

## II

(Πράξεις για την ισχύ των οποίων δεν απαιτείται δημοσίευση)

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ

## ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 22ας Φεβρουαρίου 2001

**για τον καθορισμό των τεχνικών δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων για την ανίχνευση και τη διαπίστωση ορισμένων ασθνεσιών ιχθύων, καθώς και για την κατάργηση της απόφασης 92/532/ΕΟΚ**

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2001) 426]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2001/183/ΕΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής 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>, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 98/45/ΕΚ <sup>(2)</sup>, και ιδίως το άρθρο 15,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Οι τεχνικές δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τη διαπίστωση ορισμένων ασθνεσιών ιχθύων έχουν καθοριστεί με την απόφαση 92/532/ΕΟΚ της Επιτροπής <sup>(3)</sup>, όπως τροποποιήθηκε από την απόφαση 96/240/ΕΚ <sup>(4)</sup>.
- (2) Από την εποχή της έκδοσης της απόφασης 92/532/ΕΟΚ έχουν επιτευχθεί νέες πρακτικές και επιστημονικές εξελίξεις και έχει τροποποιηθεί η οδηγία 91/67/ΕΟΚ. Τούτο απαιτεί την ενημέρωση των τεχνικών δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων.
- (3) Η εν λόγω ενημέρωση αφορά την εξέταση και τον εντοπισμό των ιών που προκαλούν ιογενή αιμορραγική σηψαιμία (VHS) και τις αλλαγές σύμφωνα με τις τελευταίες τροποποιήσεις της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ.
- (4) Έχει ζητηθεί η γνώμη του κοινοτικού εργαστηρίου αναφοράς για ασθένειες ιχθύων, το οποίο συνεστήθη με την οδηγία 93/53/ΕΟΚ του Συμβουλίου <sup>(5)</sup>.

(5) Για λόγους σαφήνειας, πρέπει να καταργηθούν οι τεχνικές δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση ορισμένων ασθνεσιών ιχθύων, που θεσπίστηκαν με την απόφαση 92/532/ΕΟΚ.

(6) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης κτηνιατρικής επιτροπής,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

## Άρθρο 1

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

## Άρθρο 2

Με την παρούσα απόφαση καταργείται η απόφαση 92/532/ΕΟΚ.

## Άρθρο 3

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 22 Φεβρουαρίου 2001.

Για την Επιτροπή

David BYRNE

Μέλος της Επιτροπής

<sup>(1)</sup> ΕΕ L 46 της 19.2.1991, σ. 1.<sup>(2)</sup> ΕΕ L 189 της 3.7.1998, σ. 12.<sup>(3)</sup> ΕΕ L 337 της 21.11.1992, σ. 18.<sup>(4)</sup> ΕΕ L 79 της 29.3.1996, σ. 19.<sup>(5)</sup> ΕΕ L 175 της 19.7.1993, σ. 23.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΙΟΓΕΝΟΥΣ ΑΙΜΟΡΡΑΓΙΚΗΣ ΣΗΨΑΙΜΙΑΣ (VHS) ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΔΟΥΣ ΑΙΜΑΤΟΠΟΙΗΤΙΚΗΣ ΝΕΚΡΩΣΗΣ (IHN)**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν παράρτημα:

- α) παρέχει τις γενικές κατευθύνσεις και τις ελάχιστες απαιτήσεις για τις τεχνικές δειγματοληψίας και τις διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της ιογενούς αιμορραγικής σηψαιμίας (VHS) και της λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης (IHN).
- β) ενσωματώνει τις διατάξεις των παραρτημάτων της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ για την έγκριση και τη διατήρηση του καθεστώτος ζωνών και εκμεταλλεύσεων σε μη εγκεκριμένες ζώνες.
- γ) θεσπίζει τις διατάξεις που αποσκοπούν στην ενδεδειγμένη διάγνωση της VHS και της IHN, καθώς και στην επίσημη αναγνώριση του καθεστώτος των ζωνών και εκμεταλλεύσεων σε μη εγκεκριμένες ζώνες, σύμφωνα με τα άρθρα 5 και 6 της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ.
- δ) απευθύνεται τόσο στις αρχές που είναι αρμόδιες για τον έλεγχο της VHS και της IHN, καθώς και στο προσωπικό των εργαστηρίων που διεξάγει τις δοκιμασίες για τις εν λόγω ασθένειες. Επίσης, δίδεται έμφαση στις διαδικασίες δειγματοληψίας, στις αρχές και στις εφαρμογές των εργαστηριακών δοκιμών και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους, καθώς επίσης και στις λεπτομερείς εργαστηριακές μεθόδους. Εντούτοις, εφόσον παρίσταται ανάγκη, τα εργαστήρια δύνανται να επιφέρουν τροποποιήσεις στις δοκιμασίες που περιγράφονται στο παρόν παράρτημα, ή να χρησιμοποιούν διαφορετικές δοκιμασίες, υπό τον όρο ότι θα είναι δυνατόν να αποδεικνύεται ανάλογος βαθμός ευαισθησίας και ισοδύναμα ειδικά χαρακτηριστικά.

Το μέρος I περιλαμβάνει τεχνικές δειγματοληψίας και διαγνωστικές μεθόδους για τον έλεγχο της VHS και της IHN, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται και να διατηρείται η αναγνώριση μιας ζώνης ή εκμετάλλευσης σε μη εγκεκριμένη ζώνη.

Στο μέρος II περιγράφονται οι διαδικασίες δειγματοληψίας για την επιβεβαίωση της VHS και της IHN, σε περίπτωση που υπάρχουν υποψίες.

Στο μέρος III καθορίζονται τα κριτήρια και οι γενικές κατευθύνσεις για ένα πρόγραμμα επίσημης υγειονομικής επιθεώρησης, τεκμηριώνοντας το ιστορικό της απαλλαγής από την VHS ή/και την IHN.

Στο μέρος IV παρέχονται συστάσεις σχετικά με τη διαδικασία τιτλοδότησης για την επαλήθευση της δεκτικότητας των καλλιεργειών κυττάρων στη μόλυνση.

Τα ακρωνύμια και οι συντμήσεις παρατίθενται στο μέρος V.

## ΜΕΡΟΣ I

**Τεχνικές δειγματοληψίας και διαγνωστικές μέθοδοι για τον έλεγχο της VHS και της IHN, με σκοπό την επίτευξη και τη διατήρηση του καθεστώτος έγκρισης μιας ζώνης ή εκμετάλλευσης εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης****I. Επιθεωρήσεις και δειγματοληψία**

1. Γενικές διατάξεις σχετικά με τις κλινικές υγειονομικές επιθεωρήσεις, τη συλλογή και την επιλογή των δειγμάτων για τον έλεγχο ζωνών ή εκμεταλλεύσεων εντός μη εγκεκριμένων ζωνών, έτσι ώστε να επιτευχθεί ή να διατηρηθεί το καθεστώς έγκρισης σχετικά με την VHS ή/και την IHN

Στους πίνακες 1A, 1B και 1Γ περιγράφονται συνοπτικά οι κλινικές υγειονομικές επιθεωρήσεις και η δειγματοληψία ιστών ιχθύων ή/και ωοθηκικού υγρού, που διεξάγονται σε ζώνες ή εκμεταλλεύσεις εντός μη εγκεκριμένων ζωνών, με σκοπό την επίτευξη ή τη διατήρηση του καθεστώτος έγκρισης όσον αφορά τη VHS ή/και την IHN, σύμφωνα με τα παραρτήματα Β και Γ της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ. Περισσότερες λεπτομέρειες περιλαμβάνονται στα σημεία 2 έως 4 κατωτέρω. Οι πίνακες 1A και 1B δεν ισχύουν για νέες εκμεταλλεύσεις και εκμεταλλεύσεις που επαναλαμβάνουν τις δραστηριότητές τους με ιχθείς, αυγά ή ώριμα αναπαραγωγικά κύτταρα, από μια εγκεκριμένη ζώνη ή εκμετάλλευση εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης, υπό τον όρο ότι θα πληρούν τις απαιτήσεις που ορίζονται στην οδηγία 91/67/ΕΟΚ παράρτημα Γ μέρος Ι.Α σημείο 6 στοιχεία α) ή β), ή μέρος ΙΙ.Α σημείο 3 στοιχεία α) ή β).

Οι εκμεταλλεύσεις πρέπει να επιθεωρούνται κλινικά κατά την περίοδο από Οκτώβριο έως τον Ιούνιο ή όποτε η θερμοκρασία του νερού είναι κατώτερη από 14 °C. Εφόσον οι εκμεταλλεύσεις πρέπει να επιθεωρούνται δύο φορές το χρόνο, τα μεταξύ των ελέγχων χρονικά διαστήματα πρέπει να είναι τουλάχιστον τέσσερις μήνες. Επιθεωρούνται όλες οι μονάδες παραγωγής (τεχνητές λίμνες, δεξαμενές, δικτυοκλωβοί κ.λπ.), προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ιχθύων νεκρών, αδύναμων, ή με ασυνήθη συμπεριφορά. Πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στο σημείο απορροής του νερού, όσον τείνουν να συγκεντρώνονται οι αδύναμοι ιχθείς, εξαιτίας του υδατικού ρεύματος.

Για τη δειγματοληψία, οι ιχθείς επιλέγονται ως ακολούθως:

- εφόσον υπάρχουν ιριδιζουσες πέστροφες, πρέπει να επιλέγονται για δειγματοληψία μόνον ιχθείς του εν λόγω είδους. Εφόσον δεν υπάρχουν ιριδιζουσες πέστροφες, το δείγμα πρέπει να λαμβάνεται από ιχθείς όλων των λοιπών ειδών που υπάρχουν, εάν τα είδη αυτά είναι ευπρόσβλητα από τον VHSV ή/και τον IHNV (όπως απαριθμούνται στο παράρτημα Α της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ του Συμβουλίου). Τα είδη ιχθύων πρέπει να αντιπροσωπεύονται κατ' αναλογία στο δείγμα·
- εφόσον χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία πηγές νερού για την παραγωγή ψαριών, ψάρια που αντιπροσωπεύουν όλες τις πηγές οφείλουν να συμπεριλαμβάνονται στο δείγμα·
- εφόσον υπάρχουν ιχθείς αδύναμοι, με ασυνήθη συμπεριφορά, ή πρόσφατα νεκροί (όχι σε αποσύνθεση), πρέπει να συλλέγονται πρώτα οι ιχθείς αυτοί. Εφόσον δεν υπάρχουν τέτοιου είδους ιχθείς, οι ιχθείς που επιλέγονται πρέπει να περιλαμβάνουν υγιείς ιχθείς με φυσιολογική εμφάνιση, οι οποίοι να έχουν συλλεχθεί κατά τρόπο που στο δείγμα να αντιπροσωπεύονται κατ' αναλογία όλα τα τμήματα της εκμετάλλευσης, καθώς και όλες οι ηλικιακές κλάσεις.

2. *Ειδικές διατάξεις, συμπεριλαμβανομένης της συλλογής των δειγμάτων, για την επιτήρηση ζωνών ή εκμεταλλεύσεων εντός μη εγκεκριμένων ζωνών, με σκοπό την επίτευξη ή τη διατήρηση του καθεστώτος έγκρισης όσον αφορά την VHS ή/και την IHN*

1. Μια ζώνη ή εκμετάλλευση εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης, που υπόκειται σε επιθεώρηση από τις επίσημες υπηρεσίες, δύναται να αποκτήσει καθεστώς έγκρισης σχετικά με την VHS ή/και την IHN, υπό τον όρο, είτε:

α) Υπόδειγμα Α — διετές πρόγραμμα επιθεώρησης

Μετά από δύο τουλάχιστον έτη απουσίας τυχόν κλινικών ή άλλων συμπτωμάτων της VHS ή/και της IHN, όλες οι εκμεταλλεύσεις στη ζώνη, ή κάθε εκμετάλλευση εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης, που πρόκειται να εγκριθεί, πρέπει να υφίσταται υγειονομική επιθεώρηση δύο φορές το έτος, επί δύο έτη. Κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου ελέγχου, που προηγείται της απόκτησης του καθεστώτος έγκρισης, πρέπει να συνεχίζεται η απουσία κλινικών ή άλλων συμπτωμάτων της VHS ή/και της IHN και τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται για εξέταση, σύμφωνα με τον πίνακα 1Α. Στη συνέχεια, τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται, να υφίστανται προετοιμασία και να εξετάζονται, όπως περιγράφεται στο παρόν μέρος ΙΙ έως ΙΙV και από τις εργαστηριακές εξετάσεις πρέπει να προκύπτουν αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά την VHS ή/και την IHN·

είτε:

β) Υπόδειγμα Β — διετές πρόγραμμα επιθεώρησης με μειωμένο μέγεθος δείγματος

Μετά από την εφαρμογή ενός επίσημου προγράμματος υγειονομικής επιθεώρησης, με το οποίο τεκμηριώνεται το ιστορικό της απαλλαγής από την VHS ή/και την IHN για περίοδο τουλάχιστον τεσσάρων ετών, όλες οι εκμεταλλεύσεις στη ζώνη αυτή, ή, κάθε εκμετάλλευση εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης, που πρόκειται να εγκριθούν, πρέπει να υπόκεινται σε υγειονομική επιθεώρηση δύο φορές το έτος, επί δύο έτη. Κατά τη διάρκεια της εν λόγω διετούς περιόδου ελέγχου, που προηγείται της απόκτησης του καθεστώτος έγκρισης, πρέπει να συνεχίζεται η απουσία κλινικών ή άλλων συμπτωμάτων της VHS ή/και της IHN και τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται για εξέταση, σύμφωνα με τον πίνακα 1 Β. Στη συνέχεια, τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται, να υφίστανται προετοιμασία και να εξετάζονται, όπως περιγράφεται στο παρόν μέρος ΙΙ έως ΙΙV και από τις εργαστηριακές εξετάσεις πρέπει να προκύπτουν αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά την VHS ή/και την IHN. Προκειμένου ένα πρόγραμμα υγειονομικής επιθεώρησης, να αναγνωριστεί από τις επίσημες υπηρεσίες για να αποδειχθεί η απαλλαγή από την VHS ή/και την IHN, πρέπει να πληροί τα κριτήρια και τις γενικές κατευθύνσεις που ορίζονται στο μέρος ΙΙΙ.

2. *Ειδικές διατάξεις για την έγκριση νέων εκμεταλλεύσεων ή εκμεταλλεύσεων που επαναλαμβάνουν τις δραστηριότητές τους με ιχθείς, αυγά ή ώριμα αναπαραγωγικά κύτταρα, από μια εγκεκριμένη ζώνη ή εκμετάλλευση εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης*

Οι νέες εκμεταλλεύσεις και οι εκμεταλλεύσεις που επαναλαμβάνουν τις δραστηριότητές τους με ιχθείς, αυγά ή ώριμα αναπαραγωγικά κύτταρα, από μια εγκεκριμένη ζώνη ή εκμετάλλευση εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης, δύναται να αποκτήσουν το καθεστώς έγκρισης σύμφωνα με τις απαιτήσεις που ορίζονται στην οδηγία 91/67/ΕΟΚ, παράρτημα Γ, μέρος ΙΑ παράγραφος 6α/β ή μέρος ΙΙΑ παράγραφος 3 α/β. Ομοίως, οι σχετικές με τη δειγματοληψία διατάξεις, που ορίζονται στα υποδείγματα Α και Β ανωτέρω, [μέρος ΙΙ.2.1.α) και Ι.2.1.β)], δεν εφαρμόζονται για τις εν λόγω εκμεταλλεύσεις.

3. *Πρόγραμμα επιτήρησης για τη διατήρηση του καθεστώτος έγκρισης όσον αφορά τη VHS ή/και την IHN.*

Για να διατηρηθεί το καθεστώς έγκρισης, όσον αφορά τη VHS ή/και την IHN, μιας ζώνης ή μιας εκμετάλλευσης εντός μη εγκεκριμένης ζώνης, οι επιθεωρήσεις και η δειγματοληψία με σκοπό την εξέταση πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με τον πίνακα 1 Γ. Τα δείγματα πρέπει να επιλέγονται, να υπόκεινται σε προετοιμασία και να εξετάζονται κατά τον τρόπο που ορίζεται στο μέρος ΙΙ.Ι. έως ΙΙV και από τις εργαστηριακές εξετάσεις πρέπει να προκύπτουν αρνητικά αποτελέσματα όσον αφορά τους παθογόνους παράγοντες της VHS ή/και της IHN.

3. *Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων ιχθύων*

Πριν από την αποστολή ή μεταφορά στο εργαστήριο, πρέπει να αφαιρούνται προς εξέταση τμήματα οργάνων των ιχθύων με αποστειρωμένα εργαλεία ανατομής και τοποθετούνται σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν υπόστρωμα μεταφοράς, δηλαδή υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας με 10 % ορό μόσχου και αντιβιοτικά. Συνιστάται, 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 και ακόμη εγκέφαλος ή καρδιά. Σε μερικές περιπτώσεις, θα πρέπει να εξεταστεί υγρό ωοθήκης (βλέπε πίνακα 1 Α έως Γ).

Υγρό ωθήκης ή τμήματα οργάνων από δέκα ιχθείς κατ' ανώτατο όριο (βλέπε πίνακα 1Α έως Γ) μπορούν να συγκεντρωθούν σ' έναν αποστειρωμένο σωλήνα 10 ml, ο οποίος να περιέχει τουλάχιστον 4 ml υποστρώματος μεταφοράς, και να αντιπροσωπεύουν ένα συνολικό δείγμα. Ο ιστός κάθε δείγματος θα πρέπει να ζυγίζει τουλάχιστον 0,5 g.

Οι σωλήνες πρέπει να τοποθετούνται σε μεμονωμένα δοχεία (για παράδειγμα κουτιά με παχύ στρώμα πολυστυρενίου) μαζί με αρκετό πάγο ή «παγοκλώνες», για να εξασφαλίζεται, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς στο εργαστήριο, η ψύξη των δειγμάτων. Θα πρέπει να αποφεύγεται η κατάψυξη των δειγμάτων. Η θερμοκρασία ενός δείγματος, κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του, δεν θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υπερβαίνει τους 10 °C και τα δοχεία της μεταφοράς θα πρέπει ακόμη να περιέχουν πάγο τη στιγμή παραλαβής τους, ή μία ή περισσότερες παγοκλώνες πρέπει να είναι εν μέρει ή πλήρως ψυγμένες.

Η ιολογική εξέταση θα πρέπει να ξεκινήσει το δυνατόν συντομότερα και το αργότερο σε 48 ώρες από τη συλλογή των δειγμάτων. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις <sup>(1)</sup>, η επιδημιολογική εξέταση δύναται να ξεκινήσει το αργότερο σε 72 ώρες από τη στιγμή που το υλικό συλλέχθηκε, υπό τον όρο ότι το προς εξέταση υλικό προστατεύθηκε από υπόστρωμα μεταφοράς και ότι τηρήθηκαν οι προϋποθέσεις σχετικά με τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της μεταφοράς μέρος I.1.3 σημείο 3).

Μπορούν να αποστέλλονται στο εργαστήριο ολόκληροι ιχθείς, εφόσον μπορούν να τηρηθούν οι προϋποθέσεις σχετικά με τη θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της μεταφοράς. Οι ολόκληροι ιχθείς μπορούν να τυλιγούνται σε απορροφητικό χαρτί και θα πρέπει τελικά να αποστέλλονται σε πλαστική σακούλα και στις συνθήκες ψύξης που ορίζονται ανωτέρω. Μπορούν επίσης να αποστέλλονται και ζωντανοί ιχθείς.

Κάθε συσκευασία και σήμανση πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με τις ισχύουσες, εθνικές και διεθνείς, ρυθμίσεις που αφορούν την μεταφορά.

#### 4. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού

Ανάλογα με τη συμφωνία που έχει συναφθεί με το σχετικό διαγνωστικό εργαστήριο, μπορούν να συλλέγονται και άλλοι ιστοί ιχθύων και να προετοιμάζονται για συμπληρωματικές εξετάσεις.

## II. Προετοιμασία των δειγμάτων για ιολογική εξέταση

### 1. Κατάψυξη σε εξαιρετικές περιπτώσεις

Εφόσον εμφανιστούν πρακτικές δυσχέρειες (π.χ. δυσμενείς καιρικές συνθήκες, μη εργάσιμες ημέρες, προβλήματα εργαστηρίου, κ.λπ.), που καθιστούν αδύνατον τον εμβολιασμό των κυττάρων κατά τις 48 ώρες μετά τη συλλογή των δειγμάτων ιστών, επιτρέπεται η κατάψυξη του υπερκείμενου υγρού σε - 20 °C ή κάτω από τη θερμοκρασία αυτή, αλλά θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μια ιολογική εξέταση εντός 14 ημερών. Εντούτοις, οι ιστοί πρέπει να καταψύχονται και να αποψύχονται μόνο μία φορά πριν από την εξέταση. Πρέπει να τηρούνται λεπτομερή στοιχεία για τους λόγους που επέβαλαν την κατάψυξη των δειγμάτων ιστών (όπως, θύελλα, απονέκρωση κυτταρικών σειρών, κ.λπ.).

### 2. Ομογενοποίηση των οργάνων

Στο εργαστήριο θα πρέπει να ομογενοποιούνται πλήρως (με χωνευτήρα, αναμείκτη ή ιγδίο με αποστειρωμένη άμμο) οι ιστοί που βρίσκονται στους σωλήνες και στη συνέχεια να τοποθετούνται σε μορφή εναιωρήματος στο αρχικό υπόστρωμα μεταφοράς.

Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρους ιχθείς μικρότερους από 4 cm, αυτοί πρέπει να τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι ή νυστέρι, μετά από την αφαίρεση του σώματος που βρίσκεται όπισθεν του ανοίγματος των εντοσθίων. Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρους ιχθείς με μήκος σώματος μεταξύ 4 και 6 cm, πρέπει να συλλέγονται τα εντόσθια, συμπεριλαμβανομένου του νεφρού. Εάν το δείγμα αποτελείται από ολόκληρους ιχθείς μήκους άνω των 6 cm, τα δείγματα ιστών πρέπει να συλλέγονται όπως περιγράφεται στο μέρος I.1.3. Τα δείγματα ιστών πρέπει να τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι ή νυστέρι, να ομογενοποιούνται ως ανωτέρω και να τοποθετούνται σε μορφή εναιωρήματος στο υπόστρωμα μεταφοράς.

Η τελική αναλογία του ιστολογικού υλικού και του υποστρώματος μεταφοράς θα πρέπει να προσαρμόζεται στο εργαστήριο σε 1:10.

### 3. Φυγοκέντρηση του πολτού

Ο πολτός φυγοκεντρείται σε καταψυχόμενο φυγόκεντρο στους 2 ° έως 5 °C στα 2 000 – 4 000 X g επί 15 λεπτά και στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό και εκτίθεται σε αντιβιοτικά, είτε επί 4 ώρες σε 15 °C είτε ολόκληρη τη νύχτα σε 4 °C, δηλαδή σ' αυτό το στάδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί γενταμικίνη σε ποσοστό 1 mg/ml.

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

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

Εάν το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε έχει διατηρηθεί σε - 80 °C επί 48 ώρες μετά τη δειγματοληψία, μπορεί να ξαναχρησιμοποιηθεί μία μόνο φορά για ιολογική εξέταση.

<sup>(1)</sup> Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε περίπτωση που οι ιχθείς έχουν συλλεχθεί σε ιδιαίτερα απομακρυσμένες περιοχές στις οποίες δεν υπάρχει δυνατότητα καθημερινής ταχυδρομικής αποστολής.

Εάν εμφανιστούν πρακτικές δυσχέρειες (βλάβη του επωαστή, προβλήματα στις κυτταροκαλλιέργειες, κ.λπ.), οι οποίες εμποδίζουν τον εμβολιασμό των κυττάρων κατά τις 48 ώρες μετά τη συλλογή των δειγμάτων ιστών, επιτρέπεται η κατάψυξη του υπερκείμενου υγρού σε  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , αλλά θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μια ιολογική εξέταση εντός 14 ημερών.

Πριν τον εμβολιασμό των κυττάρων, θα πρέπει να αναμειγνύεται το υπερκείμενο υγρό με ίσα μέρη μιας ομάδας κατάλληλα αραιωμένων αντιορών σε ιθαγενείς ορότυπους του ιού IPN, και να επωάζεται κατ' αυτόν τον τρόπο επί τουλάχιστον μία ώρα σε  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  ή το πολύ επί 18 ώρες σε  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ο τίτλος τον αντιορού θα 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, ο οποίος σε ορισμένες περιοχές 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 θεωρείται δύναμει ενδεικτική για VHSV ή IHNV.

Εφόσον τα δείγματα προέρχονται από μονάδες παραγωγής που θεωρούνται απαλλαγμένες από IPN, μπορεί να παραλειφθεί η επεξεργασία των εμβολίων με αντιορό στον ιό IPN.

### III. Ιολογική εξέταση

#### 1. Κυτταροκαλλιέργειες και υποστρώματα

Θα πρέπει να αναπτύσσονται κύτταρα BF-2 ή RTG-2 και είτε EPC ή FHM, σε  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  με  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  σε κατάλληλο υπόστρωμα, δηλαδή 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, συνιστάται να ρυθμίζεται το υπόστρωμα με διττανθρακικό. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για καλλιέργεια κυττάρων σε ανοιχτές μονάδες πρέπει να ρυθμίζεται με Tris-HCl (23 mM) και διττανθρακικό νάτριο (6 mM). Το pH θα πρέπει να είναι  $7,6 \pm 0,2$ .

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

#### 2. Εμβολιασμός των κυτταροκαλλιεριγιών

Θα πρέπει να εμβολιάζεται εναιώρημα οργάνων επεξεργασμένο με αντιβιοτικά μέσα σε κυτταροκαλλιέργεια σε δύο διαλύματα: το πρώτο και, επιπρόσθετα, μια αραιώση 1:10 αυτού, το οποίο να δίνει αντίστοιχα τελικά διαλύματα του ιστολογικού υλικού σε υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας σε 1:100 και 1: 1 000 (κατά τρόπο ώστε να αποφεύγονται ομόλογες αλληλεπιδράσεις). Πρέπει να εμβολιάζονται τουλάχιστον δύο σειρές κυττάρων (βλέπε μέρος III.1). Η αναλογία μεγέθους εμβολίου και όγκου υποστρώματος κυτταροκαλλιέργειας θα πρέπει να είναι περίπου 1:10.

Για κάθε διάλυμα και για κάθε σειρά κυττάρων, θα πρέπει να χρησιμοποιείται ελάχιστη κυτταρική επιφάνεια περίπου  $2\text{ cm}^2$ , η οποία αντιστοιχεί σε μια κοιλότητα δίσκου κυτταροκαλλιέργειας των 24 κοιλότητων. Συνιστάται η χρησιμοποίηση δίσκου κυτταροκαλλιέργειας, αλλά είναι εξίσου αποδεκτές και άλλες μονάδες με παρόμοια ή μεγαλύτερη επιφάνεια ανάπτυξης.

#### 3. Επώαση των κυτταροκαλλιεριγιών

Οι εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες θα πρέπει να επωάζονται στους  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  επί επτά μέχρι δέκα ημέρες. Εάν το χρώμα του υποστρώματος της κυτταροκαλλιέργειας αλλάξει από κόκκινο σε κίτρινο, υποδηλώνοντας οξίνιση του υποστρώματος, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί προσαρμογή του PH με αποστειρωμένο διάλυμα διττανθρακικού ή ισοδύναμες ουσίες, προκειμένου να εξασφαλιστεί η επιδεκτικότητα των κυττάρων στη μόλυνση από τον ιό.

Τουλάχιστον κάθε έξι μήνες ή εφόσον υπάρχει υποψία μειωμένης επιδεκτικότητας των κυττάρων, θα πρέπει να πραγματοποιείται τιτλοδότηση των κατεψυγμένων αποθεμάτων των ιών VHSV και IHNV για να επαληθευτεί η επιδεκτικότητα των κυτταροκαλλιεριγιών στη μόλυνση. Στο μέρος IV παρατίθεται η προτεινόμενη διαδικασία.

#### 4. Μικροσκοπηση

Οι εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες θα πρέπει να επιθεωρούνται τακτικά (τουλάχιστον τρεις φορές την εβδομάδα) ως προς την εμφάνιση ΚΦΠ σε μεγένδυση 40 έως 150. Εάν παρατηρηθεί εμφανές ΚΠΦ, θα πρέπει να αρχίσουν αμέσως οι διαδικασίες ταυτοποίησης του ιού με το μέρος I.IV.

#### 5. Επιμέρους καλλιέργεια

Εάν δεν έχει αναπτυχθεί ΚΠΦ μετά από την αρχική επώαση επί επτά μέχρι δέκα ημέρες, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί μια επιμέρους καλλιέργεια σε πρόσφατες κυτταροκαλλιέργειες με τη χρησιμοποίηση κυτταρικής επιφάνειας, παρόμοιας με αυτή της αρχικής καλλιέργειας.

Επί επτά μέχρι δέκα ημέρες από την επώαση θα πρέπει να συγκεντρώνονται, σύμφωνα με τη σειρά των κυττάρων, υποπολλαπλάσια του υποστρώματος (υπερκείμενο υγρό) από όλες τις καλλιέργειες/κοιλότητες που συνιστούν την αρχική καλλιέργεια. Στη συνέχεια, οι ομάδες εμβολιάζονται σε ομόλογες κυτταροκαλλιέργειες μη διαλυμένες και διαλυμένες σε αναλογία 1:10 (δίνοντας αντίστοιχα τελικά διαλύματα του υπερκείμενου υγρού σε 1:10 και 1:100), όπως περιγράφεται στο μέρος I.III.2. Εναλλακτικά, υποπολλαπλάσια του 10 % του υποστρώματος, που αποτελούν την αρχική καλλιέργεια, εμβολιάζονται άμεσα σε μια κοιλότητα με νωπή κυτταροκαλλιέργεια. Τον εμβολιασμό μπορεί να προηγηθεί προεπώαση των διαλυμάτων με αντιορό στον ιό IPN σε κατάλληλη αραιώση, όπως περιγράφεται στο μέρος I.II.3.

Στη συνέχεια, οι εμβολιασμένες καλλιέργειες θα πρέπει να επωάζονται επί επτά μέχρι δέκα ημέρες σε 15 °C, λαμβανομένων υπόψη των διατάξεων του μέρους Ι.ΠΙ.4.

Εάν παρατηρηθεί τοξική ΚΠΦ κατά τις τρεις πρώτες ημέρες μετά την επώαση, μπορεί να πραγματοποιηθεί σ' αυτό το στάδιο μια επιμέρους καλλιέργεια αλλά σ' αυτή την περίπτωση τα κύτταρα θα πρέπει να έχουν επωασθεί επί επτά ημέρες και να έχουν υποβληθεί σε νέα επιμέρους καλλιέργεια, ακολουθούμενη από άλλες επτά ημέρες επώασης. Εάν παρατηρηθεί ΚΠΦ μετά από τρεις ημέρες, τα κύτταρα μπορούν να γίνουν δεκτά και να επωαστούν, προκειμένου να συμπληρώσουν συνολικά δεκατέσσερις ημέρες από τον αρχικό εμβολιασμό. Δεν θα πρέπει να παρατηρηθούν σ' αυτά σημεία τοξικότητας κατά τη διάρκεια των επτά τελευταίων ημερών επώασης.

Εάν, παρά την αγωγή με αντιβιοτικά, παρουσιαστεί βακτηριακή μόλυνση, πρέπει να προηγηθεί της επιμέρους καλλιέργειας φυγοκέντρηση σε 2 000 έως 4 000 x g για 15 έως 30 λεπτά σε 2 έως 5 °C ή/και διήθηση του υπερκείμενου υγρού μέσω φίλτρου 0,45 μm (χαμηλή πρωτεϊνική σταθεροποίηση της μεμβράνης). Εκτός τούτου, οι διαδικασίες για τις επιμέρους καλλιέργειες είναι οι ίδιες με εκείνες για την τοξική ΚΠΦ.

#### IV. Προσδιορισμός της ταυτότητας του ιού

##### 1. Δοκιμές για τον προσδιορισμό της ταυτότητας του ιού

Εάν παρατηρηθεί ΚΠΦ σε μια κυτταροκαλλιέργεια, το υπόστρωμα (υπερκείμενο υγρό) συλλέγεται και εξετάζεται σύμφωνα με μια ή περισσότερες από τις ακόλουθες τεχνικές: εξουδετέρωση, IF, Elisa. Εφόσον οι δοκιμές αυτές δεν επιτρέψουν τον οριστικό προσδιορισμό της ταυτότητας του ιού εντός μιας εβδομάδας, το υπερκείμενο υγρό θα πρέπει να μεταφερθεί σε ένα εθνικό εργαστήριο αναφοράς ή στο εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ για ασθένειες ιχθύων, προκειμένου να προσδιοριστεί αμέσως η ταυτότητά του.

##### 2. Εξουδετέρωση

Θα πρέπει να απομακρυνθούν τα κύτταρα από το υπερκείμενο υγρό με φυγοκέντρηση (2 000 έως 4 000 X g) ή με διήθηση μέσω μεμβράνης (0,45 μm) με χαμηλή πρωτεϊνική σταθεροποίηση της μεμβράνης και στη συνέχεια να αραιωθεί το υπερκείμενο υγρό σε αναλογίες 1:100 και 1:10 000 μέσα σε ένα υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας.

Στη συνέχεια, θα πρέπει να αναμειχθούν τα υποπολλαπλάσια δύο διαλυμάτων υπερκείμενου υγρού και να επωασθούν ξεχωριστά επί 60 λεπτά σε 15 °C μαζί με ίσα μέρη των ακόλουθων αντιδραστηρίων:

- ορός που περιέχει ομάδα ειδικού αντισώματος κατά VHSV σε διάλυμα 1:50 (vol:vol) <sup>(1)</sup>,
- ορός που περιέχει ομάδα ειδικού αντισώματος κατά IHNV σε διάλυμα 1:50 (vol:vol) <sup>(1)</sup>,
- ομάδα αντιορών κατά των ενδογενών οροτύπων IPNV σε διάλυμα 1:50 (vol:vol) <sup>(1)</sup>,
- υπόστρωμα (θετικός έλεγχος).

Τουλάχιστον δύο κυτταροκαλλιέργειες θα πρέπει να εμβολιάζονται με 50 μl καθεμία από κάθε μείγμα ιού-ορού υπερκείμενου υγρού και μετά να επωάζονται σε 15 °C. Θα πρέπει να ελέγχεται η ανάπτυξη του ΚΠΦ, όπως περιγράφεται στο μέρος Ι.ΠΙ.4.

Ορισμένα στελέχη VHSV δεν αντιδρούν στις δοκιμές εξουδετέρωσης. Ο, μεμονωμένες αυτές ομάδες πρέπει να εντοπίζονται με ανοσοφθορισμό (IF) ή με δοκιμή Elisa.

Μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες δοκιμές εξουδετέρωσης, αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας.

##### 3. Δοκιμή IF

Για κάθε απομόνωση ιού που θα πρέπει να εντοπιστεί η ταυτότητά του, θα πρέπει να επικαλύπτονται τουλάχιστον οκτώ γυάλινα τριβλία ή ισοδυνάμια τους με κύτταρα σε πυκνότητα που αποβαίνει σε συρροή περίπου 60 μέχρι 90 % μετά από 24 ώρες καλλιέργειας. Για το σκοπό αυτό, συνιστώνται τα κύτταρα EPC, λόγω της ισχυρής προσκόλλησής τους σε γυάλινες επιφάνειες, δύναται όμως να χρησιμοποιηθούν και άλλες κυτταροσειρές όπως BF-2, RTG-2 ή FHM.

Όταν τα κύτταρα έχουν κατακαθίσει επάνω στη γυάλινη επιφάνεια (περίπου μία ώρα μετά την επικάλυψη), ή όταν οι καλλιέργειες έχουν επωασθεί επί 24 ώρες το μέγιστο, θα πρέπει να εμβολιάζεται ο ιός του οποίου πρέπει να εντοπιστεί η ταυτότητά του. Θα πρέπει να εμβολιάζονται τέσσερις καλλιέργειες σε αναλογία 1:10 κατ' όγκο, καθώς και τέσσερις καλλιέργειες σε αναλογία 1:100 και στη συνέχεια επωάζονται σε 15 °C επί 20 έως 30 ώρες.

Μετά την επώαση, οι καλλιέργειες θα πρέπει να εκπλύνονται δύο φορές εντός Eagle's MEM χωρίς ορό, να σταθεροποιούνται σε παγωμένη ακετόνη 80 % και στη συνέχεια να χρωνούνται με IF διπλής στοιβάδας. Η πρώτη στοιβάδα αντιδραστηρίων αποτελείται από πολύ— ή μονόκλωνα αντισώματα ποιότητας αναφοράς. Η δεύτερη είναι αντιορός, συζευγμένος με φθοροχρώμα, κατά της ανοσογλοβουλίνης που χρησιμοποιείται στην πρώτη στοιβάδα. Θα πρέπει να χρωνούνται τουλάχιστον μία εμβολιασμένη καλλιέργεια υψηλής δόσης και μία χαμηλής δόσης, για καθέναν από τους δοκιμαζόμενους αντιορούς. Στη δοκιμή θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται κατάλληλοι αρνητικοί και θετικοί έλεγχοι. Συνιστώνται φθοροχρώμα όπως το FITC ή το TRITC.

Οι χρωσμένες καλλιέργειες στερεώνονται με τη χρησιμοποίηση διαλύματος αλατούχου γλυκερίνης. Θα πρέπει επίσης να εξετάζονται υπό προσπίπτον υπεριώδες φως. Χρησιμοποιούνται σ' αυτή την περίπτωση 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.

Η τεχνική IF που περιγράφεται ανωτέρω αναφέρεται ως παράδειγμα. Μπορούν να εφαρμόζονται και άλλες τεχνικές IF (όσον αφορά τις κυτταροκαλλιέργειες, η σταθεροποίηση και τα αντισώματα ποιότητας αναφοράς), αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας.

<sup>(1)</sup> Η όπως ορίζεται από το εργαστήριο αναφοράς όσον αφορά την πιθανή κυτταροτοξικότητα των αντιορών.

## 4. Δοκιμή Elisa

Θα πρέπει να επικαλύπτονται κοιλότητες σε τριβλία μικροτιτλοδότησης κατά τη διάρκεια μιας νύχτας με συνιστώμενες αραιώσεις κλασμάτων καθαρισμένης ανοσογλοβουλίνης των αντιορών ποιότητας αναφοράς.

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 σε 37 °C. Μετά την έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS-Tween-20, προστίθενται βιοτινυλιωμένα αντισώματα εξειδίκευσης αντιστοιχείσης σ' αυτή των επικαλυπτόντων αντισωμάτων και αφήνονται να αντιδράσουν επί 60 λεπτά σε 20 °C. Ακολουθεί και νέα έκπλυση ως ανωτέρω, προστίθεται στρεπτοβιδίνη συζευγμένη με HRP και αφήνεται να αντιδράσει επί μία ώρα σε 20 °C. Μετά από μια τελευταία έκπλυση, το συνδεδεμένο ένζυμο γίνεται ορατό με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων υποστρωμάτων Elisa (OPD και λοιπών).

Η ανωτέρω, βασιζόμενη σε βιοτινή-οβιδίνη, εκδοχή Elisa δίνεται ως παράδειγμα. Μπορούν να χρησιμοποιούνται και άλλες εκδοχές Elisa αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 1Α

**Πρόγραμμα επιθεώρησης και δειγματοληψίας για περιοχές και εκμεταλλεύσεις εντός μη εγκεκριμένων ζωνών για τη διετή περίοδο ελέγχου πριν από την επίτευξη του καθεστώτος έγκρισης για τη VHS ή/και την IHN**

(σύμφωνα με την οδηγία 91/67/ΕΟΚ, παραρτήματα Β και Γ, καθώς και τις διατάξεις που καθορίζονται στο μέρος Ι του παρόντος παραρτήματος)

|  | Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων κατ' έτος (δύο έτη) | Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων κατ' έτος (δύο έτη) | Εργαστηριακή εξέταση για την ανίχνευση του ιού <sup>(1)</sup>     |  |
|--|---|---|---|--|
|  |   |   | Αριθμός εκτρεφόμενων ιχθύων (υλικό οργάνων)                       | Αριθμός γόνων (υγρό ωθήκης)                                    |
| Ηπειρωτικές ζώνες και εκμεταλλεύσεις       |   |   |   |  |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο                  | 2   | 2   | 120 (πρώτη επιθεώρηση) <sup>(2)</sup><br>150 (δεύτερη επιθεώρηση) | 30 (πρώτη επιθεώρηση) <sup>(3)</sup><br>0 (δεύτερη επιθεώρηση) |
| β) Εκμεταλλεύσεις μόνο με γόνο             | 2   | 1   | 0   | 150 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση) <sup>(3)</sup>                |
| γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο               | 2   | 2   | 150 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)                                | 0  |
| Παράκτιες ζώνες και εκμεταλλεύσεις         |   |   |   |  |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο                  | 2   | 2   | 120 (πρώτη επιθεώρηση)<br>150 (δεύτερη επιθεώρηση)                | 30 (πρώτη επιθεώρηση) <sup>(3)</sup><br>0 (δεύτερη επιθεώρηση) |
| β) Εκμεταλλεύσεις σαλμονιδών χωρίς γόνο    | 2   | 2   | 30 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση) <sup>(4)</sup>                  | 0  |
| γ) Εκμεταλλεύσεις μη σαλμονιδών χωρίς γόνο | 2   | 2   | 150 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)                                | 0  |

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ομάδα: 10

<sup>(1)</sup> Εναλλακτικά, δύναται να χρησιμοποιηθεί μειωμένο μέγεθος δείγματος, όπως αναφέρεται στον πίνακα 1Β, εφόσον πληρούνται οι απαιτήσεις που περιγράφονται στα μέρη I.1.1, I.1.2.1.β) και III.

<sup>(2)</sup> Κλινικές επιθεωρήσεις.

<sup>(3)</sup> Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, εάν είναι αδύνατη η συλλογή υγρού ωθήκης, η δειγματοληψία μπορεί να αφορά τα όργανα.

<sup>(4)</sup> Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται τουλάχιστον τρεις εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε αλμυρό νερό.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 1B

**Πρόγραμμα επιθεώρησης και δειγματοληψίας για τη διετή περίοδο ελέγχου πριν από την επίτευξη του καθεστώτος έγκρισης για τη VHS ή/και την ΙΗΝ σε ζώνες και εκμεταλλεύσεις εντός μη εγκεκριμένων ζωνών με επίσημα αναγνωρισμένο και τεκμηριωμένο ιστορικό απαλλαγής από τις εν λόγω ασθένειες**

(σύμφωνα με την οδηγία 91/67/ΕΟΚ, παραρτήματα Β και Γ και τις διατάξεις που καθορίζονται στα μέρη Ι και ΙΙΙ του παρόντος παραρτήματος)

|  | Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ετησίως (δύο έτη) | Αριθμός εργαστηριακών εξετάσεων ετησίως (δύο έτη) | Εργαστηριακή εξέταση για την ανίχνευση του ιού                 |  |
|--|---|---|--|--|
|  |   |   | Αριθμός εκτρεφόμενων ιχθύων (υλικό οργάνων)                    | Αριθμός γόνων (υγρό ωοθήκης)                                   |
| Ηπειρωτικές ζώνες και εκμεταλλεύσεις       |   |   |  |  |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο                  | 2   | 2   | 0 (πρώτη επιθεώρηση) <sup>(1)</sup><br>30 (δεύτερη επιθεώρηση) | 30 (πρώτη επιθεώρηση) <sup>(2)</sup><br>0 (δεύτερη επιθεώρηση) |
| β) Εκμεταλλεύσεις μόνο με γόνο             | 2   | 1   | 0  | 30 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση) <sup>(2)</sup>                 |
| γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο               | 2   | 2   | 30 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)                              | 0  |
| Παράκτιες ζώνες και εκμεταλλεύσεις         |   |   |  |  |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο                  | 2   | 2   | 0 (πρώτη επιθεώρηση)<br>30 (δεύτερη επιθεώρηση)                | 30 (πρώτη επιθεώρηση) <sup>(2)</sup><br>0 (δεύτερη επιθεώρηση) |
| β) Εκμεταλλεύσεις σαλμονιδών χωρίς γόνο    | 2   | 2   | 30 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση) <sup>(3)</sup>               | 0  |
| γ) Εκμεταλλεύσεις μη σαλμονιδών χωρίς γόνο |   | 2   | 30 (πρώτη και δεύτερη επιθεώρηση)                              | 0  |

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ομάδα: 10

<sup>(1)</sup> Κλινικές επιθεωρήσεις.

<sup>(2)</sup> Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, εάν είναι αδύνατη η συλλογή υγρού ωοθήκης, η δειγματοληψία μπορεί να αφορά τα όργανα.

<sup>(3)</sup> Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται τουλάχιστον τρεις εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε αλμυρό νερό.

## ΠΙΝΑΚΑΣ 1Γ

**Πρόγραμμα επιθεώρησης και δειγματοληψίας για περιοχές και εκμεταλλεύσεις εντός μη εγκεκριμένων ζωνών, με σκοπό την επίτευξη του καθεστώτος έγκρισης σχετικά με τη VHS ή/και την ΙΗΝ**

(σύμφωνα με την οδηγία 91/67/ΕΟΚ, παραρτήματα Β και Γ, καθώς και τις διατάξεις του μέρους Ι του παρόντος παραρτήματος)

|                                      | Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων ετησίως | Αριθμός ιχθύων στην ομάδα δειγμάτων για εργαστηριακή εξέταση <sup>(1)</sup> |  |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
|                                      |                                       | Αριθμός εκτρεφόμενων ιχθύων (υλικό οργάνων)                                 | Αριθμός γόνων (υγρό ωοθήκης)                   |
| Ηπειρωτικές ζώνες και εκμεταλλεύσεις |                                       |   |  |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο            | 2                                     | 20 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση)   | 10 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση) <sup>(2)</sup> |

|                                    | Αριθμός κλινικών επιθεωρήσεων<br>ετησίως | Αριθμός ιχθύων στην ομάδα δειγμάτων για εργαστηριακή εξέταση (1) |                                     |
|------------------------------------|--|--|-------------------------------------|
|                                    |  | Αριθμός εκτρεφόμενων ιχθύων<br>(υλικό οργάνων)                   | Αριθμός γόνων<br>(υγρό ωοθήκης)     |
| β) Εκμεταλλεύσεις μόνο με γόνο     | 2  | 0  | 30 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση) (2) |
| γ) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο       | 1  | 30   | 0                                   |
| Παράκτιες ζώνες και εκμεταλλεύσεις |  |  |                                     |
| α) Εκμεταλλεύσεις με γόνο          | 2  | 20 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση)                                  | 10 (πρώτη ή δεύτερη επιθεώρηση) (2) |
| β) Εκμεταλλεύσεις χωρίς γόνο       | 1  | 30 (3)   | 0                                   |

Μέγιστος αριθμός ιχθύων ανά ομάδα: 10

(1) Στις εγκεκριμένες ζώνες, τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται με εναλλαγή μόνο στο 50 % των ιχθυοτροφείων κάθε έτος. Στις εγκεκριμένες εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται εντός μη εγκεκριμένων ζωνών, τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται κάθε έτος.

(2) Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, εάν είναι αδύνατη η συλλογή υγρού ωοθήκης, η δειγματοληψία μπορεί να αφορά τα όργανα.

(3) Τα δείγματα θα πρέπει να συλλέγονται τουλάχιστον τρεις εβδομάδες μετά τη μεταφορά των ιχθύων από γλυκό σε αλμυρό νερό.

## ΜΕΡΟΣ II

### Διαγνωστικές μέθοδοι για την επιβεβαίωση VHS και IHN σε περιπτώσεις υποψίας επιδημίας

Για τη διάγνωση της VHS και της IHN πρέπει να εφαρμόζονται μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες τεχνικές:

- Α. Συμβατική απομόνωση του ιού, ακολουθούμενη από ορολογική ταυτοποίηση του ιού.
- Β. Απομόνωση του ιού με ταυτόχρονη ορολογική ταυτοποίηση του ιού.
- Γ. Λοιπές τεχνικές διάγνωσης (IF, Elisa).

Η επιβεβαίωση τον πρώτου κρούσματος της VHS ή/και της IHN σε εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται σε εγκεκριμένες ζώνες δεν θα πρέπει να βασίζεται στη μέθοδο Γ. Πρέπει να εφαρμόζεται 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, ενόψει βακτηριολογικής, παρασιτολογικής, ιστολογικής ή άλλης εξέτασης, προκειμένου να δοθεί η δυνατότητα για μια διαφοροποιημένη διάγνωση.

#### A. Συμβατική απομόνωση του ιού, ακολουθούμενη από ορολογική ταυτοποίηση του ιού

##### I.1. Επιλογή των δειγμάτων

Πρέπει να επιλέγονται προς εξέταση τουλάχιστον δέκα ιχθείς που εμφανίζουν τυπικά συμπτώματα IHN ή VHS.

##### I.2. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων των ιχθύων

Όπως ορίζεται στο μέρος I.1.3.

##### I.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού

Όπως ορίζεται στο μέρος I.1.4.

##### II. Προετοιμασία των δειγμάτων για ιολογική εξέταση

Όπως ορίζεται στο μέρος I.II.

##### III. Ιολογική εξέταση

Όπως ορίζεται στο μέρος I.III.

##### IV. Προσδιορισμός της ταυτότητας του ιού

Όπως ορίζεται στο μέρος I.IV.

#### B. Απομόνωση του ιού με συνοδύουσα ορολογική απομόνωση του ιού

##### I.1. Επιλογή των δειγμάτων

Όπως ορίζεται στο μέρος II.A.I.1.

##### I.2. Προετοιμασία και αποστολή των δειγμάτων των ιχθύων

Όπως ορίζεται στο μέρος I.I.3.

### I.3. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού

Όπως ορίζεται στο μέρος I.I.4.

### II.1. Ομογενοποίηση των οργάνων

Όπως ορίζεται στο μέρος I.II.2.

### II.2. Φυγοκέντρηση του πολτού

Ο πολτός φυγοκεντρείται σε καταψυχόμενο φυγόκεντρο στους 2 έως 5 °C στα 2 000 έως 4 000 x g επί 15 λεπτά και στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο υγρό και εκτίθεται επί τέσσερις ώρες σε 15 °C σε αντιβιοτικά, π.χ. γενταμικίνη σε ποσοστό 1 mg/ml, ή υφίσταται διήθηση μέσω μεμβρανικών φίλτρων (0,45 µm) με χαμηλή πρωτεϊνική σταθεροποίηση της μεμβράνης.

### II.3. Επεξεργασία του υπερκείμενου υγρού με διαγνωστικούς αντιορούς

Το επεξεργασμένο με αντιβιοτικά ή διηθημένο με μεμβρανικά φίλτρα ελαιώδη οργάνου αραιούται σε αναλογία 1:10 και 1: 1 000 σε υπόστρωμα κυτταροκαλλιέργειας και υποπολλαπλάσια αναμειγνύονται και επωάζονται επί 60 λεπτά σε 15 °C με ίσα μέρη των αντιδραστηρίων που απαριθμούνται στο μέρος I.IV.2.

### III.1. Κυτταροκαλλιέργειες και υποστρώματα

Όπως ορίζεται στο μέρος I.III.1.

### III.2. Εμβολιασμός των κυτταροκαλλιεργειών

Εμβολιάζονται τουλάχιστον δύο κυτταροκαλλιέργειες ανά κυτταρική σειρά με 50 µl η καθεμία από κάθε μείγμα ορού-ιού (παρασκευασμένο όπως ορίζεται στο μέρος II.B.II.3.).

### III.3. Επώαση κυτταροκαλλιεργειών

Όπως ορίζεται στο μέρος I.III.3.

### III.4. Μικροσκόπηση

Θα πρέπει να επιθεωρούνται καθημερινά οι εμβολιασμένες κυτταροκαλλιέργειες ως προς την εμφάνιση ΚΠΦ σε μεγέθυνση επί 40-150. Εάν η εμφάνιση ΚΠΦ αποτρέπεται με έναν από τους χρησιμοποιούμενους αντιορούς, μπορεί να θεωρηθεί κατά συνέπεια ότι ο ιός έχει ταυτοποιηθεί.

Σε περίπτωση που η εμφάνιση ΚΠΦ δεν αποτρέπεται από κάποιον από τους αντιορούς, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν οι διαδικασίες ταυτοποίησης του ιού, σύμφωνα με το μέρος I.IV.

### III.5. Επιμέρους καλλιέργεια

Εάν το ΚΠΦ δεν έχει εμφανιστεί καθόλου μετά από επτά έως δέκα ημέρες, θα πρέπει να πραγματοποιηθεί επιμέρους καλλιέργεια από καλλιέργειες εμβολιασμένες με υπερκείμενο υγρό συν το υπόστρωμα (μέρος II.B.II.3.), σύμφωνα με το μέρος I.III.5.

## Γ. Λοιπές διαγνωστικές τεχνικές

Υπερκείμενο υγρό, παρασκευασμένο όπως περιγράφεται στο μέρος I.II.2, μπορεί να υποβληθεί σε IF ή Elisa, σύμφωνα με το μέρος I.IV.3 ή το μέρος I.IV.4, αντίστοιχα. Οι ταχείες αυτές τεχνικές θα πρέπει να συμπληρώνονται με μία ιολογική εξέταση, σύμφωνα με το σημείο A ή B εντός 48 ωρών μετά τη δειγματοληψία, εάν:

- α) το αποτέλεσμα είναι αρνητικό, ή
- β) προκύψει θετικό αποτέλεσμα με δείγματα που αντιπροσωπεύουν την πρώτη περίπτωση IHN ή VHS σε μια εγκεκριμένη ζώνη.

Το ιστολογικό υλικό μπορεί να υποβληθεί και σε άλλες διαγνωστικές τεχνικές, όπως στην IF επί κατεψυγμένων στοιχείων ή την ανοσοϊστοχημία επί ιστολογικού υλικού, σταθεροποιημένου με φορμαλίνη. Οι τεχνικές αυτές θα πρέπει πάντα να αννοδεύονται από ένα εμβολιασμό μη σταθεροποιημένο σε κυτταροκαλλιέργειες ιστολογικού υλικού.

## ΜΕΡΟΣ III

### Τεκμηριωμένο ιστορικό απαλλαγής από τη VHS ή/και την IHN σε ζώνες ή εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται εντός μη εγκεκριμένων ζωνών

#### Γενικές κατευθύνσεις και κριτήρια για ένα πρόγραμμα επίσημων υγειονομικών επιθεωρήσεων

1. Ένα πρόγραμμα υγειονομικής επιθεώρησης μπορεί να εφαρμοστεί μόνο:
  - μετά από την εφαρμογή ενός επίσημου αναγνωρισμένου προγράμματος εξάλειψης VHSV ή/και IHNV, συμπεριλαμβανομένης της απομάκρυνσης όλων των ιχθύων από την εγκατάσταση, τον καθαρισμό, την απολύμανση και εγκατάλειψη της εκτροφής πριν από την ανανέωση του αποθέματος με ιχθείς από εγκεκριμένες εκμεταλλεύσεις, είτε
  - σε ιχθυοτροφεία χωρίς ιστορικό μόλυνσης από VHSV ή IHNV.
2. Το πρόγραμμα υγειονομικής επιθεώρησης πρέπει να βασίζεται τόσο σε κλινικές επιθεωρήσεις όσο και σε εργαστηριακές εξετάσεις.
3. Το πρόγραμμα πρέπει να περιλαμβάνει δύο ετήσιες κλινικές υγειονομικές επιθεωρήσεις, σύμφωνα με τις γενικές κατευθύνσεις που παρέχονται στο μέρος I.

4. Σε μία τουλάχιστον από τις επιθεωρήσεις που διενεργούνται κάθε έτος, πρέπει να συλλέγονται από κάθε εκμετάλλευση 30 δείγματα ιστών ιχθύων ή/και υγρού ωσθήκης. Τα δείγματα συλλέγονται, υφίστανται προετοιμασία και υπόκεινται σε εργαστηριακή εξέταση σύμφωνα με τα προβλεπόμενα στο μέρος I.Π και το μέρος IV.
5. Το πρόγραμμα υγειονομικής επιθεώρησης εφαρμόζεται για περίοδο τουλάχιστον τεσσάρων ετών, σε όλες τις εκμεταλλεύσεις της ζώνης, ή στην εκμετάλλευση (εντός μιας μη εγκεκριμένης ζώνης) που πρόκειται να εγκριθούν.
6. Για να μπορεί να αναγνωριστεί επίσημα το πρόγραμμα, δεν πρέπει να εμφανιστούν ή να ανιχνευτούν κρούσματα της VHS ή της IHN (ούτε κλινική μόλυνση ούτε απομόνωση ιού).

#### ΜΕΡΟΣ IV

##### Διαδικασία τιτλοδότησης για την επαλήθευση της επιδεκτικότητας των κυτταροκαλλιέργειών στη μόλυνση

Κατωτέρω παρατίθενται οι συνιστώμενες διαδικασίες τιτλοδότησης που αναφέρονται στο μέρος I.III.3.

Πρέπει να χρησιμοποιούνται τουλάχιστον δύο απομονωμένες ομάδες VHSV και IHNV. Οι απομονωμένες ομάδες πρέπει να αντιπροσωπεύουν τη σημαντικότερη ομάδα ιών στην ΕΕ, π.χ. για τη VHSV μια παθογενής μεμονωμένη ομάδα από ιριδοειδή πέστροφα γλυκών υδάτων και μια θαλάσσια παθογενής μεμονωμένη ομάδα για το καλκάνι, και για την IHNV ένα παθογενές στέλεχος ιριδοειδούς πέστροφας από την Ευρώπη. Πρέπει να χρησιμοποιούνται επαρκώς καθορισμένες ομάδες από τα κράτη μέλη. Μεμονωμένες ομάδες αναφοράς διατίθενται από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς για τις ασθένειες των ιχθύων.

Ιοί από ασυνεχείς καλλιέργειες με χαμηλό αριθμό κυτταροκαλλιέργειών πολλαπλασιάζονται μέσα σε φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, σε κύτταρα BF-2 ή RTG-2, προκειμένου για τον ιό VHSV, και EPC ή FHM, προκειμένου για ιό IHNV. Πρέπει να χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας με ρυθμιστικό διάλυμα περιεκτικότητας σε ορό τουλάχιστον 10 %. Για τον ενοφθαλμισμό πρέπει να χρησιμοποιείται χαμηλή τιμή MOI (<1).

Όταν επιτευχθεί το συνολικό CPE, ο ιός συλλέγεται με φυγοκέντρηση του υπερκείμενου υγρού της κυτταροκαλλιέργειας στις 2 000 x g για δεκαπέντε λεπτά, αποστειρώνεται με διήθηση μέσω διηθητικής μεμβράνης των 0,45 μm και καταψύεται σε κρυοσωλήνες με την κατάλληλη ετικέτα. Ο ιός φυλάσσεται σε θερμοκρασία - 80 °C.

Μία εβδομάδα μετά την κατάψυξη, τρία φιαλίδια για κάθε ιό υποβάλλονται σε τήξη με κρύο νερό και τιτλοδότηση έναντι των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών. Τουλάχιστον κάθε εξάμηνο, ή εάν υπάρχουν υπόνοιες μείωσης της ευαισθησίας των κυτταρικών σειρών, για κάθε απομόνωση ιού πραγματοποιείται τήξη και τιτλοδότηση.

Οι διαδικασίες τιτλοδότησης πρέπει να περιγράφονται λεπτομερώς και κάθε φορά πρέπει να ακολουθείται η ίδια διαδικασία.

Η τιτλοδότηση με αραιώση μέχρι τελικού σημείου θα πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον έξι δείγματα σε κάθε στάδιο της αραιώσης. Εάν ο τίτλος οποιασδήποτε από τις τρεις απομονώσεις ιού μειωθεί, σε σχέση με τον αρχικό τίτλο, με συντελεστή 2 log<sub>s</sub> ή περισσότερο, τότε η κυτταρική σειρά δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πλέον για επιθεώρηση.

Εάν στο εργαστήριο διατηρούνται διαφορετικές κυτταρικές σειρές, πρέπει να εξετάζονται καθεμία χωριστά.

Τα σχετικά στοιχεία πρέπει να φυλάσσονται τουλάχιστον επί δέκα έτη.

#### ΜΕΡΟΣ V

##### Ακρωνύμια και συντομογραφίες

|        |   |
|--------|---|
| BF-2   | Ινοβλάστης του bluegill (σειρά κυττάρων)              |
| ECP    | Κυτταροπαθογενές φαινόμενο                            |
| CRL    | Κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς για ασθένειες ιχθύων    |
| ELISA  | Ανοσοενζυματική μέθοδος                               |
| EPC    | Epithelioma papulosum cyprini (σειρά κυττάρων)        |
| FHM    | Fathead minnow (σειρά κυττάρων)                       |
| FITC   | Ισοθειοκυανίνη φθορισκίνης                            |
| Hepes  | N-2-hydroxyethylpiperazine-Ná-2-αιθανο-σουλφονικό οξύ |
| HRP    | Υπεροξειδάση από ραφανίδα                             |
| IF     | Ανοσοφθορισμός  |
| IFAT   | Ανοσοφθορισμός των τίτλων αντισωμάτων                 |
| IHN(v) | Λοιμώδης αιματοποιητική νέκρωση (ιός)                 |
| PIN(v) | Λοιμώδης παγκρεατική νέκρωση (ιός)                    |
| MEM    | Ελάχιστο βασικό υπόστρωμα                             |

---

|          |   |
|----------|---|
| MOI      | Πολλαπλότητα των λοιμώξεων (αναλογία του αριθμού των λοιμωδών σωματιδίων του ιού που προστίθενται σε δεδομένο αριθμό κυττάρων σε μια καλλιέργεια) |
| OPD      | Ορθοφενολίνη διαμίνη  |
| PBS      | Διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφάτο   |
| RTG-2    | Γεννητικός αδένας της ιριδιειδούς πέστροφας (σειρά κυττάρων)  |
| RT-PCR   | Ανάστροφη μεταγραφάση — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης   |
| Tris-HCl | Tris (hydroxymethyl) aminomethane — HCl   |
| TRIT     | Ισοθειοκυανικό ροδαμινό τετραμεθύλιο  |
| VHS(v)   | Λοιμώδης αιμορραγική νέκρωση (ιός)  |

---