

32001D0183

9.3.2001

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ

L 67/65

ID-DEĊIŻJONI TAL-KUMMISSJONI

tat-22 ta' Frar 2001

li tistabbilixxi l-pjanijiet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għall-iskoperta u l-konfermazzjoni ta' xi mard tal-hut u li thassar id-Deciżjoni 92/532/KEE

(notifikata taht dokument numru C(2001) 426)

(Test b' rilevanza għaž-ŻEE)

(2001/183/KE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Filwaqt li kunsidrat it-Trattat li jistabbilixxi il-Komunità Ewropea,

Filwaqt li kunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 91/67/KEE tat-28 ta' Jannar 1991 dwar il-kundizzjonijiet dwar saħħa ta' l-annimali li jirregolaw it-tqegħid fuq is-suq ta' annimali u prodotti akkwakulturi⁽¹⁾, kif l-aħħar emendata bid-Direttiva 98/45/KE⁽²⁾, u partikolarment l-Artikolu 15 tagħha,

Billi:

- (1) Il-pjanijiet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' xi mard tal-hut ġew stabbiliti fid-Deciżjoni tal-Kummissjoni 92/532/KEE⁽³⁾, kif emendata bid-Deciżjoni tal-Kummissjoni 96/240/KE⁽⁴⁾.
- (2) Minn żmien l-adozzjoni tad-Deciżjoni 92/532/KEE, saru żviluppi ġodda prattiċi u xjentifiċi, u ġiet emendata d-Direttiva 91/67/KEE. Dan jehtieġ li l-pjanijiet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi jiġu aġġornati.
- (3) Tali aġġornar tirrelata għall-eżaminazzjoni u l-identifikazzjoni ta' viruses li jikkawżaw setticēmja virali emorraġika (SVE) u nekrozi ematopejċi infettużi (NEI) u tibdiliet skond l-aħħar emendi tad-Direttiva 91/67/KEE.
- (4) Il-laboratorju Komunitarji referenti għall-mard tal-hut stabbilit bid-Direttiva tal-Kunsill 93/53/KEE⁽⁵⁾, ġie kkon-sultat.

- (5) Il-pjanijiet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' xi mard tal-hut introdotti bid-Deciżjoni 92/532/KEE għandhom jithassru għall-iskopijiet tal-kjarezza

- (6) Il-miżuri provduti f' din id-Deciżjoni huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Veterinarju Permanenti,

ADOTTAT DIN ID-DEĊIŻJONI:

Artikolu 1

Il-pjanijiet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' setticēmja virali emorraġika (SVE) u nekrozi ematopejċi infettużi (NEI) huma stabbiliti fl-Anness.

Artikolu 2

Din id-Deciżjoni thassar id-Deciżjoni 92/532/KEE.

Artikolu 3

Din id-Deciżjoni hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula f' Brussel, fit-22 ta' Frar 2001.

Għall-Kummissjoni

David BYRNE

Membru tal-Kummissjoni

⁽¹⁾ ĠU L 46, tad-19.2.1991, p. 1.

⁽²⁾ ĠU L 189, tat-3.7.1998, p. 12.

⁽³⁾ ĠU L 337, tal-21.11.1992, p. 18.

⁽⁴⁾ ĠU L 79, tad-29.3.1996, p. 19.

⁽⁵⁾ ĠU L 175, tad-19.7.1993, p. 23.

L-ANNESS

IL-PJANIJET DWAR KAMPJUNAR U L-METODI DJANJOSTIČI GHALL-ISKOPERTA U L-KONFERMA TA' SETTIČEMJA VIRALI EMORRAĠIKA (SVE) U NEKROŽI EMATOPEJČI INFETTUŽI (NEI)

L-INTRODUZZJONI

Dan l-Anness

- (a) jipprovi għal gwidi u htigiet minimi dwar pjaniet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma tal-preżenza ta' settiċemja virali emorraġika (SVE) u nekroži ematopejċi infettużi (NEI);
- (b) jintegra d-dispożizzjonijiet ta' l-Annessi B u C tad-Direttiva 91/67/KEE għall-approvazzjoni ta' u l-mantenuzzjoni ta' l-istat ta' żoni u rżiezet f' żoni mhux approvati;
- (ċ) iwaqqaf dispożizzjonijiet li jimmiraw lejn djanjosi tajba ta' SVE u NEI u lejn l-għarfien uffiċjali ta' l-istat ta' żoni u ta' rżiezet fiż-żoni mhux approvati skond l-Artikoli 5 u 6 tad-Direttiva 91/67/KEE;
- (d) huwa dirett lejn kemm l-awtoritajiet responsabbli għall-kontroll ta' SVE u NEI u l-haddiema fil-laboratorju li jwettqu t-testijiet rigward lejn il-mard. Għalhekk, jitqiegħed l-enfasi fuq il-proċeduri tal-kampjunar, il-prinċipji u l-applikazzjonijiet ta' testijiet tal-laboratorji u l-istima tar-riżultati tagħhom, kif ukoll dwar tekniċi dettaljati tal-laboratorju. Iżda fejn xieraq il-laboratorji jistgħu japplikaw modifiki għat-testijiet deskritti f' dan l-Anness jew jużaw testijiet differenti, sa fejn tista' tintwera l-istess sensitività u speċifiċità.

L-I Parti tinkludi pjaniet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għas-sorveljanza ta' SVE u NEI sabiex jiġi akkwistat u mantnut stat ta' żona jew rżiezet f' żona mhux approvata.

It-II Parti tiddekrivi l-proċeduri djanjostiċi għall-konferma ta' SVE u NEI fil-każ ta' suspett.

It-III Parti twaqqaf il-kriterji u l-gwidi għal program uffiċjali għall-spezzjonijiet sanitarji, dokumentazzjoni ta' liberta' minn SVE u/jew NEI storika.

Ir-IV Parti tagħti rakkmandazzjonijiet dwar il-proċeduri għat-tirazzjoni tal-virus ta' SVE u NEI biex tiġi verifikata s-suxxettibiltà tal-kulturi taċ-ċelloli għall-infezzjoni.

Akronimi u taqisriet huma elenkati fil-V Parti.

I PARTI

Il-Pjaniet dwar kampjunar u l-metodi djanjostiċi għas-sorveljanza ta' SVE u NEI sabiex jiġi akkwistat u mantnut l-istat approvat ta' żona jew rżiezet f' żona mhux approvata**I. L-Spezzjonijiet u l-kampjunar**

1. Dispożizzjonijiet ġenerali dwar spezzjonijiet sanitarji kliniċi, ġbir u għażla ta' kampjuni għas-sorveljanza ta' żoni jew irziezet f' żoni mhux approvati sabiex jiġi akkwistat u mantnut l-istat approvat għal SVE u NEI.

L-spezzjonijiet sanitarji kliniċi u l-kampjunar taċ-ċelloli tal-hut u/jew fluwidu ovarjan li għandhom jitwettqu f' żoni jew f' irziezet li huma f' żoni mhux approvati sabiex jiġi akkwistat jew mantnut l-istat approvat għal SVE u/jew NEI skond l-Annessi B u C tad-Direttiva 91/67/KEE huma mqassra f' Tabelli 1A, 1B u 1C. Aktar dettalji jinsabu fil-Partijiet 1.1.2 sa 1.1.4. Tabelli 1A u 1B m' għandhomx iġhodu għal irziezet ġodda u rziezet li jibdwu l-attivitajiet tagħhom mill-ġdid bil-hut, bajd jew gamete minn żona approvata jew rżiezet approvat f' żona mhux approvata, sakemm jikkonformaw mar-htigiet stabbiliti fid-Direttiva 91/67/KEE, l-Anness C, Parti I.A.6(a) jew I.A.6(b) jew II.A.3(a) jew II.A.3 (b).

L-spezzjonijiet sanitarji kliniċi għandhom jitwettqu matul it-terminu minn Ottubru sa Ġunju jew kull meta t-temperatura ta' l-ilma huwa inqas minn 14 °C. Meta l-irziezet li għandhom jiġu ispezzjonati darbtejn fis-sena, l-intervalli bejn l-spezzjonijiet għandhom ikunu għall-inqas ta' erba' xhur. L-unitajiet ta' produzzjoni kollha (vaski, tankijiet, gaġġeg, eċċ) għandhom jiġu ispezzjonati għall-preżenza ta' hut mejtin, jew li ma jgħibux ruħhom b' mod mhux normali. Għandha tingħata attenzjoni partikolari għal post għall-hruġ ta' l-ilma fejn il-hut ġeneralment jakkumulaw mal-kurrent ta' l-ilma.

Il-hut li għandhom jiġu kkampjunatu għandhom jingħażlu kif ġej.

- Jekk mhux preżenti t-troti, hut biss ta' din l-ispeċie għandhom jingħażlu għall-kampjunar. Jekk mhux preżenti t-troti, l-kampjun għandu jittiehed minn hut tal-ispeċie kollha preżenti kulmeta l-ispeċie huma suxxettibbli għal SVE u/jew NEI (kif elenkati fl-Anness A tad-Direttiva 91/67/KEE). L-ispeċie għandhom rappreżentati proporzjonalment fil-kampjun. Jekk aktar minn għajn wiehed jiġi utiżżat għall-produzzjoni tal-hut, hut li jirrappreżenta l-ghejun kollha ta' l-ilma għandhom jiġu inkluz għall-kampjunar.
 - Jekk huma preżenti hut dgħajfa, li ma jgħibux ruhhom b'mod normali jew mejtin friski (mhux dekomponuti), għandhom jingħażlu primarjament dawn il-hut.
 - Jekk mhux preżenti dawn il-hut, il-hut magħżul għandu jinkludi hut li jidher normali u b' saħħtu miġbur b' tali mod li kull parti tar-razzett kif ukoll il-klassijiet tas-snin kollha huma rappreżentati b' mod proporzjonat f' dan il-kampjun.
2. *Dispożizzjonijiet speċifiċi, inkluz il-għbir tal-kampjuni, għas-sorveljanza ta' żoni jew irziezet f' żoni mhux approvati sabiex jiġi akkwistat jew mantnut stat approvat għall-SVE u/jew NEI*

1. Żona jew razzett f' zona mhux approvata li titqiegħed taħt is-sorveljanza tas-servizzi uffiċjali tista' takkwista stat approvat għall-SVE u/jew NEI sogġett jew għal:

- (a) Mudell "A" - programm ta' sorveljanza ta' sentejn

Wara għall-inqas sentejn ta' nuqqas ta' sinjali kliniċi jew oħrajn ta' SVE u/jew NEI, l-irziezet kollha fiż-żona jew kwalunkwe razzett f' zona mhux approvata li għandhom jiġu approvati għandhom jiġu ispezżjonati sanitarjament darbtejn fis-sena għal sentejn. Matul dawn is-sentejn ta' kontroll, li jippreċedu l-akkwistat ta' stat approvat, in-nuqqas ta' sinjali kliniċi jew oħrajn ta' SVE jew NEI għandhom ikunu tkomplew u l-kampjuni għandhom jingħabru għall-eżaminazzjoni skond it-Tabella 1A. Oltre, il-kampjuni għandhom jingħażlu, jiġu preparati u eżaminati kif deskritt fil-Partijiet I.I sa I.IV u l-eżaminazzjonijiet laboratorji għandhom ikunu pproduċew riżultati negativi għal SVE u/jew NEI; jew

- (b) Mudell "B" - program ta' sorveljanza ta' sentejn b' daqs ta' kampjun imnaqqas

Wara program uffiċjali ta' speżżjonijiet sanitarji li jiddokumenta l-liberta' storika minn SVE u/jew NEI għall-inqas għal erba' snin, l-irziezet kollha fiż-żona jew kwalunkwe razzett f' zona mhux approvata li għandhom jiġu approvati għandhom jiġu ispezżjonati sanitarjament darbtejn fis-sena għal sentejn. Matul dawn is-sentejn ta' kontroll, li jippreċedu l-akkwistat ta' stat approvat, in-nuqqas ta' sinjali kliniċi jew oħrajn ta' SVE jew NEI għandhom ikunu tkomplew u l-kampjuni għandhom jingħabru għall-eżaminazzjoni skond it-Tabella 1B. Oltre, il-kampjuni għandhom jingħażlu, jiġu preparati u eżaminati kif deskritt fil-Partijiet I.I sa I.IV u l-eżaminazzjonijiet laboratorji għandhom ikunu pproduċew riżultati negativi għal SVE u/jew NEI. Sabiex programm ta' speżżjonijiet sanitarji jingħaraf mis-servizzi uffiċjali għad-dokumentazzjoni dwar libera' rigward SVE u/jew NEI, għandu jilhaq il-kriterji u l-gwidi stabbiliti fit-III Parti.

2. *Dispożizzjonijiet speċjali għall-approvazzjoni ta' l-irziezet ġodda u rziezet li jibdwu l-attivitajiet tagħhom mill-ġdid bil-hut, bajd jew gamete minn zona approvata jew razzett approvat f' zona mhux approvata*

Irziezet ġodda u rziezet li jibdwu l-attivitajiet tagħhom mill-ġdid bil-hut, bajd jew gamete minn zona approvata jew razzett approvat f' zona mhux approvata jistgħu jakkwistaw stat skond ir-htigiet stabbiliti fid-Direttiva 91/67/EEC, l-Anness C, l.A.6a/b or l.A.3.a/b. Għalhekk id-dispożizzjonijiet dwar kampjunar fil-Mudelli A u B fuq (Partijiet 1.1.2.1.a u 1.1.21b) m' għandhomx jgħoddu għal tali rziezet.

3. Programm ta' sorveljanza għall-mantenuzzjoni ta' stat approvat għal SVE u/jew NEI Sabiex jinżamm l-istat ta' zona jew razzett f' zona mhux approvata għall-SVE

u/jew NEI, għandhom isiru speżżjonijiet u kampjunar għall-eżaminazzjoni skond it-Tabella 1C. Il-kampjuni għandhom jintgħażlu, jiġu ppreparati u eżaminati kif deskritt fil-Partijiet I.I sa I.IV u l-eżaminazzjonijiet laboratorji għandhom ikunu negativi dwar l-aġenti ta' SVE u/jew NEI.

3. *Preparament u bġhit tal-kampjuni mill-hut*

Qabel il-bġhit jew trasferiment lil-laboratorju il-biċċiet ta' organi li ser jiġu eżaminati għandhom jitnehhew mill-hut b'għodda ta' dissezzjoni sterili u jiġu trasferiti għal tubi tal-plastik sterili li fihom meżż ta' transport, i.e., meżż ta' kultura taċ-ċelloli b' 10 % serum tal-ghoġla u antibjotiċi. Il-kombinazzjoni ta' 200 fil-penicillina, 200mg strettomicina u 200 mg kanamicina għal kull millilitru (m1) jista' jiġi rakkmandat, iżda jistgħu jintużaw ukoll antibjotiċi oħrajn ta' effikaċja pprovata. Il-materjal taċ-ċelloli li għandu jiġi eżaminat huwa l-milsa, l-kliewi ta' wara, u oltre, jew il-qalb jew l-enċefalon. F'xi każijiet, għandu jiġi eżaminat il-fluwidu ovarjan (Tabelli 1A sa C)

Il-fluwidu ovarjan jew il-biċċiet ta' organi minn massimu ta' 10 hutiet (Tabelli 1A sa C) jista' jingabar f' tubu wiehed sterili li fih għall-inqas 4ml mezz ta' transport u jirrappreżenta kampjun wiehed tal-grupp. Iċ-ċellola f' kull kampjun għandha tiżen minimu ta' 0,5 gramma (g).

It-tubi għandhom jitqiegħdu f' kontenituri insulati (bħal kaxxi tal-polistirena bil-hitan hoxnin) flimkien ma' biżżejjed silġ jew blokkijiet tal-friza biex jiġi aċċertat it-tkessiġ tal-kampjun matul it-trasportazzjoni lejn il-laboratorju. L-iffriżar għandu jiġi evitat. It-temperatura ta' kampjun matul it-tranzitu m' għandha qatt teċċedi 10 °C u s-silġ għad irid ikun preżenti fil-kaxxa tat-trasport ma' l-irċevuta jew wahda jew aktar mill-blokkijiet għad trid tkun parzjalment jew totalment iffriżata.

L-eżaminazzjoni viroloġika għandha tinbeda mill-aktar fis possibbli u mhux aktar tard minn 48 siegħa wara l-kollezzjoni tal-kampjuni. F' każijiet eċċezzjonali⁽¹⁾ l-eżaminazzjoni viroloġika tista' tinbeda mhux aktar tard minn 72 siegħa wara l-ġbir tal-materjal, sakemm il-materjal li għandu jiġi eżaminat huwa mħares mill-mezz tat-trasport u il-htigiet tat-temperatura matul it-trasportazzjoni jistghu jintlahqu (Parti 1.1.3, paragrafu 3).

Jista' jintbagħat hut shiħ lil-laboratorju jekk il-htigiet tat-temperatura matul it-trasportazzjoni jistghu jintlahqu. Hut shiħ jista' jitgeżwer f' karta b' kapaċita' assorbenti u fl-aħhar jintbagħat f' basket tal-plastik, imkessah kif imsemmi. Il-hut haj jista' jintbagħat ukoll.

L-imballaġġ u t-tabellar kollu għandu jsir skond ir-regolamenti preżenti tat-trasport nazzjonali u internazzjonali kif xieraq.

4. Ġbir ta' materjal djanjostiku supplementari

Skond il-ftehim mal-laboratorju djanjostiku involut, jistghu jingabru ċelloli oħrajn tal-hut ukoll u jiġu preparati għal eżaminazzjonijiet supplementari.

II. 11. Il-Preparament ta' kampjuni għal eżaminazzjoni viroloġika

1. L-Iffriżar f' każijiet eċċezzjonali

Fejn iqumu diffikultajiet prattiċi (eż., kundizzjonijiet ta' temp hażin, jiemi li ma jinhadmux, problemi bil-laboratorju, eċċ.) li jrendu impossibbli l-inokulazzjoni taċ-ċelloli f' 48 siegħa wara l-ġbir tal-kampjuni taċ-ċelloli huwa aċċettabbli li l-eżempji taċ-ċelloli jiġu ffrizati f' mezz ta' kultura taċ-ċelloli f' temperatura ta' - 20 °C jew inqas u li ssir eżaminazzjoni viroloġika f' 14-il jum. Iċ-ċelloli, pero', għandhom jiġu frizati u mdewba biss darba qabel l-eżaminazzjoni. Għandhom jinżammu reġistri bid-dettalji dwar ir-raguni għal kull iffriżar ta' kampjuni taċ-ċelloli (bħal maltemp, il-linji taċ-ċelloli mietu, eċċ)

2. L-Omoġenizzazzjoni ta' l-organi

Fil-laboratorju iċ-ċelloli fit-tubi għandhom jiġu omoġenizzati kompletament (jew b' stomacher, blender jew mortar u pestle b' ramel sterili) u wara jiġu sospizi fil-mezz tat-trasport oriġinali.

Jekk kampjun ikkonsista f'huta shiħa ta' inqas minn 4 cm, dawn għandhom jiġu kkapuljati b' imqass sterili jew scalpel wara t-tneħħija tal-gisem wara l-fetha taż-żaq. Jekk kampjun ikkonsista f'huta shiħa ta' bejn 4cm u 6cm, il-vixxri inkluzi l-kliewi għandhom jingabru. Jekk kampjun ikkonsista f'huta shiħa ta' aktar minn 6cm, għandhom jingabru eżempji ta' ċelloli kif deskritt fil-Parti 1.1.3. L-eżempji taċ-ċelloli għandhom jiġu kapuljati b' imqass sterili jew scalpel u jiġu omoġenizzati kif deskritt fuq u jiġu sospizi fil-mezz tat-trasport.

Proporzjon finali bejn materjal taċ-ċelloli u trasport għandu jiġi aġġustat fil-laboratorju għal 1:10.

3. Iċ-Ċentrifugazzjoni ta' omoġenat

L-omoġenat huwa ċentrifugat f' ċentrifuga mkessha ta' 2 °C sa 5 °C f' 2 000 sa 4 000 x g għal 15-il minuta u jingabar is-supernatant u jiġi ttratat jew għal erba' sigħat f' 15 °C jew mal-lejl f' 4 °C bl-antibjotiċi, eż., gentamicina 1 mg/ml jista' jkun utli f' dan l-istadju.

Jekk il-bgħit tal-kampjun ikun sar f' mezz ta' trasport (i.e. b' esponiment għall-antibjotiċi) it-trattament tas-supernatant bl-antibjotiċi jista' jithalla barra.

It-trattament bl-antibjotiċi jimmira li jikkontrolla l-kontaminazzjoni batterjali fil-kampjuni u jrendi l-filtrazzjoni mill-filtri għamla ta' membrane mhux neċessarji.

Jekk is-supernatant miġbur jinhażen f' temperatura ta' -80 °C f' 48 siegħa wara l-kampjunar jista' jerga' jintuża darba biss għal eżaminazzjoni viroloġika.⁽¹⁾ F' każijiet eċċezzjonali, eż fejn il-hut jingabar f' żoni remoti hafna bla ebda possibilita' ta' posta kuljum.

⁽¹⁾ F' każijiet eċċezzjonali, eż fejn il-hut jingabar f' aoni remoti hafna bla ebda possibilita' ta' posta kuljum.

Fejn ikun hemm diffikultajiet prattiċi (eż, ma jaħdimx l-inkubatur, problemi bil-kulturi taċ-ċelloli eċċ) li jrendu impossibbli l-inokulazzjoni taċ-ċelloli f' 48 siegħa wara l-għbir tal-kampjuni taċ-ċelloli, huwa aċċettabbli li l-eżempji taċ-ċelloli jiġu ffrizati f' meżż ta' kultura taċ-ċelloli f' temperatura ta' - 80 °C jew

inqas li ssir eżaminazzjoni viroloġika f' 14-il jum/Qabel l-inokulazzjoni taċ-ċelloli is-supernatant jithallat ma' partijiet indaq's ta' grupp imħallat b' mod xieraq ta' antisera mas-serotipi indieni tal-virus NPI u jiġi inkubat b' dan għal minimu ta' siegħa f' temperatura ta' 15 °C jew massimu ta' 18-il siegħa f' temperatura ta' 4 °C. It-titru tal-antiserum għandu jkun għall-inqas 1/2000 f' test ta' newtralizzazzjoni tal-plakka ta' 50 %.

It-trattament ta' l-inokuli kollha bl-antiserum għall-virus NPI (virus li f'xi partijiet ta' l-Ewropa jokkorri fil-50 % tal-kampjuni tal-hut) jimmira li jipprevjeni ECP minhabba l-virus NPI milli jiżviluppa fil-kulturi taċ-ċelloli inokulati kollha. Dan inaqqas id-dewmien ta' l-eżaminazzjonijiet viroloġiċi kif ukoll in-numru ta' każijiet li fihom l-okkorrenza ta' ECP ikollha titqies bħala potenzjalment indikativa ta' SVEV jew NHIV.

Meta l-kampjuni jiġu minn unitajiet ta' produzzjoni meqjusa liberi minn NPI, it-trattament ta' l-inokuli bl-antiserum għall-virus NPI jista' jithalla barra.

III. L-Eżaminazzjoni viroloġika

1. Il-Kulturi taċ-ċelloli u meżżi

BF-2 jew RTG-2 u ċelloli jew EPC jew FHM jitkabbru sa 20 % għal 30 °C f' meżż xieraq, eż, Eagle's MEM (jew modifiki tiegħu b' supplement ta' 10 % serum fetali bovina u antibjotiċi f' konċentrazzjonijiet standard.

Meta ċ-ċelloli jiġu kkultivati fi flieken magħluqa, huwa rakkmandat li l-meżż jitnaddaf bil-bikarbonat. Il-meżż użat għall-kultivazzjoni taċ-ċelloli f' unitajiet miftuħa jista' jgħadd b' Tris-HCl (23 mM) u Na-bicarbonate (6 mM). Il-pH għandu jkun 7.6 ± 0.2 .

Il-kulturi taċ-ċelloli li għandhom jintużaw għall-inokulazzjoni b'materja taċ-ċelloli għandhom ikunu żgħażaġh (4 sa 48 siegħa) u jikbru attivament (mhux konfluwenti) meta jiġu innokulati.

2. L-Innokulazzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli

Sospenzjoni ta' l-organi ttrattata bl-antibjotiċi tiġi innokulata fil-kulturi taċ-ċelloli f' żewġ tahlitiet, i.e., l-ewwel tahlita u oltre, tahlita tagħha ta' 1:10, li tirriżulta f' tahlitiet finali ta' materjal taċ-ċelloli f' meżż ta' kultura taċ-ċelloli ta' 1:100 u 1:1000 rispettivament, (sabiex tiġi prevenuta interferenza omologa). Għall-inqas żewġ linji taċ-ċelloli għandhom jiġu innokulati. (Ara Parti I. 111.1) Il-proporzjoni bejn id-daqs ta' l-inoculum u l-volum tal-meżż tal-kultura taċ-ċelloli għandha tkun madwar 1:10.

Għal kull tahlita u kull linja ta' ċelloli, minimu ta' xi 2 cm² arja taċ-ċelloli, li tikkorrispondi għal kontenitur f' tavlja waħda b' 24 kontenitur tal-kultura taċ-ċelloli. L-użu ta' tavli tal-kultura taċ-ċelloli hija rakkmandata, izda unitajiet oħrajn b' arja simili jew akbar biex jikbru huma aċċettabbli wkoll.

3. L-Inkubazzjoni ta' kulturi taċ-ċelloli

Kulturi taċ-ċelloli innokulati jiġu inkubati f' temperatura ta' 15 °C għal 7 sa 10 jiem. Jekk il-kultur tal-meżż tal-kultura taċ-ċelloli jinbidel minn aħmar għal isfar, li jindikar aċidifikazzjoni, għandu jsir aġġustament tal-pH b' tahlita ta' bikarbonat sterili jew sustanzi ekwivalenti sabiex tiġi aċċertata s-suxxettibilità taċ-ċelloli għall-infezzjoni virali.

Għall-inqas kull sitt xhur jew jekk hija suspettata suxxettibilità taċ-ċelloli mnaqqs, titrazzjoni ta' stokkijiet iffriżati ta' SVEV u NHIV isseħħ sabiex tiġi vverifikata s-suxxettibilità tal-kulturi taċ-ċelloli għall-infezzjoni. Proċedura ta' rakkmandazzjoni hija pprezentata fil-Parti IV.

4. Il-Mikroskopija

Kulturi taċ-ċelloli innokulati għandhom jiġu ispezzjonati regolarment (għall-inqas tliet darbiet fil-ġimgħa) għall-okkorrenza ta' ECP bi tkabbir ta' 40 sa 150 darba. Jekk tiġi osservata ECP ovvja, il-proċeduri ta' identifikazzjoni tal-virus skond il-Parti LIV għandhom jinbdeu minnufih.

5. Is-Subkultivazzjoni

Jekk ma żviluppat l-ebda ECP wara l-inkubazzjoni primarja għal 7 sa 10 jiem issir subkultivazzjoni għal kulturi taċ-ċelloli friski bl-użu ta' arja taċ-ċelloli simili għal dik tal-kultura primarja.

Aliquots ta' meżż (supernatant) mill-kulturi/kontenituri kollha li jikkonsistu fil-kultura primarja jingabru skond il-linja ta' ċelloli 7 sa 10 jiem wara l-inokulazzjoni. Il-għabriet imbagħad jiġu inokulati f' kulturi taċ-ċelloli omogeni mhux imħallta u mħallta 1:10 (li jirriżultaw f' soluzzjonijiet finali ta' 1:10 u 1:100 rispettivament, tas-supernatant) kif deskritt fil-Parti 1.11.2. Alternattivament, aliquots ta' 10 % kultura taċ-ċelloli friska li jikkonsistwixxu l-kultura primarja huwa inokulat direttament f' kontenitur b' kultura taċ-ċelloli friska (subkultivazzjoni minn kontenitur għall-iehor). L-inokulazzjoni tista' tiġi preċeduta mill-preinkubazzjoni tat-tahlitiet bl-antiserum għall-virus NPI f' tahlita xieraq kif deskritt fil-Parti 1.11.3.

Il-kulturi innokulati huma mbagħad inkubati għal 7 sa 10 ijiem f' 15 °C b' osservazzjoni bħal fil-Parti 1 111.4.

Jekk issehh ECP tossika fl-ewwel tliet ijiem ta' inkubazzjoni, is-subkultivazzjoni tista' ssir f' dak l-stadju iżda ċ-ċelloli għandhom imbagħad jiġu inkubati għal sebat ijiem u jerġgħu jiġu subkultivati b' inkubazzjoni ta' sebat ijiem ohra. Meta tiżviluppa ECP tossika wara tliet ijiem, iċ-ċelloli jistgħu jitgħaddew darba u jiġu innokulati biex jiġi akkwistat it-total ta' 14-il jum mill-innokulazzjoni primarja. M' għandu jkun hemm l-ebda evidenza ta' tossiċità fl-aħħar sebat ijiem ta' inkubazzjoni.

Jekk issehh kontaminazzjoni batterjali minkejja t-trattament bl-antibjotiċi, is-subkultivazzjoni għandhat tiġi preċeduta minn ċentrifugazzjoni ta' 2 000 sa 1000 x g għal 15 sa 30 min f' 2 to 5 °C, u/jew filtrazzjoni tas-supernatant minn filtru ta' 0,45 µm (membrane li f'it jorbot proteini). Oltre dan, il-proċeduri ta' subkultivazzjoni huma l-istess bħal għal ECP tossika.

IV. L-Identifikazzjoni tal-virus

1. It-Testijiet għall-identifikazzjoni tal-virus

Jekk giet osservata evidenza ta' ECP f' kultura taċ-ċelloli, jingabar mezz (supernatant) u jiġi eżaminat b' wahda jew aktar minn dawn it-tekniki: newtralizzazzjoni, IF, ELISA. Jekk it-testijiet ma permettwx identifikazzjoni definittiva tal-virus f' temp ta' ġimgha, is-supernatant għandu jintbagħat lil laboratorju nazzjonali ta' referenza jew għal laboratorju ta' referenza tal-UE għal mard tal-hut identifikazzjoni immedjata.

2. In-Newtralizzazzjoni

Nehhi ċ-ċelloli mis-supernatant miġbur biċ-ċentrifugazzjoni (2 000 sa 4 000 x g) jew filtrazzjoni tal-membrane (0,45 µm) b' membrane li f'it jorbot proteini u hallat lis-supernatant 1:100 u 1:10 000 f' mezz ta' kultura taċ-ċelloli.

Aliquots taż-żewġ tahlitiet ta' supernatant jithalltu u jiġu inkubati għal 60 minuta f' temperatura ta' 15 °C b' partijiet indaqs tar-reagenti segwenti separatament:

- serum li fih antikorpi speċifiċi għal gruppi kontra SVEV f' tahlita 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- serum li fih antikorpi speċifiċi għal gruppi kontra NHIV f' tahlita 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- ġabriet ta' antisera kontra s-serotipi indigeni ta' IPNV f' tahlita 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- mezz wahdu (kontroll pożittiv)

Minn kull tahlita ta' supernatant-serum tal-virus għall inqas żewġ kulturi taċ-ċelloli jiġu innokulati b' 5- pl kull wiehed u mbagħad jiġu inkubati f' temperature ta' 15 °C. Jiġi verifikat l-iżvilupp ta' ECP kif deskritt fil-Parti 1 111.4.

Xi strains ta' SVEV ma jirreaġixx f' testijiet ta' newtralizzazzjoni. Tali izolati għandhom jiġu identifikati b' IF jew ELISA.

Testijiet ta' newtralizzazzjoni ohrajn b' effikaċja ppruvata jistgħu jintużaw alternattivament.

3. L-IF

Biex jiġi identifikat kull isolat tal-virus, għall-inqas tmien hġigiet jew ekwivalent jinżerghu b' ċelloli ta' densità li twassal għal madwar 60 % sa 90 % konfluwenza wara 24 siegħa ta' kultivazzjoni. Ċelloli EPC huma rakkmandati għal dan l-iskop minhabba l-aderenza qawwija tagħhom ma' uċuh tal-hġieg iżda linji ohrajn ta' ċelloli bħal BF-2, RTG-2 jew FHM jistgħu jintużaw ukoll.

Meta ċ-ċelloli ssedimentaw mal-wiċċ tal-hġieg (xi siegħa wara ż-żriegħ) jew meta l-kulturi inkubaw għal sa 24 siegħa, il-virus li għandu jiġi identifikat jiġi inokulat. Jiġu inokulati erba; kulturi f' proporzjon ta' volum għal volum ta' 1:10, u erba' kulturi f' proporzjon ta' 1:1000. Dawn imbagħad jiġu inkubati f' temperatura ta' 15 °C għal 20 sa 30 siegħa.

Wara l-inkubazzjoni, il-kulturi jitlallu darbtejn f' Eagle's MEM bla serum, iffissat f' aċeton 80 % kiesaħ silġ u mbagħad imtebba' permezz ta' TAFI ta' żewġ saffi. L-ewwel saff reagent jikkonsisti f' antikorpi poliklonali jew monoklonali ta' kwalità riferenti. It-tieni saff reagenti huwa antiserum konjugat b' Florokrom ma' l-immunoglobulin użat fl-ewwel saff. Għal kull wiehed mill-antisera ttestjat għall-inqas kultura wahda b' inokulazzjoni b' doża qawwija u ohra b' inokulazzjoni b' doża baxxa għandhom jittebbgħu. Għandhom jiġu inkluzi fit-test kontrolli tajbin negative jew pożittivi. Florokromi bħal FIX jew TRITC huma rakkmandati.

Għamel il-kultura mtebba' b' salina glicerola. Eżamina taht dawl ultravjola incidenti (UV). Uża lentijiet 10 x jew 12 x u lentijiet ta' x 25 u x 40 ogġettivi b' aperture numeriċi > 0,7 u > 1,3, rispettivament.

Din it-teknika IF tingħata bħala eżempju. Xi tekniki ohrajn IF (rigward kulturi taċ-ċelloli, fissazzjoni u antikorpi ta' kwalità riferenti ta; effikaċja ppruvata jistgħu jintużaw alternattivament.⁽¹⁾ Jew kif speċifikat mil-laboratorju referent rigward il-possibbli ċitotossicità ta' l-antisera.

⁽¹⁾ Jew kif speċifikat mil-laboratorju referent rigward il-possibbli ċitotossicità ta' l-antisera.

4. L-ELISA

Kontenituri f' platti mikrotitri huma miksija mal-lejl b' tahlitiet rakkmandat ta' immunoglobulin purifikat ishma żgħar ta' antikorpi ta' kwalita' ta' referenza.

Wara tlaħliħ tal- kontenituri b' buffer PBS-Tween-20, il-virus li għandu jiġi identifikat jiżdied mal-kontenituri f' stadji ta' tahlit ta' tnejn jew erbgħa u permess li jirreaġixxi mal-antikorp li jiksi għal 60 minuta f' temperatura ta' 37 °C. Wara tlaħliħ b' buffer PBS-Tween-20, l-antikorpi biotinilati ta' speċifità li tikkorrespondu għal dik ta' l-antikorpi li jiksu jiżdiedu u jiġu permessi li jirreaġixxu għal 60 minuta f' temperatura ta' 20 °C. Wara tlaħliħ oħra bħal fuq, streptavidin konjugata b' HRP jiżdied u jiġi permess li jirreaġixxi għal siegħa f' temperatura ta' 20 °C. Wara l-aħħar tlaħliħ, tiġi viżwalizzata enzyime imwahnha bl-użu ta' substrati xierqa ta' ELISA (OPD jew oħrajn).

Il-verżjoni ta' ELISA msemija fuq ibbażat fuq biotina-avidina jingħata bħala eżempju. Jistgħu jintużaw verżjonijiet oħrajn ta' ELISA b' effikaċja pruvata minflok.

TABELLA 1A

Skema ta' spezzjoni u kampjunar għal żoni u għal irziezet f' żoni mhux approvati għat-terminu ta' kontroll ta' sentejn li jippreċedi l-akkwist ta' stat approvat għal SVE u NEI

(skond id-Direttiva 91/67/KEE, l-Annessi B u C u d-dispożizzjonijiet fl-I Parti ta' dan l-Anness)

	Numru ta' ispezzjonijiet kliniċi fis-sena	Numru ta' eżaminazzjonijiet laboratorji fis-sena	Eżaminazzjoni laboratorja għall-preżenza ta' virus ⁽¹⁾	
			Numru ta' hut li qed jikber (Materjal ta' organi)	Numru ta' hut żgħir (Fluwidu ovarjan)
Żoni u rziezet kontinentali				
(a) Irziezet bil-hut żgħir	2	2	120 (l-ewwel spezzjoni) ⁽²⁾ 150 (it-tieni spezzjoni)	30 (l-ewwel spezzjoni) ⁽³⁾ 0 (it-tieni spezzjoni)
(b) Irziezet bil-hut żgħir biss	2	1	0	150 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet) ⁽³⁾
(c) Irziezet bla hut żgħir	2	2	150 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet)	0
Żoni u rziezet kostali				
(a) Irziezet bil-hut żgħir	2	2	120 (l-ewwel spezzjoni) 150 (it-tieni spezzjoni)	30 (l-ewwel spezzjoni) ⁽³⁾ 0 (it-tieni spezzjoni)
(b) Irziezet salmonidi bil-hut żgħir	2	2	30 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet) ⁽⁴⁾	0
(c) Irziezet mhux salmonidi bil-hut żgħir	2	2	150 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet)	0

Massimu ta' hut f' kull vaska: 10

⁽¹⁾ Alternattivament, jista' jintuża kampjun b' daqs imnaqqas kif elenkat fit-Tabella 1.B jekk il-htigiet deskritti fit-test tal-Partijiet 11.1, 1.1.2.1.b u III jintlaħqu.

⁽²⁾ Spezzjonijiet kliniċi

⁽³⁾ F' ċirkostanzi eċċezzjonali, jekk huwa impossibbli li jiġi akkwistat fluwidu ovarjan, l-organi jistgħu jiġu kkampjunati minflok.

⁽⁴⁾ Il-kampjuni għandhom jingabru mhux qabel tliet ġimgħat wara t-trasferiment tal-hut minn ilma frisk għal ilma mielah.

TABELLA I.B

Skema ta' spezzjoni u kampjunar għal żoni u għal irziezet f'żoni mhux approvati għat-terminu ta' kontroll ta' sentejn li jippreċedi l-akkwist ta' stat approvat għal SVE u NEI f' żoni u rziezet f' żoni mhux approvati bi storja uffiċjalment magħrufa iddokumentata ta' libertà minn dan il-mard

(skond id-Direttiva 91/67/KEE, l-Annessi B u C u d-dispożizzjonijiet fl-I u t-III Partijiet ta' dan l-Anness)

	Numru ta' ispezzjonijiet kliniċi fis-sena	Numru ta' eżaminazzjonijiet laboratorji fis-sena	Eżaminazzjoni laboratorja għall-preżenza ta' virus	
			Numru ta' hut li qed jikber (Materjal ta' organi)	Numru ta' hut żgħir (Fluwidu ovarjan)
Żoni u rziezet kontinentali				
(a) Irziezet bil-hut żgħir	2	2	0 (l-ewwel spezzjoni) ⁽¹⁾ 30 (it-tieni spezzjoni)	30 (l-ewwel spezzjoni) ⁽²⁾ 0 (it-tieni spezzjoni)
(b) reine Brutanlagen	2	1	0	30 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni) ⁽²⁾
(ċ) Irziezet bla hut żgħir	2	2	30 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet)	0
Żoni u rziezet kostali				
(a) Irziezet bil-hut żgħir	2	2	0 (l-ewwel spezzjoni) 30 (it-tieni spezzjoni)	30 (l-ewwel spezzjoni) ⁽²⁾ 0 (it-tieni spezzjoni)
(b) Irziezet salmonidi bil-hut żgħir	2	2	30 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet) ⁽³⁾	0
(ċ) Irziezet mhux salmonidi bil-hut żgħir	2	2	30 (l-ewwel u t-tieni spezzjonijiet)	0

Numru massimu ta' hut f' kull vaska: 10

⁽¹⁾ Ispezzjonijiet kliniċi.

⁽²⁾ F' ċirkostanzi eċċezzjonali, jekk huwa impossibbli li jiġi akkwistat fluwidu ovarjan, l-organi jistgħu jiġu kkampjunati minflok.

⁽³⁾ Il-kampjuni għandhom jingabru mhux qabel tliet ġimgħat wara t-trasferiment tal-hut minn ilma frisk għal ilma mielah.

TABELLA 1C

Skema ta' ispezzjoni u kampjunar għal żoni u għal irziezet f'żoni mhux sabiex jinżamm l-istat approvat għal SVE u NEI

(skond id-Direttiva 91/67/KEE, l-Annessi B u C u d-dispożizzjonijiet fl-I Parti ta' dan l-Anness)

	Numru ta' ispezzjonijiet kliniċi fis-sena	Numru ta' hut fil-grupp tal-kampjun għall-eżaminazzjoni laboratorja ⁽¹⁾	
		Numru ta' hut li qed jikber (Materjal ta' organi)	Numru ta' hut żgħir (Fluwidu ovarjan)
Żoni u rziezet kontinentali			
(a) Irziezet bil-hut żgħir	2	20 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni) I	10 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni) ⁽²⁾

	Numru ta' ispezzjonijiet klinici fis-sena	Numru ta' hut fil-grupp tal-kampjun għall-eżaminazzjoni laboratorja ⁽¹⁾	
		Numru ta' hut li qed jikber (Materjal ta' organi)	Numru ta' hut żgħir (Fluwidu ovarjan)
(b) Irziezet bil-hut żgħir biss	2	0	30 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni) ⁽²⁾
ċ) Irziezet bla hut żgħir	2	30	0
Żoni u rziezet kostali			
(a) Irziezet bil-hut żgħir	2	20 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni)	10 (l-ewwel jew it-tieni spezzjoni) ⁽²⁾
(b) Irziezet bla hut żgħir	1	30 ⁽³⁾	0

umru massimu ta' hut f' kull vaska: 10

⁽¹⁾ F' żoni approvati l-kampjuni iridu jingabru b' rotazzjoni f' 50 % ta' l-irziezet tal-hut kull sena. Fi rziezet approvati f' żoni mhux approvati il-kampjuni jridu jingabru kull sena.

⁽²⁾ F' ċirkostanzi eċċezzjonali, jekk huwa impossibbli li jiġi akkwistat fluwidu ovarjan, l-organi jistghu jiġu akkumpanjati minflok.

⁽³⁾ l-kampjuni għandhom jingabru mhux qabel tliet ġimgħat wara t-trasferiment tal-hut minn ilma frisk għal ilma mielah.

IT-II PARTI

Proċeduri djanjostiċi għall-konferma ta' SVE u NEI f' ġrajiet suspettati

Għandha ssir teknika waħda jew aktar minn dawn għad-djanjosi ta' SVE u NEI:

- A. iżolazzjoni tal-virus konvenzjonali b' identifikazzjoni seroloġika sussegwenti tal-virus
- B. iżolazzjoni tal-virus b' identifikazzjoni seroloġika simultanja,
- C. tekniċi djanjostiċi oħrajn (TAFL, ELISA).

Il-konferma ta' l-ewwel każ ta' SVE u/jew NEI f' irziezet f' żoni approvati m' għandhiex tkun ibbażata fuq il-metodu C waħda. Għandu jintuża wkoll jew il-metodu A jew il-metodu B.

Il-materjal maħsub għal eżaminazzjoni viroloġika jista' f' xi każijiet jehtieg li jiġi akkumpanjat minn materjal supplementari għal eżaminazzjoni batterjoloġika, parasitoloġika, histoloġika jew oħrajn biex tiġi permessa djanjosi differenzjali.

A. Iżolazzjoni tal-virus konvenzjonali b' identifikazzjoni seroloġika sussegwenti tal-virus

I.1. 1.1. Għażla tal-kampjuni

Ta' l-inqas 10 hut li juru sinjali tipiċi tal-virus SVE jew NEI iridu jingħażlu għal eżami

I.2. 1.2. Preparament u bghit tal-kampjuni mill-hut

Kif stabbilit fil-Parti 1.1.3

I.3. 1.3. Ġbir ta' materjal djanjostiku supplementari

Kif stabbilit fil-Parti 1.1.4

II. 1.1. Preparament ta' kampjuni għall-eżaminazzjoni viroloġika

Kif stabbilit fil-Parti 1.1.1

III. Eżaminazzjoni viroloġika

Kif stabbilit fil-Parti 1.1.1.1

IV. Identifikazzjoni tal-virus

Kif stabbilit fil-Parti LIV

B. Iżolazzjoni tal-virus b'identifikazzjoni seroloġika simultanja

I.1. Għażla tal-kampjuni

Kif stabbilit fil-Parti II.A.I.1

I.2. 1.2. Preparament u bghit tal-kampjuni mill-hut

Kif stabbilit fil-Parti 1.1.3

I.3. 1.3. Ġbir ta' materjal djanjostiku supplementari

Kif stabbilit fil-Parti 1.1.4

II.1. 11.1. Omoġenizzazzjoni ta' l-organi

Kif stabbilit fil-Parti 1.11.2

II.2. 11.2. Ċentrifugazzjoni ta' l-omoġenat

L-omoġenat huwa ċentrifugat f' ċentrifuga mkessha għal 2 °C sa 5 °C għal 2 000 sa 4 000 x g għal 15-il minuta u jingabar is-supernatant u jiġi trattat għal erba' sigħat f' temperatura ta' 15 °C bl-antibjotiċi, eż ġentamiċina f' 1 mg/ml, jew iffiltrata mill-membrane (0,45 µm) minn membrane li f'it jorbot proteini.

II.3. 11.3. Trattament tas-supernatant b' antisera djanjostiċi

Is-sospensjoni ta' organi trattat bl-antibjotiċi jew iffiltrat mill-membrane jithallat 1:10 u 1:1000 f' mezz ta' kultura taċ-ċelloli u jithallu aliquots u jiġu inkubati għal 60 minuta f' temperatura ta' 15 °C b' partijiet indaqs tar-reagenti elenkati fil-Parti LIV.2.

III.1. 111.1. Kulturi taċ-ċelloli u mezzi

Kif stabbilit fil-Parti 1 111.1

III.2. 111.2. Innokulazzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli

Minn kull tahlita tas-serum tal-virus (ippreparata kif stabbilit fil-Parti II.B.11.3) jiġu inokulati għall-inqas żewġ kulturi taċ-ċelloli b' 50 ul kull wieħed.

III.3. 111.3. Inkubazzjoni tal-kulturi taċ-ċelloli

Kif stabbilit fil-Parti 1 111.1

III.4. 111.4. Mikroskopija

Il-kulturi taċ-ċelloli inokulati huma spezzjonati kuljum għall-okkorrenza ta' ECP bi tkabbir ta' 40 sa 150 darba. Jekk ECP tiġi prevenuta minn wieħed mill-antisera użati, il-virus jista' jitqies li ġie identifikat f' dan is-sens.

Jekk ma tiġix prevenuta ECP b' xi antisera, għandhom isiru proċeduri ta' identifikazzjoni tal-virus skond il-Parti I.IV.

III.5. 111.5. Subkultivazzjoni

Jekk ma sehhet l-ebda ECP wara 7 sa 10 ijiem għandha ssir subkultivazzjoni minn kulturi inokulati bis-supernatant u bil-mezz (Parti II.B.11.3) skond il-Parti 1 111.5.

C. Tekniċi djanjostiċi oħrajn

Is-supernatant ippreparat kif deskritt fil-Parti 1.11.2 jista' jiġi sottomess għal TAFI jew ELISA skond il-Parti LIV.3 jew il-Parti LIVA rispettivament. Dawn it-tekniki rapidi għandhom jiġu supplimentati b' eżaminazzjoni viroloġika jew skond A jew skond B fi żmien 48 siegħa mill-kampjunar, jekk:

- (a) ikun hemm riżultat negattiv; jew
- (b) ikun hemm riżultat pozittiv b' materjal li jirrappreżenta l-ewwel każ ta; NEI jew SVE f' zona approvata.

Il-materjal taċ-ċelloli jista' jiġi soġġettat għal tekniċi djanjostiċi oħrajn bħal RT-PCR, IF fuq taqsimiet iffriżati, immunohistokimika fuq materjal taċ-ċelloli iffissat bil-formalina. Dawn it-tekniki għandhom dejjem jiġu akkumpanjati minn inokulazzjoni ta' materjal taċ-ċelloli mhux iffissata fuq kulturi taċ-ċelloli.

III PARTI

Storja dokumentata ta' liberta' minn SVE u/jew NEI f'żoni jew irziezet li huma f'żoni mhux approvati

Gwidi u kriterji għal programm uffiċjali ta' spezzjoni sanitarja

1. Programm uffiċjali ta' spezzjoni sanitarja tista' tiġi inizzata biss jew:
 - wara programm ta' eradikazzjoni uffiċjalment magħruf għal SVEV u/jew NHIV inkluż it-tnehhija tal-hut kollha fil-razzett, tindif, diżinfettar, u fallowing qabel stukkjar mill-ġdid bil-hut minn irziezet approvati, jew
 - fuq irziezet bl-ebda storja ta' infezzjoni minn SVEV jew NHIV.
2. Il-programm ta' spezzjonijiet sanitarji għandu jkun ibbażat kemm fuq spezzjonijiet kliniċi kif ukoll eżaminazzjonijiet laboratorji.
3. Il-programm għandu jinkludi żewġ spezzjonijiet kliniċi annwali skond il-gwidi li jinsabu fl-I Parti.

4. Għall-inqas waħda mill-spezzjonijiet imwettqa kull sena, għandhom jinġabru 30 kampjun taċ-ċelloli tal-hut u/jew fluwidu ovarjan minn kull razzett. Il-kampjuni għandhom jintgħażlu, jiġu ppreparati u soġġettati għal eżaminazzjoni laboratorja skond il-Partijiet I, II u IV.
5. Il-programm ta' spezzjonijiet sanitarji għandu jsir għall-inqas għal erba' snin fl-irziezet kolha fiż-żona jew fir-razzett (f' zona mhux approvata) li għandhom jiġu approvati.
6. Għall-għarfien uffiċjali tal-programm, m'għandu jsir jew jinkixef l-ebda każ ta' SVE jew NEI (l-ebda infezzjoni klinika jew iżolament tal-virus).

IV PARTI

Il-Proċedura għat-titrazzjoni biex tiġi verifikata s-suxxettibilità tal-kulturi taċ-ċelloli għall-infezzjoni

Il-proċeduri rakkmandati għat-titrazzjoni msemmija fil-Parti 1 111.3 jingħataw isfel.

Għandhom jintużaw għall-inqas żewġ iżolati ta' SVEV u iżolat wiehed ta' NHIV. L-iżolati għandhom jirrappreżentaw l-akbar grupp ta' viruses fl-UE, eż, għal SVEV iżolat wiehed patogeniku mit-troti fl-ilma frisk u iżolat wiehed marin patogeniku għal rombu u għal NHIV, strain wiehed patogeniku tat-troti mill-Ewropa. Għandhom jintużaw iżolati definiti sew mill-Istati Membri. Iżolati referenti huma disponibbli mil-laboratorji ta' riferenza tal-UE għall-mard tal-hut.

Gruppi ta' virus f' numri baxxi ta' kulturi taċ-ċelloli huma propagate fi fliexken tal-kulturi taċ-ċelloli fuq ċelloli BF-2 jew RTG-2 għal SVEV u fuq ċelloli EPC jew FHM għal NHIV. Għandu jintuża meżż ta' kultura taċ-ċelloli b' għall-inqas 10 % serum. Uża MOI baxx għall-inokulazzjoni (< 1).

F' ECP totali, il-virus jiġi mahsud b' ċentrifugazzjoni tas-supernatant tal-kultura taċ-ċelloli ta' 2 000 x g għal 15-il minuta, sterilizzat bil-filtri minn filtru tal-membrane 0,45 μ m u distribwit f' kriotubi tabellati. Il-virus jinżamm f' temperatura ta' - 80 °C.

Gimgha wara l-iffriżar, tliet fliexken replikati b' kull virus jiddewbu taht ilma kiesah u jiġu titrati fuq il-linji rispettivi taċ-ċelloli tagħhom. Għall-inqas kull sitt xhur, jew jekk huwa suspettat li s-suxxettibilità ta' linja taċ-ċelloli naqset, kull iżolat tal-virus jiġi mdewweb jew titrat.

Proċeduri ta' titrazzjoni għandhom jiġu deskritti fid-dettal u l-istess proċeduri jiġu segwiti kull darba.

Titrazzjoni b' tahlita fit-tarf għandu jinkludi għall-inqas sitt repliki f' kull pass ta' tahlit. It-titri jiġu mqabbla ma' titri akkwistati qabel. Jekk it-titri ta' kwalunkwe mit-tliet iżolati tal-virus taqa' b' fattur ta' żewġ logs jew aktar, imqabbel mat-titru inizzjali, il-linja ta' ċelloli m' għadx irid jintuża għal skopijiet ta' sorveljanza.

Jekk jinżammu linji differenti taċ-ċelloli fil-laboratorju kull linja għandha tiġi eżaminata separatament.

Għandhom jinżammu reġistri għall-inqas għal 10 snin

V PARTI

L-Akronimi u t-taqisriet

BF-2	<i>Bluegill fry -2 (cell line)</i>
ECP	Effett Ċitopatiku
LRK	Laboratorju ta' riferenza Komunitarju tal-mard tal-hut
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (linja taċ-ċelloli)
FHM	<i>Fathead minnow</i> (linja taċ-ċelloli)
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
Aċtu	Sulfoniku Hepes N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane
HRP	Perosidatt tal-Horseradish
IF	Immunofloressenza
TAFI	Test ta' antikorpi florexenti indirett
NHIV	Nekrozi hematopejka infettuża (virus)
NPI	Nekrozi Pankreatika Infettuża (virus)
MEM	Mezz essenzjali minimu

MOI	Multipliċità ta' infezzjoni (proporzjon ta' partikli tal-virus infettuż miżjuda ma' numru maghruf ta' ċelloli f' kultura)
OPD	<i>Ortho phenylene diamine</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RTG-2	Testikoli tat-troiti (linja taċ-ċelloli)
RT-PCR	<i>Reversed transcriptase polymerase chain reaction</i>
Tris-HCl	<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane - HCl</i>
TRITC	<i>Tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate</i>
SVE(V)	Settiċimja virali emorragika (virus)
