρροή περίπου 60 έως 90 % μετά από 24 ώρες καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό, επιλέγονται τα κύτταρα EPC λόγω της ισχυρής προσκόλλησής τους σε γυάλινες επιφάνειες.

Όταν τα κύτταρα έχουν κατακαθίσει πάνω στη γυάλινη επιφάνεια (περίπου μία ώρα μετά την επικάλυψη), ή όταν οι καλλιέργειες έχουν επωασθεί έως και επί 24 ώρες, εμβολιάζεται ο ιός που πρέπει να ταυτοποιηθεί. Εμβολιάζονται τέσσερις καλλιέργειες σε αναλογία 1:10 κατ' όγκο και τέσσερις καλλιέργειες σε αναλογία 1:100.

Οι καλλιέργειες, 20 με 30 ώρες μετά τον εμβολιασμό, εκπλύνονται δύο φορές εντός Eagle's MEM χωρίς ορό, σταθεροποιούνται με ακετόνη και έπειτα χρωνούνται με IFAT διπλής στοιβάδας. Η πρώτη στοιβάδα αντιδραστηρίων αποτελείται από εγκεκριμένο αντιορό (όπως στο τμήμα IV.1). Η δεύτερη στοιβάδα αντιδραστηρίων είναι αντιορός, συζευγμένος με FITC, κατά της ανοσογλοβουλίνης που χρησιμοποιείται στην πρώτη στοιβάδα. Πρέπει να χρωνούνται τουλάχιστον μία εμβολιασμένη καλλιέργεια υψηλής δόσης και μία χαμηλής δόσης για κάθε έναν από τους δοκιμαζόμενους αντιορούς. Στη δοκιμή πρέπει να συμπεριληφθούν κατάλληλοι αρνητικοί και θετικοί έλεγχοι.

Οι χρωσμένες καλλιέργειες στερεώνονται χρησιμοποιώντας αλατούχο γλυκερίνη. Εξετάζονται υπό προσπίπτον υπεριώδες φως. Χρησιμοποιούνται προσοφθάλμιοι των 10 X ή 12 X και αντικειμενικοί φακοί των X 25 ή X 40 με αριθμητικό άνοιγμα > 0,7 και > 1,3 αντίστοιχα. Οι αραιώσεις του αρχικού αντιορού και συζευγμένης με FITC αντι-ειδικής ανοσογλοβουλίνης θα εξαρτηθούν από την επιλεχθείσα ή διαθέσιμη μικροσκοπική διάταξη.

Μερικά στελέχη του ιού Egtvet αντιδρούν έντονα με αντιορό κατά του στελέχους αναφοράς F1 σε IFAT, αν και δεν αντιδρούν στις δοκιμές εξουδετέρωσης.

**A.IV.3. Δοκιμή ανοσοαπορρόφησης μέσω σύνδεσης με ένζυμο (ELISA)**

Επικαλύπτονται κοιλότητες σε τρυβλία μικροτιτλοδότησης (για παράδειγμα Nunc-ανοσοτρυβλία, Maxi-sorp, Nunc, Denmark) ολονυκτίς με συνιστώμενες αραιώσεις κλασμάτων ανοσογλοβουλίνης των αντιορών που αναφέρονται στο τμήμα IV.1, καθαρισμένης με πρωτεΐνη A.

Αφού εκπλυθούν οι κοιλότητες με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween-20, ο προς ταυτοποίηση ιός προστίθεται στις κοιλότητες σε διαδοχικές διπλές ή τετραπλές αραιώσεις και αφήνεται να αντιδράσει με το επικαλύπτον αντίσωμα επί 60 λεπτά στους 37 °C. Μετά την έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween-20, προστίθενται βιοτινυλιωμένα αντισώματα εξειδίκευσης αντιστοιχούσης σε αυτή των επικαλυπτόντων αντισωμάτων και αφήνονται να αντιδράσουν επί 60 λεπτά στους 20 °C. Ακολουθεί και άλλη έκπλυση ως ανωτέρω, προστίθεται στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP και αφήνεται να αντιδράσει επί μία ώρα στους 20 °C. Μετά από μία τελευταία έκπλυση, το συνδεδεμένο ένζυμο γίνεται ορατό χρησιμοποιώντας κατάλληλα υποστρώματα ELISA (OPD, TMB ή άλλα).

Η ανωτέρω, δασισμένη σε βιοτίνη-αβιδίνη, εκδοχή ELISA δίνεται ως παράδειγμα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν άλλες εκδοχές ELISA αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας αντί αυτής.

**B. Απομόνωση ιού με ταυτόχρονη ορολογική ταυτοποίηση ιού****B.I.1. Επιλογή δειγμάτων**

Όπως στην A.I.1.

**B.I.2. Προετοιμασία και αποστολή δειγμάτων ιχθύων**

Όπως στην A.I.2.

**B.II.1. Ομογενοποίηση οργάνων**

Όπως στην A.II.1.

**B.II.2. Φυγοκέντρηση πολτού**

Όπως στην A.II.2.

**B.II.3. Επεξεργασία υπερκείμενου υγρού με διαγνωστικούς αντιορούς**

Το επεξεργασμένο με αντιβιοτικά και αντι-IPN εναιώρημα οργάνου αραιούται 1:10 και 1:10 000 με υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας και υποπολλαπλάσια αναμειγνύονται και επωάζονται επί 60 λεπτά στους 15 °C με ίσα μέρη των αντιδραστηρίων που καταγράφονται στο τμήμα A.IV.1.

**B.III.1. Κυτταροκαλλιέργειες και υποστρώματα**

Όπως στην A.III.1.

**B.III.2. Εμβολιασμός κυτταροκαλλιιεργειών**

Εμβολιάζονται τουλάχιστον δύο κυτταροκαλλιέργειες ανά κυτταρική σειρά με 50 μl η καθεμία από κάθε μείγμα ορού ιού (παρασκευασμένο σύμφωνα με την B.II.3).

**B.III.2. Επώαση κυτταροκαλλιιεργειών**

Όπως στην A.III.3.

**B.III.4. Μικροσκόπηση**

Επιθεωρούνται καθημερινά εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες ως προς την εμφάνιση ΚΠΦ σε μέγεθος περίπου 40. Εάν το ΚΠΦ αποτρέπεται με έναν από τους χρησιμοποιούμενους αντιορούς, ο ιός μπορεί να θεωρηθεί ότι ταυτοποιείται ανάλογα. Εάν το ΚΠΦ δεν αποτρέπεται από κάποιο από τους αντιορούς, πρέπει να πραγματοποιηθούν ενέργειες ταυτοποίησης με την A.IV.

**B.III.5. Υποκαλλιέργεια**

Εάν το ΚΠΦ δεν έχει εμφανιστεί καθόλου μετά από επτά ημέρες, πρέπει να εκτελεστεί υποκαλλιέργεια από καλλιέργειες εμβολιασμένες με υπερκείμενο υγρό συν το υπόστρωμα (B.II.3).

**Γ. Τεχνικές ταχείας διάγνωσης (IFAT, ELISA)**

Υπερκείμενο υγρό παρασκευασμένο όπως περιγράφεται στην A.II.2, υποβάλλεται σε IFAT ή ELISA σύμφωνα με την A.IV.2 ή A.IV.3, αντίστοιχα. Οι ταχείες αυτές τεχνικές πρέπει να συμπληρωθούν με μία ιολογική εξέταση σύμφωνα με την A ή B μέσα σε 48 ώρες μετά τη δειγματοληψία, αν:

α) το αποτέλεσμα είναι αρνητικό,

ή

β) ληφθεί θετικό αποτέλεσμα με δείγματα που αντιπροσωπεύουν την πρώτη περίπτωση IHN ή VHS σε μια εγκεκρμένη ζώνη.