

## ΕΠΙΤΡΟΠΗ

## ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της 13ης Ιουνίου 2003

για τη θέσπιση κριτηρίων για τον καθορισμό ζωνών και την εντεταλμένη επιτήρηση μετά από υπόνοιες για την ύπαρξη ή επιβεβαίωση της ύπαρξης λοιμώδους αναίμιας του σολομού (ΛΑΣ)

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2003) 1831]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2003/466/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 τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 806/2003<sup>(2)</sup>, και ιδίως το άρθρο 15,

την οδηγία 93/53/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 24ης Ιουνίου 1993, σχετικά με τη θέσπιση στοιχειωδών κοινοτικών μέτρων για την καταπολέμηση ορισμένων νόσων των ψαριών<sup>(3)</sup>, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την απόφαση 2001/288/ΕΚ της Επιτροπής<sup>(4)</sup>, και ιδίως το άρθρο 5 παράγραφος 2 και το άρθρο 6,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Η οδηγία 93/53/ΕΟΚ ορίζει ότι δειγματοληψίες και εργαστηριακοί έλεγχοι για την ύπαρξη ασθενειών του καταλόγου I και του καταλόγου II, που ορίζονται στο παράρτημα Α της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ, πρέπει να διενεργούνται με τη βοήθεια των μεθόδων που καθορίζονται σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 15 της οδηγίας 91/67/ΕΟΚ.
- (2) Τα σχέδια δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης των περιλαμβανόμενων στον κατάλογο II ασθενειών των ψαριών ιογενούς αιμορραγικής νέκρωσης (ΙΑΝ) και λοιμώδους αιματοποιητικής νέκρωσης (ΛΑΝ) ορίζονται με την απόφαση 2001/183/ΕΚ της Επιτροπής<sup>(5)</sup>.
- (3) Σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 5 παράγραφος 2 και του άρθρου 6 της οδηγίας 93/53/ΕΟΚ, όλες οι εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται στην ίδια λεκάνη απορροής ή στην ίδια παράκτια ζώνη όπου βρίσκεται κάποια εκμετάλλευση για την οποία υπάρχουν υπόνοιες ή και βεβαιότητα ότι είναι μολυσμένη με τον ιό της λοιμώδους αναίμιας του σολομού

(ΛΑΣ), πρέπει να τίθενται υπό επίσημη επιτήρηση. Πρέπει να θεσπίζονται τα κριτήρια καθορισμού ζωνών και εντεταλμένης επιτήρησης.

- (4) Για τον καθορισμό των σχεδίων δειγματοληψίας και των διαγνωστικών μεθόδων ανίχνευσης και επιβεβαίωσης της ύπαρξης ΛΑΣ, όπως επίσης και για τη θέσπιση κριτηρίων καθορισμού ζωνών και εντεταλμένης επιτήρησης μετά από υπόνοιες ή μετά από επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ, ζητήθηκε η γνώμη ειδημόνων για την υγεία των ψαριών και για τις εργαστηριακές πρακτικές. Επιπλέον, πρέπει να ληφθούν υπόψη οι κατευθυντήριες γραμμές για την διάγνωση της ΛΑΣ οι οποίες παρατίθενται στην τρέχουσα έκδοση του Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases (διαγνωστικό εγχειρίδιο για ασθένειες υδροβίων ζώων), του Διεθνούς Γραφείου Επιζωοτιών (ΔΓΕ).
- (5) Για την εφαρμογή των νέων αυτών απαιτήσεων πρέπει να προβλεφθεί επαρκές χρονικό διάστημα.
- (6) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Τα σχέδια δειγματοληψίας και οι διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης λοιμώδους αναίμιας του σολομού (ΛΑΣ), καθώς και τα κριτήρια καθορισμού ζωνών και εντεταλμένης επιτήρησης, μετά από υπόνοιες ή μετά από βεβαιότητα ύπαρξης ΛΑΣ, καθορίζονται στο παράρτημα της παρούσας απόφασης.

Άρθρο 2

Η παρούσα απόφαση εφαρμόζεται από τις 23 Οκτωβρίου 2003.

<sup>(1)</sup> ΕΕ L 46 της 19.2.1991, σ. 1.<sup>(2)</sup> ΕΕ L 122 της 16.5.2003, σ. 1.<sup>(3)</sup> ΕΕ L 175 της 19.7.1993, σ. 23.<sup>(4)</sup> ΕΕ L 99 της 10.4.2001, σ. 11.<sup>(5)</sup> ΕΕ L 67 της 9.3.2001, σ. 65.

*Άρθρο 3*

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.

Βρυξέλλες, 13 Ιουνίου 2003.

Για την Επιτροπή  
David BYRNE  
Μέλος της Επιτροπής

---

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

**σχέδια δειγματοληψίας και διαγνωστικές μέθοδοι για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης λοιμώδους αναμίας του σολομού (ΛΑΣ) και κριτήρια για τον καθορισμό ζωνών και την εντεταλμένη επιτήρηση μετά από υποψίες ή μετά από την επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ**

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΟΡΙΣΜΟΙ

Το παρόν παράρτημα:

- α) χαράσσει τις γενικές κατευθύνσεις και τις στοιχειώδεις απαιτήσεις για τα σχέδια δειγματοληψίας και τις διαγνωστικές μεθόδους για την ανίχνευση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ·
- β) ενσωματώνει τις διατάξεις και τους ορισμούς που καθορίζονται στις οδηγίες 91/67/ΕΟΚ και 93/53/ΕΟΚ·
- γ) θεσπίζει διατάξεις για τη διενέργεια καταλλήλως της διάγνωσης, του ελέγχου και της παρακολούθησης της ΛΑΣ, σε περίπτωση που υπάρχουν υπόνοιες ή που επιβεβαιώνεται η ύπαρξη ΛΑΣ·
- δ) απευθύνεται τόσο στις αρχές τις αρμόδιες για τον έλεγχο της ΛΑΣ, όσο και στο εργαστηριακό προσωπικό που εκτελεί τις δοκιμασίες για την εν λόγω ασθένεια. Δίδεται έμφαση στις διαδικασίες δειγματοληψίας, στις αρχές και στις εφαρμογές εργαστηριακών δοκιμασιών, καθώς και στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τους, όπως επίσης και στις λεπτομερείς εργαστηριακές τεχνικές. Ωστόσο, όταν είναι σκόπιμο, τα εργαστήρια δύνανται να επιφέρουν τροποποιήσεις στις δοκιμασίες που περιγράφονται στο παρόν παράρτημα ή να χρησιμοποιούν διαφορετικές δοκιμασίες, με την προϋπόθεση ότι θα είναι δυνατόν να αποδεικνύεται ανάλογος βαθμός ευαισθησίας και εξειδίκευσης. Επιπλέον, καθορίζονται κριτήρια για τον καθορισμό ζωνών και για την εντεταλμένη επιτήρηση μετά από υπόνοιες ή την επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ.

Για την εφαρμογή του παρόντος παραρτήματος ισχύουν οι ακόλουθοι πρόδητοι ορισμοί:

Ως «λεκάνη απορροής» νοείται το σύνολο της λεκάνης απορροής, από τις πηγές των υδατορρευμάτων μέχρι τις εκβολές, ή τμήμα λεκάνης απορροής, από την πηγή υδατορρευμάτων μέχρις ένα φυσικό ή τεχνητό φράγμα που εμποδίζει τη διέλευση των ψαριών.

Ως «παράκτια ζώνη» νοείται τμήμα των παράκτιων ή θαλάσσιων υδάτων, ή λιμνοθάλασσα, με συγκεκριμένη γεωγραφική οριοθέτηση και που συνίσταται σε ομοιογενές υδροδυναμικό σύστημα ή σειρά τέτοιων συστημάτων.

Το μέρος I θεσπίζει τις γενικές αρχές και τα κριτήρια για τη διάγνωση και την επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ καθώς και κριτήρια καθορισμού ζωνών και ληπτέα μέτρα εντεταλμένης επιτήρησης μετά από υποψίες ή επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ.

Το μέρος II ορίζει τους ελέγχους και τις δειγματοληψίες που πρέπει να διενεργούνται για την ανίχνευση ΛΑΣ.

Το μέρος III καθορίζει τις μεθόδους που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την ιολογική εξέταση.

Το μέρος IV περιγράφει τη διαδικασία εξέτασης δειγμάτων, με RT-PCR, για την ανίχνευση ΛΑΣ.

Το μέρος V περιγράφει το πρωτόκολλο που πρέπει να χρησιμοποιείται για την εξέταση νεφρικών αποτυπωμάτων με IFAT, όσον αφορά τη ΛΑΣ.

Το μέρος VI περιγράφει την ιστολογική μεθοδολογία.

Το μέρος VII περιέχει τα ακρωνύμια και τις συντμήσεις που χρησιμοποιούνται.

## **I. Κριτήρια για τη διάγνωση ΛΑΣ και για τον καθορισμό ζωνών, τη θέσπιση ορισμένων μέτρων ελέγχου και την εντεταλμένη επιτήρηση**

### **I.1. Γενικές αρχές για τη διάγνωση ΛΑΣ**

Το μέρος I.2 του παρόντος παραρτήματος ορίζει τους λόγους που δημιουργούν εύλογες υπόνοιες για τη μόλυνση ψαριών από τον ιό ΛΑΣ. Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι, όταν υπάρχουν υπόνοιες πως ψάρια κάποιας εκμετάλλευσης έχουν προσβληθεί από τον ιό ΛΑΣ, για να επιβεβαιωθεί ή αποκλειστεί η ύπαρξη της νόσου διεξάγεται το ταχύτερο δυνατόν εντεταλμένη έρευνα, στο πλαίσιο της οποίας διενεργούνται οι έλεγχοι και οι κλινικές εξετάσεις και εφαρμόζονται οι μέθοδοι λήψευς και επιλογής των δειγμάτων και οι μέθοδοι εργαστηριακών εξετάσεων που προβλέπονται στα μέρη III έως VI του παρόντος παραρτήματος. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί αρμοδίως η ύπαρξη ΛΑΣ πρέπει να πληρούται κάποια από τις τρεις δέσμες κριτηρίων που ορίζονται στο μέρος I.3 του παρόντος παραρτήματος.

### **I.2. Υπόνοιες μόλυνσης από ΛΑΣ**

I.2.1. Θεωρείται ότι υπάρχουν υπόνοιες για την ύπαρξη ΛΑΣ εφόσον πληρούται τουλάχιστον ένα από τα ακόλουθα κριτήρια:

- α) ύπαρξη μεταθανάτιων ευρημάτων που παραπέμπουν στην ύπαρξη ΛΑΣ, με ή χωρίς κλινικές ενδείξεις της νόσου. Τα μεταθανάτια ευρήματα και οι κλινικές ενδείξεις της νόσου είναι αυτά(-ές) που ορίζονται στην τρέχουσα έκδοση του διαγνωστικού εγχειριδίου για ασθένειες υδρόβιων ζώων, του Διεθνούς Γραφείου Επιζωοτιών (ΔΓΕ)·
- β) απομόνωση και ταυτοποίηση του ιού της ΛΑΣ σε κυτταροκαλλιέργεια από δείγμα που προέρχεται από οιοδήποτε ψάρι της εκμετάλλευσης, όπως περιγράφεται στο μέρος III·

- γ) εύλογη απόδειξη της ύπαρξης του ιού ΛΑΣ από δύο ανεξάρτητες εργαστηριακές δοκιμασίες, όπως π.χ. RT-PCR (μέρος IV) και IFAT (μέρος V)·
- δ) μεταφορά ζωντανών ψαριών σε εκμετάλλευση όπου υπάρχουν βάσιμες υπόνοιες για ΛΑΣ κατά το χρόνο της μεταφοράς·
- ε) όταν έρευνα αποκαλύπτει άλλους σημαντικούς επιδημιολογικούς δεσμούς με εκμεταλλεύσεις για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες ή βεβαιότητα μόλυνσης από ΛΑΣ.

I.2.2. Οι υπόνοιες για ΛΑΣ μπορούν να θεωρηθούν αβάσιμες εάν από συνεχείς έρευνες που περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα κλινικό έλεγχο μηνιαίως, επί εξαμήνου, δεν προκύψει καμία περαιτέρω σημαντική ένδειξη της παρουσίας ΛΑΣ.

### I.3. Επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ

Η ύπαρξη ΛΑΣ θεωρείται ως επιβεβαιωμένη εφόσον πληρούνται τα κριτήρια των στοιχείων α), β) ή γ):

- α) κλινικές ενδείξεις και μεταθανάτια ευρήματα που συνάδουν με την ύπαρξη ΛΑΣ, σύμφωνα με τα όσα ορίζει η τρέχουσα έκδοση του εγχειριδίου του ΔΓΕ για τη διάγνωση ασθενειών των υδρόβιων ζώων, συμπεριλαμβανομένων των νεκρών ψαριών, των αδύναμων ψαριών, των ψαριών με ασυνήθη συμπεριφορά, των ενδείξεων αναμίας, άλλων μεταθανάτιων ευρημάτων και παθολογικών μεταβολών· ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ με μία ή περισσότερες των ακόλουθων μεθόδων:
  - i) απομόνωση και ταυτοποίηση του ιού της ΛΑΣ σε κυτταρική καλλιέργεια τουλάχιστον ενός δείγματος από οιοδήποτε ψάρι της εκμετάλλευσης, σύμφωνα με το μέρος III·
  - ii) ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ μέσω της δοκιμασίας RT-PCR, με τις μεθόδους που περιγράφονται στο μέρος IV·
  - iii) ανίχνευση του ιού της ΛΑΣ στους ιστούς ή στα παρασκευάσματα ιστού, με τη βοήθεια ειδικών αντισωμάτων κατά του ιού της ΛΑΣ (π.χ., δοκιμασία IFAT σε νεφρικά αποτυπώματα, όπως περιγράφεται στο μέρος V)·
- β) απομόνωση και ταυτοποίηση του ιού της ΛΑΣ σε δύο δείγματα προερχόμενα από ένα ή περισσότερα ψάρια της εκμετάλλευσης που υφίστανται ξεχωριστούς ελέγχους σύμφωνα με την μεθοδολογία που περιγράφεται στο μέρος III·
- γ) απομόνωση και ταυτοποίηση του ιού της ΛΑΣ σε ένα τουλάχιστον δείγμα προερχόμενο από οιοδήποτε ψάρι της εκμετάλλευσης, σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στο μέρος III, με επιβεβαίωση της ύπαρξης του εν λόγω ιού στα παρασκευάσματα ιστού από οιοδήποτε ψάρι της εκμετάλλευσης, μέσω της δοκιμασίας RT-PCR (μέρος IV) ή της δοκιμασίας IFAT (μέρος V).

### I.4. Κριτήρια για τον καθορισμό και την ανάκληση της θέσπισης ζωνών ελέγχου και εντεταλμένης επιτήρησης μετά από υπόνοιες για την ύπαρξη ή μετά από επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ

I.4.1. Για τη θέσπιση προγράμματος εντεταλμένης επιτήρησης με βάση την επικινδυνότητα, τα κράτη μέλη προβαίνουν, κοντά σε εκμεταλλεύσεις των οποίων η μόλυνση από την ΛΑΣ αποτελεί αντικείμενο υπονοιών ή αποδείξεων αρμοδίως, στον καθορισμό κατάλληλων ζωνών ελέγχου και επιτήρησης.

I.4.2. Οι προς καθορισμό ζώνες προκρίνονται βάσει κατά περίπτωση ανάλυσης επικινδυνότητας για περαιτέρω εξάπλωση της νόσου. Σύμφωνα με την επιζωοτιολογική κατάσταση, η περί ής ο λόγος λεκάνη απορροής ή παράκτια ζώνη:

- ορίζεται ως ζώνη ελέγχου, ή
- ενδέχεται, εφόσον πρόκειται για εκτεταμένη λεκάνη απορροής ή παράκτια ζώνη, να διαφευθεί σε ζώνη ελέγχου (ελεγχόμενη ζώνη) και σε ζώνη επιτήρησης (επιτηρούμενη ζώνη), εφόσον δεν τίθεται σε κίνδυνο η αποτροπή της εξάπλωσης της ΛΑΣ.

Εξάλλου, είναι δυνατός ο καθορισμός συμπληρωματικών ζωνών επιτήρησης, εκτός της λεκάνης απορροής ή της παράκτιας ζώνης.

I.4.3. Οι κυριότεροι παράγοντες που πρέπει να συνεκτιμηθούν προκειμένου να καθοριστούν οι προαναφερθείσες ζώνες είναι αυτοί που επηρεάζουν τους κινδύνους εξάπλωσης της νόσου στα εκτρεφόμενα ψάρια και στα ψάρια που ζουν σε άγρια κατάσταση: ο αριθμός, η αναλογία και η κατανομή των κρουσμάτων θανάτου ψαριών στην εκμετάλλευση για την οποία υπάρχουν επίσημες υπόνοιες ή για την οποία έχει επιβεβαιωθεί η μόλυνση από τον ιό της ΛΑΣ, η αιτία θανάτου στη συγκεκριμένη εκμετάλλευση, η απόσταση από τις γειτονικές εκμεταλλεύσεις και η πυκνότητα των τελευταίων, οι εφαιπόμενες εκμεταλλεύσεις, τα είδη που φιλοξενεί η εκμετάλλευση, η διαχείριση που εφαρμόζεται στις μολυνθείσες και στις γειτονικές εκμεταλλεύσεις, οι υδροδυναμικές συνθήκες και άλλοι παράγοντες με επιδημιολογική σημασία, οι οποίοι έχουν εντοπιστεί στο πλαίσιο της επιζωοτικής έρευνας που διενεργήθηκε σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 5 παράγραφος 2 και του άρθρου 8 της οδηγίας 93/53/ΕΟΚ.

I.4.4. Για τον καθορισμό ζωνών εφαρμόζονται τα ακόλουθα στοιχειώδη κριτήρια:

I.4.4.1. Θεσπίζεται «ζώνη ελέγχου» (ελεγχόμενη ζώνη) από το κράτος μέλος που γειτνιάζει άμεσα με εκμετάλλευση της οποίας έχει επιβεβαιωθεί, η μόλυνση από τον ιό ΛΑΣ ως εξής:

- στις παράκτιες ζώνες: η ζώνη που περιέχεται σε κύκλο ακτίνας τουλάχιστον ίσης με την απόσταση μετακίνησης της παλίρροιας ή τουλάχιστον πέντε χιλιομέτρων, με κέντρο την εκμετάλλευση της οποίας έχει επιβεβαιωθεί η μόλυνση από τον ιό ΛΑΣ, ή ισοδύναμη ζώνη που καθορίζεται βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων, ή
- σε ζώνες της ενδοχώρας: όλη η λεκάνη απορροής της εκμετάλλευσης της οποίας έχει επιβεβαιωθεί η μόλυνση από τον ιό ΛΑΣ· στις εκτεταμένες λεκάνες απορροής, το κράτος μέλος δύναται να περιορίσει την επέκταση της ζώνης σε τμήματα της λεκάνης απορροής, υπό τον όρο ότι δεν τίθεται εν κινδύνω η αποτροπή της εξάπλωσης της ΛΑΣ.

I.4.4.2. Σε περίπτωση υπονοιών για την ύπαρξη ΛΑΣ, θεσπίζεται «προσωρινή ζώνη ελέγχου» βάσει των ιδίων κριτηρίων με αυτά της «ζώνης ελέγχου».

I.4.4.3. Με βάση τις ανάγκες, καθορίζεται από το κράτος μέλος «ζώνη επιτήρησης» (επιτηρούμενη ζώνη) εκτός της ζώνης ελέγχου, στις περιοχές όπου κρίνεται επαρκής μια χαλαρότερη επιτήρηση· η ζώνη επιτήρησης αντιστοιχεί:

- στις παράκτιες ζώνες: με ζώνη η οποία, περιβάλλοντας τη ζώνη ελέγχου, επικαλύπτει τις ζώνες μετακίνησης της παλίρροιας· ή με ζώνη, η οποία περιβάλλει την ζώνη ελέγχου, και η οποία περιέχεται σε κύκλο ακτίνας δέκα χιλιομέτρων από το κέντρο της ζώνης ελέγχου· ή με ισοδύναμη ζώνη που έχει καθοριστεί βάσει κατάλληλων υδροδυναμικών ή επιδημιολογικών δεδομένων, ή
- σε ζώνες της ενδοχώρας: εφόσον είναι αναγκαίο, σε εκτεταμένη ζώνη εκτός της καθορισθείσας ζώνης ελέγχου.

I.5. *Ανάπαυση και ανάκληση του καθορισμού ζωνών*

I.5.1. Η αρμόδια αρχή του κράτους μέλους εξασφαλίζει ότι όλες οι εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται στην ζώνη ελέγχου υποβάλλονται, για κατάλληλη χρονική περίοδο, σε ανάπαυση, αφού κενωθούν από τα ψάρια τους και, εφόσον είναι αναγκαίο, απολυμανθούν. Η διάρκεια της περιόδου αναπαύσεως σε εκμεταλλεύσεις των οποίων έχει επιβεβαιωθεί η μόλυνση από τον ιό της ΛΑΣ δεν μπορεί να είναι μικρότερη των έξι μηνών. Σε ό,τι αφορά τις άλλες εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται στις ζώνες ελέγχου, η εν λόγω περίοδος καθορίζεται από την αρμόδια αρχή, μετά από κατά περίπτωση εκτίμηση του ρίσκου. Όταν κενωθούν όλες οι εκμεταλλεύσεις στη ζώνη ελέγχου, διενεργείται συγχρονισμένη ανάπαυση τουλάχιστον έξι εβδομάδων.

Εξάλλου, η αρμόδια αρχή δύναται να αποφασίζει την ανάπαυση των εκμεταλλεύσεων στις καθορισμένες ζώνες επιτήρησης.

I.5.2. Δεν είναι δυνατή η ανάκληση της θέσπισης και η επανεισαγωγή πληθυσμών σε καθορισμένες ζώνες ελέγχου, προτού όλες οι εκεί εκμεταλλεύσεις κενωθούν από τα ψάρια τους, ενδεχομένως απολυμανθούν και τεθούν σε ανάπαυση σύμφωνα με τα όσα ορίζει το σημείο I.5.1. Κατά την επανεισαγωγή πληθυσμών σε αυτές, οι ζώνες ελέγχου μετατρέπονται σε ζώνες επιτήρησης, σύμφωνα με τα όσα ορίζει το σημείο I.4.4.3.

I.5.3. Οι καθορισμένες προσωρινές ζώνες ελέγχου δεν μπορούν να ανακληθούν προτού θεωρηθούν αβίβιμες οι υπόνοιες για μόλυνση από τον ιό ΛΑΣ, σύμφωνα με τα όσα ορίζει το σημείο I.2.2. Σε περίπτωση επιβεβαίωσης της ύπαρξης ΛΑΣ, σύμφωνα με τα όσα ορίζει το σημείο I.3, η προσωρινή ζώνη ελέγχου μετατρέπεται σε ζώνη ελέγχου.

I.5.4. Οι καθορισμένες ζώνες επιτήρησης δεν επιδέχονται ανακλήσεως παρά μόνο δύο έτη μετά την ανάκληση της ζώνης ελέγχου.

I.6. *Εντεταλμένη επιτήρηση μετά από υπόνοιες για την ύπαρξη ή από επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ*

I.6.1. Κατ' αναφορά στο άρθρο 5 παράγραφος 2 και στο άρθρο 6 της οδηγίας 93/53/ΕΟΚ και προκειμένου να καθοριστεί η κατανομή και η εξέλιξη της νόσου μετά από υπόνοιες για την ύπαρξη ή μετά από επιβεβαίωση της ύπαρξης ΛΑΣ σε κάποια εκμετάλλευση, πρέπει να εκτελείται επίσημο πρόγραμμα επιτήρησης βάσει του ρίσκου, από την αρμόδια αρχή ή από τις αρμόδιες για τις ιχθυοκαλλιέργειες υγειονομικές αρχές, κατόπιν συνεννοήσεως με την αρμόδια αρχή και υπό τον έλεγχό της, σε όλες τις εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται στις καθορισμένες ζώνες.

I.6.2. Για τους σκοπούς της εφαρμογής ενός τέτοιου προγράμματος εντεταλμένης επιτήρησης, η αρμόδια αρχή οφείλει, εν ανάγκη με επιτόπια επιθεώρηση, να εντοπίσει όλες τις εκμεταλλεύσεις στις καθορισμένες ζώνες και να προχωρήσει σε επίσημη απογραφή όλων των ειδών, κατηγοριών και ποσοτήτων ψαριών που εκτρέφονται στις εκμεταλλεύσεις, συμπεριλαμβανομένων των ποσοστών θνησιμότητας.

Ι.6.3. Μετά την αρχική εντεταλμένη απογραφή, οι εκμεταλλεύσεις που βρίσκονται στις καθορισμένες προσωρινές ζώνες ελέγχου που εκτρέφουν σολωμό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), ή οιοδήποτε άλλο είδος το οποίο η τελευταία έκδοση του υγειονομικού κώδικα για τα υδρόβια ζώα (Aquatic Animal Health Code) του ΔΓΕ θεωρεί ως υποκείμενο σε μόλυνση από ΛΑΣ ή ως δυνητικό φορέα ΛΑΣ, οφείλουν να υποβάλλουν, ανά δεκατέσσερις ημέρες, αναφορές στην αρμόδια αρχή για τα κρούσματα θανάτου. Η αύξηση της θνησιμότητας πρέπει να αναφέρεται ανά ημέρα και ανά δικτυοκλωβό. Η αρμόδια αρχή διερευνά κάθε σημαντικό ηυξημένη θνησιμότητα σε κάποια εκμετάλλευση.

Εάν επιβεβαιωθούν οι υπόνοιες, όλες οι εκμεταλλεύσεις στην καθορισμένη ζώνη ελέγχου κοινοποιούν κάθε εβδομάδα τα στοιχεία τα σχετικά με την θνησιμότητα στην αρμόδια αρχή, ανά δικτυοκλωβό και ανά ημέρα.

Οι εκμεταλλεύσεις στις ζώνες επιτήρησης κοινοποιούν στην αρμόδια αρχή τα σχετικά με την θνησιμότητα στοιχεία κάθε δεκατέσσερις ημέρες.

Επιπλέον, διενεργούνται τακτικές επιθεωρήσεις καθ' όλη τη διάρκεια του έτους στις καθορισμένες ζώνες, με τη συχνότητα που ορίζεται στον πίνακα 1. Ωστόσο, όταν οι κλιματικές συνθήκες καθιστούν αδύνατες τις εν λόγω επιθεωρήσεις για τμήμα του έτους, τα κράτη μέλη δύνανται να καθορίζουν άλλες συχνότερες επιθεωρήσεων, στο σχέδιο αντιμετώπισης έκτακτων περιστάσεων.

Πίνακας 1

## Πρόγραμμα εντεταλμένης επιτήρησης

Θέση των εκμεταλλεύσεων	Ελάχιστο πλήθος επιθεωρήσεων επι- σίως	Ελάχιστο πλήθος επιθεωρήσεων επι- σίως μετά την ανάκληση της ζώνης ελέγχου
Ζώνη ελέγχου	12	
Ζώνη επιτήρησης	6	6
Προσωρινή ζώνη ελέγχου	6	

Το πρόγραμμα επιτήρησης εκτελείται μέχρι ότου ανακληθεί ο καθορισμός των ζωνών.

Ι.6.4. Οι επιθεωρήσεις, καθώς και η επιλογή, η λήψη, η προετοιμασία και η αποστολή των δειγμάτων, πραγματοποιούνται όπως προβλέπεται στα σημεία ΙΙ.1 έως ΙΙ.4. Η εξέταση των δειγμάτων διενεργείται σύμφωνα με τα όσα ορίζουν τα μέρη ΙΙΙ έως VI.

## ΙΙ. Επιθεώρηση και δειγματοληψία

### ΙΙ.1. Επιθεώρηση, επιλογή και δειγματοληψία σε εκμετάλλευση για την οποία υπάρχουν υπόνοιες παρουσίας ΛΑΣ

ΙΙ.1.1. Κατά τις τακτικές επιθεωρήσεις που διενεργούνται στο πλαίσιο του προγράμματος εντεταλμένης επιτήρησης που περιγράφεται στο σημείο Ι.6, καθώς και στις εκμεταλλεύσεις για τις οποίες υπάρχουν υπόνοιες μόλυνσης από ΛΑΣ, όλος ο εξοπλισμός της εκμετάλλευσης (δικτυοκλωβοί, δεξαμενές ή τεχνητές λίμνες) υφίσταται επιθεώρηση με σκοπό τη διαπίστωση της ύπαρξης νεκρών, αδύναμων ή με αφύσικη συμπεριφορά ψαριών. Στο μέτρο του δυνατού, τα προσφάτως αποβιώσαντα (μη αποσυντεθέντα), αδύναμα ή με αφύσικη συμπεριφορά ψάρια, εξετάζονται για την ανίχνευση κλινικών συμπτωμάτων ή μεταθανάτιων ευρημάτων ΛΑΣ, όπως περιγράφεται στην τρέχουσα έκδοση του εγχειριδίου του ΔΓΕ για τη διάγνωση των ασθενειών των υδρόβιων ζώων.

ΙΙ.1.2. Εάν παρατηρηθούν πρόσφατες κλινικές ενδείξεις για την ύπαρξη ΛΑΣ, ή εάν κάποιος επιθεωρητής ή κτηνίατρος έχει λόγους να υποψιάζεται την μόλυνση ψαριών, διενεργείται δειγματοληψία τουλάχιστον δέκα ψαριών. Ει δυνατόν, το δείγμα αποτελείται από προσφάτως αποβιώσαντα, αδύναμα ή με αφύσικη συμπεριφορά ψάρια. Εάν δεν επαρκούν τα ψάρια που παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα, το δείγμα συμπληρώνεται με υγιή ψάρια από τους δικτυοκλωβούς, τις δεξαμενές ή τις τεχνητές λίμνες που παρουσιάζουν τον υψηλότερο βαθμό θνησιμότητας ή τον μεγαλύτερο αριθμό ψαριών με κλινικά συμπτώματα της ασθένειας.

ΙΙ.1.3. Εάν παρατηρηθούν πρόσφάτως αποβιώσαντα, αδύναμα ή με αφύσικη συμπεριφορά ψάρια, ενώ όμως τα κλινικά συμπτώματα και τα μεταθανάτια ευρήματα δεν συνάδουν με την ύπαρξη ΛΑΣ, η δειγματοληψία δεν είναι υποχρεωτική, αν και τα αναγκαία για μια διαφορική διάγνωση δείγματα μπορούν να ληφθούν όπως επιθυμεί ο επιθεωρητής ή ο κτηνίατρος.

II.1.4. Σε περίπτωση κατά την οποία ψάρια μη εκτρεφόμενα γεννούν υποψίες για μόλυνση από ΛΑΣ, τα κράτη μέλη μεριμνούν ώστε να λαμβάνονται κατάλληλα δείγματα, τα οποία και εξετάζονται με τις κατάλληλες κλινικές και εργαστηριακές μεθόδους, όπως ορίζεται στα μέρη II και III έως VI, προκειμένου να αποκλειστεί ή να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ΛΑΣ και να κριθεί κατά πόσον η εμφάνιση της νόσου συνιστά σημαντική απειλή για τα εκτρεφόμενα ψάρια.

## II.2. Προετοιμασία δειγμάτων από ψάρια

II.2.1. Τα δείγματα που προορίζονται για ιστολογική εξέταση λαμβάνονται κατ' αποκλειστικότητα από προσφάτως θανατωθέντα ψάρια με κλινικά συμπτώματα ή μεταθανάτια ευρήματα που συνάδουν με την ύπαρξη της νόσου. Λαμβάνεται δείγμα από τις τυχόν εξωτερικές ή εσωτερικές αλλοιώσεις και, οπωσδήποτε, αφαιρούνται δείγματα από το ήπαρ, το mesonephron, την καρδιά και το σπλήνα από κάθε ψάρι, με τη βοήθεια νυστεριού, και μεταφέρονται σε φυσιολογικό ορρό με ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης. Η αναλογία μονιμοποιητικού παράγοντα/ιστού πρέπει να είναι τουλάχιστον 20:1, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται η ικανοποιητική διατήρηση των ιστών.

II.2.2. Οι ιστοί για ιολογική εξέταση λαμβάνονται από όλα τα επιλεγμένα ψάρια. Λαμβάνονται δείγματα εις διπλούν για λόγους επαλήθευσης. Τα τεμάχια ήπατος, πρόνεφρου, καρδιάς και σπλήνα αφαιρούνται από το ψάρι με τη βοήθεια στειρού εργαλείου και μεταφέρονται σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν 9 ml διαλύματος μεταφοράς, δηλαδή υλικού κυτταροκαλλιέργειας με αντιβιοτικά. Ενδείκνυται συνδυασμός 12,5 µg ml<sup>-1</sup> φουγκίζονης, 200 IU ml<sup>-1</sup> πολυμξίνης Β και 200 µg ml<sup>-1</sup> καναμυκίνης, πλην όμως μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι συνδυασμοί αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας. Οι ιστοί πέντε, κατ' ανώτατο όριο, ψαριών, μπορούν να συγκεντρωθούν σ' έναν σωλήνα που περιέχει το διάλυμα μεταφοράς, και να αποτελέσουν ένα ενοποιημένο δείγμα. Το βάρος του ιστού σε ένα δείγμα πρέπει να είναι 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3. Τα νεφρικά αποτυπώματα για την εξέταση IFAT (ανοσοφθορισμός των τίτλων αντισωμάτων) λαμβάνονται από προσφάτως θανατωθέντα ψάρια, δηλαδή εντός δύο ωρών από του θανάτου. Αφαιρείται από το ψάρι τεμάχιο mesonephron, με τη βοήθεια στειρών εργαλείων. Ο ιστός στυλώνεται σε απορροφητικό χαρτί ώστε να απομακρυνθεί το πλεονάζον αίμα, στη συνέχεια δε πιέζεται επανειλημμένα επί υαλίνου πλακιδίου επικεχρισμένου με πολυ-L-λυσίνη. Οι μεμονωμένες αποτυπώσεις πραγματοποιούνται η μία δίπλα στην άλλη, χωρίς να αλληλεπικαλύπτονται, ούτως ώστε να δημιουργούν ένα συνεχές μονό στρώμα κυττάρων. Το αίμα και το ιστικό υγρό δεν αποτελούν το κατάλληλο υλικό για την δοκιμασία αυτή. Πρέπει να αποφεύγεται το «στράγγισμα» του ηπατικού δείγματος στο απορροφητικό χαρτί, δεδομένου ότι κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε αιματική θρόμβωση, με αποτέλεσμα την εναπόθεση μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών του ορρού στο πλακίδιο της δοκιμασίας. Τα αποτυπώματα ξηραίνονται δι' αέρος και στη συνέχεια διατηρούνται ψυχρά και ξηρά, εφόσον δεν επιβάλλεται να μονιμοποιηθούν άμεσα. Η μονιμοποίηση των αποτυπωμάτων λαμβάνει χώρα εντός 72 ωρών από τη λήψη του δείγματος του ψαριού. Ως εναλλακτική επιλογή, ψύχονται τα αποτυπώματα μετά από δι' αέρος ξήρανση και αποθηκεύονται για διάστημα 1 μηνός κατά μέγιστο όριο, σε - 20 °C, πριν από τη μονιμοποίηση.

II.2.4. Ψάρια με συμπτώματα αναιμίας αναισθητοποιούνται με κτύπημα και λαμβάνονται αμέσως αιματικά δείγματα σε ηπαρινούχο φιαλίδιο, για αιματολογικές εξετάσεις, όπως, π.χ., για τη μέτρηση του αιματοκρίτη.

II.2.5. Ιστοί για ανάλυση RT-PCR (ανάστροφη μεταγραφάση — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) λαμβάνονται από όλα τα ψάρια που απετέλεσαν το αντικείμενο δειγματοληψίας. Αφαιρείται τεμάχιο πρόνεφρου ή mesonephron από το ψάρι, με την βοήθεια στειρού εργαλείου, και μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf που περιέχει 1 ml συντηρητικού του RNA διαλύματος, αποδεδειγμένης αποδοτικότητας. Ιστός από πέντε, κατά μέγιστο όριο, ψάρια, συλλέγεται σε σωλήνα που περιέχει συντηρητικό υγρό και αποτελεί ένα ενοποιημένο δείγμα. Το βάρος του ιστού σε ένα δείγμα είναι περίπου 0,5 g. Όταν το μέγεθος των ψαριών είναι τόσο μικρό ώστε να μην επιτρέπει τη λήψη δείγματος με το απαιτούμενο βάρος, είναι δυνατόν να ληφθούν τεμάχια νεφρού, καρδιάς, σπλήνας ή πυλωρικά τυφλά, με την ως άνω σειρά προτιμής, ούτως ώστε να φθάσουμε στα 0,5 g.

## II.3. Αποστολή δειγμάτων ψαριών

II.3.1. Τα αιματικά δείγματα και οι σωλήνες που περιέχουν ιστούς ψαριών για ιολογική εξέταση ή ανάλυση RT-PCR (ανάστροφη μεταγραφάση — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) τοποθετούνται σε μονωμένους περιέκτες (π.χ., κιβώτια πολυστυρολίου με παχεία τοιχώματα), με αρκετές παγοκλώνες, ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η ψύξη των δειγμάτων κατά την μεταφορά στο εργαστήριο. Αποφεύγεται η κατάψυξη, ενώ κατά την παραλαβή πρέπει να υπάρχει ακόμη άλιωτος πάγος στο κιβώτιο της μεταφοράς, ή μία ή περισσότερες παγοκλώνες πρέπει να είναι ακόμη εν όλω ή εν μέρει παγωμένες. Υπό εξαιρετικές περιστάσεις, δείγματα RT-PCR και δείγματα για ιολογική εξέταση υφίστανται στιγμιαία κατάψυξη και μεταφέρονται στο εργαστήριο υπό θερμοκρασία μικρότερη ή ίση των - 20 °C.

II.3.2. Τα πλακίδια που προορίζονται για IFAT (ανοσοφθορισμός των τίτλων αντισωμάτων) αποστέλλονται σε πλακιδιοθήκες με επαρκές ξηραντικό μέσο ώστε να διατηρηθούν τα πλακίδια ξηρά και ψυχρά, όπως περιγράφεται ανωτέρω.

II.3.3. Σε περίπτωση μεταφοράς ιστών ψαριών σε μονιμοποιητικό μέσο για ιστολογική εξέταση, αυτοί αποστέλλονται σε στεγανούς σωλήνες εντός ανθεκτικών στα κτυπήματα περιεκτών, όπως, π.χ., είναι τα κιβώτια πολυστυρολίου με παχεία τοιχώματα.

- II.3.4. Εκτός εάν δείγματα έχουν υποστεί ψύξη, η ιολογική εξέταση αρχίζει το συντομότερο δυνατόν και οπωσδήποτε εντός 72 ωρών από την λήψη των δειγμάτων. Τα δείγματα για την επιβεβαιωτική ανάλυση αποθηκεύονται σε θερμοκρασία μικρότερη ή ίση των  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , μόλις αφιχθούν στο εργαστήριο.
- II.3.5. Είναι δυνατή η μεταφορά ολόκληρων ψαριών στο εργαστήριο, εφόσον πληρούνται οι θερμοκρασιακές απαιτήσεις κατά την μεταφορά, όπως περιγράφεται στο σημείο II.3.1. Τα ολόκληρα ψάρια τυλίγονται σε απορροφητικό χαρτί και μεταφέρονται σε πλαστική σακκούλα, υπό ψύξη, όπως περιγράφεται ανωτέρω.
- II.3.6. Είναι δυνατή η αποστολή ζωντανών ψαριών, μόνον όμως υπό την εποπτεία της εντεταλμένης υπηρεσίας.
- II.3.7. Για ανάλυση RT-PCR (ανάστροφη μεταγραφάση — αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) ιστών που διατηρούνται σε RNAlater, η λήψη του RNA πραγματοποιείται εντός ορισμένων χρονικών ορίων, σε ό,τι αφορά τα δείγματα που αποθηκεύονται σε διάφορες θερμοκρασίες. Οι χρόνοι αυτοί είναι οι ακόλουθοι:
- |                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| — $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  | μία ημέρα,    |
| — $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  | μία εβδομάδα, |
| — $4\text{ }^{\circ}\text{C}$   | ένας μήνας,   |
| — $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ | επ' αόριστον. |
- II.3.8. Όλες οι εργασίες συσκευασίας και σήμανσης διενεργούνται σύμφωνα με τους ισχύοντες εθνικούς και διεθνείς κανόνες περί μεταφοράς, ανάλογα με την περίπτωση.

#### II.4. Συλλογή συμπληρωματικού διαγνωστικού υλικού

Με τη σύμφωνη γνώμη του διαγνωστικού εργαστηρίου, μπορούν να ληφθούν και άλλοι ιστοί ψαριών και να υποστούν προπαρασκευή για συμπληρωματική εξέταση.

### III. Ιολογική εξέταση

#### III.1. Προπαρασκευή δειγμάτων

III.1.1. Εάν προκύψουν πρακτικές δυσκολίες που καθιστούν αδύνατο τον ενοφθαλμισμό κυττάρων εντός 72 ωρών από την λήψη των δειγμάτων ιστού, γίνεται δεκτή η ψύξη του ιστού σε  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 28 ημερών κατά μέγιστο όριο. Το δείγμα ψύχεται και αποψύχεται μόνον μία φορά πριν από την εξέταση.

III.1.2. Κάθε δείγμα (συγκέντρωση ιστού στο διάλυμα μεταφοράς) ομογενοποιείται πλήρως με τη βοήθεια περισταλτικού ομογενοποιητή, αναμεικτή, ή ιγδίου, φυγοκεντρείται σε  $2\ 000$  έως  $4\ 000 \times g$  επί 15 λεπτά σε  $0$  έως  $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$  και η υπερκείμενη στιβάδα διηθείται ( $0,45\ \mu\text{m}$ ) και επωάζεται με ίσο όγκο καταλλήλως αραιωθείσας ομάδας αντιορρών στους ιθαγενείς ορρότυπους του IPNV. Ο τίτλος του αντιορρού πρέπει να είναι τουλάχιστον 1:2000 σε δοκιμασία εξουδετέρωσης πλακών 50 %. Το μείγμα επωάζεται επί μία ώρα στους  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αυτό αντιπροσωπεύει το ενοφθαλμισμό.

Η επεξεργασία όλων των ενοφθαλμισμάτων με τον αντιορρό στον ιό IPN (λοιμώδης νεκρωτική γαγκραιτίτις: ιός ο οποίος, σε ορισμένα μέρη της Ευρώπης, εμφανίζεται στο 50 % των δειγμάτων ψαριών) αποβλέπει στην αποτροπή της εμφάνισης ιογενούς (από IPN) CPE σε ενοφθαλμίσματα κυτταρικών καλλιιεργειών. Αυτό μειώνει την διάρκεια των ιολογικών εξετάσεων, καθώς και τον αριθμό των περιπτώσεων όπου η παρουσία CPE θα έπρεπε να θεωρηθεί ως δυνητική ένδειξη παρουσίας του ιού της ΛΑΣ.

Όταν τα δείγματα προέρχονται από μονάδες παραγωγής που θεωρούνται ως μη προσβληθείσες από IPN, είναι δυνατόν να παραλειφθεί η επεξεργασία των ενοφθαλμισμάτων με τον αντιορρό στον ιό IPN.

#### III.2. Ενοφθαλμισμός κυτταρικών καλλιιεργειών

III.2.1. Τα κύτταρα SHK-1 (pass 80 ή μικρότερο) ή τα λευκοκύτταρα προνεφρού του σολομού του Ατλαντικού τρέφονται με θρεπτικό υλικό L-15 που περιέχει 5 % βόειο εμβρυακό ορρό, 2 % (v/v) 200 mM L-γλουταμίνη, και 0,08 % (v/v) 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη σε 12 ή 24 τριβλία με κοιλώματα. Είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν άλλες κυτταρικές σειρές αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας και ευαισθησίας για την απομόνωση του ιού της ΛΑΣ (ΛΑΣV), συνεκτιμώντας την στελεχική διακύμανση και την ικανότητα των διαφόρων στελεχών να αντιγράφονται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές. Το εναιώρημα που έχει υποστεί επεξεργασία από τον οργανικό αντιορρό ενοφθαλμίζεται σε νέες, ενεργά αναπτυσσόμενες, κυτταροκαλλιιεργείες, ούτως ώστε να φθάσουμε σε τελική αραιώση ιστικού υλικού προς το θρεπτικό υλικό της τάξεως του 1:1000. Για κάθε οργανικό εναιώρημα προστίθενται 40 μl ενοφθαλμίσματος σε κοίλωμα που περιέχει 2 ml θρεπτικού υλικού. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος διασταυρούμενης μόλυνσης, συνιστάται η χρήση 12 ή 24 χωριστών τριβλίων για δείγματα από διάφορες ιχθυοεμεταλλεύσεις.

III.2.2. Ένα τριβλίο παραμένει χωρίς ενοφθαλμισμό ούτως ώστε να χρησιμεύσει ως αρνητικός μάρτυρας. Ενοφθαλμίζεται χωριστό τριβλίο με απομονωμένο ΛΑΣV αναφοράς, ως θετικός μάρτυρας, ως ακολούθως: 100 μl μητρικού παρασκευάσματος ΛΑΣV (ελάχιστος τίτλος 10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub> ml<sup>-1</sup>) ενοφθαλμίζεται στην πρώτη κοιλότητα και αναμειγνύεται καλώς. Ποσότητα του εν λόγω υλικού μεταφέρεται από το πρώτο στο δεύτερο κοιλώμα μέχρις αραιώσεως 1:10 και αναμειγνύονται καλώς. Αυτό επαναλαμβάνεται σε ολόκληρο το τριβλίο προκειμένου να ληφθούν αραιώσεις 1:10. Ο ιός της ΛΑΣ (ΛΑΣV) μπορεί να αποθηκευθεί σε - 80 °C επί δύο τουλάχιστον έτη, πλην όμως αφής στιγμής απομυχθεί, πρέπει να χρησιμοποιηθεί εντός τριών ημερών. Ας σημειωθεί ότι πρέπει να ληφθούν μέτρα ώστε να αποφευχθεί διασταυρούμενη μόλυνση τριβλίων της δοκιμασίας με το υλικό του θετικού μάρτυρα. Για να αποτραπεί ο κίνδυνος αυτός, οι θετικοί μάρτυρες συγκροτούνται και υφίστανται επεξεργασία χωριστά από τα τριβλία της δοκιμασίας.

III.2.3. Τα δείγματα επωάζονται σε 14 ± 2 °C για διάστημα μικρότερο ή ίσο των δεκαπέντε ημερών.

### III.3. Μικροσκοπική εξέταση

Με τη βοήθεια μικροσκοπίου, οι κυτταρικές καλλιέργειες εξετάζονται δύο φορές για CPE, μεταξύ της 5ης και της 7ης, καθώς και μεταξύ της 12ης και 14ης ημέρας από τον ενοφθαλμισμό. Σε περίπτωση που κάποια ομάδα δείξει CPE, αρχίζουν αμέσως οι διαδικασίες ταυτοποίησης ιού (III.6). Σε περίπτωση που δεν διαπιστωθεί CPE μέχρι και την 14η ημέρα, διενεργείται αιμοπροσρόφηση.

### III.4. Αιμοπροσρόφηση

Η αναπαραγωγή του ιού της ΛΑΣ (ΛΑΣV) σε κυτταρικές καλλιέργειες δεν καταλήγει πάντοτε σε CPE. Ως εκ τούτου, κάθε κοιλώμα υποβάλλεται σε δοκιμασία αιμοπροσρόφησης, όπως περιγράφεται κατωτέρω, ή, εναλλακτικά, κάθε κοιλώμα υποβάλλεται σε δοκιμασία ανοσοφθορισμού (IF), όπως περιγράφεται στο σημείο III.6.1.

III.4.1. Αφαιρείται το θρεπτικό μέσο των κυτταροκαλλιεργειών από κάθε κοιλώμα, συμπεριλαμβανομένων των θετικών και αρνητικών μαρτύρων, και τοποθετείται σε επισημασμένους στείρους σωλήνες. Σε κάθε κοιλώμα προστίθενται 500 μl εναιωρήματος 0,2 % (v/v) εκπλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων κουνελιού ή αλόγου, ή εναιώρημα 0,05 % (v/v) εκπλυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων ιριδίτσουσας πέστροφας ή σολομού του Ατλαντικού και ακολουθεί επώαση στην θερμοκρασία περιβάλλοντος επί 45 λεπτά. Απομακρύνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια και κάθε κοιλώμα εκπλύνεται δύο φορές με μέσο L-15. Εξετάζεται κάθε κοιλώμα με την βοήθεια μικροσκοπίου.

III.4.2. Η παρουσία συμπλέγματος ερυθρών αιμοσφαιρίων προσκολλημένων στην επιφάνεια κυττάρων SHK-1 ή λευκοκυττάρων ΤΟ συνιστά ένδειξη λοίμωξης με ορθομυξοϊό. Εάν η δοκιμασία αιμοπροσρόφησης είναι θετική, διενεργείται πάραυτα δοκιμασία ταυτοποίησης ιού (III.6).

### III.5. Υποκαλλιέργεια (passage)

III.5.1. Διενεργείται υποκαλλιέργεια μεταξύ της 13ης και της 15ης ημέρας. Προστίθενται 225 μl της υπερκείμενης στιβάδας της καλλιέργειας σε κοιλώματα που περιέχουν νωπά, ενεργώς αυξανόμενα κύτταρα SHK-1 σε τριβλία των δώδεκα κοιλωμάτων και ακολουθεί επώαση σε 14 ± 2 °C επί 18 ημέρες κατά μέγιστο όριο. Εξετάζονται δύο φορές οι κυτταροκαλλιέργειες με τη βοήθεια μικροσκοπίου για CPE, μία φορά μεταξύ της 5ης και 7ης ημέρας και μία μεταξύ της 14ης και 18ης ημέρας από τον ενοφθαλμισμό. Εάν κάποια ομάδα δείξει CPE, αρχίζουν αμέσως διαδικασίες ταυτοποίησης ιού (III.6). Εάν δεν παρατηρηθεί CPE μεταξύ 14ης και 18ης ημέρας, διενεργείται δοκιμασία αιμοπροσρόφησης (III.4).

III.5.2. Σε περίπτωση που εμφανιστεί κυτταροτοξικότητα εντός των πρώτων επτά ημερών της επώασης, διενεργείται υποκαλλιέργεια στο στάδιο εκείνο, και τα κύτταρα πρέπει να επωαστούν επί 14 έως 18 ημέρες και να υποστούν εκ νέου υποκαλλιέργεια με περαιτέρω επώαση 14 έως 18 ημερών. Εάν η κυτταροτοξικότητα εμφανιστεί μετά από επτά ημέρες, διενεργείται μια υποκαλλιέργεια και τα κύτταρα επωάζονται, ούτως ώστε να επιτευχθεί συνολική επώαση 28 έως 36 ημερών από τον πρωτοβάθμιο ενοφθαλμισμό.

III.5.3. Σε περίπτωση που εκδηλωθεί βακτηριακή μόλυνση στην αρχική καλλιέργεια, οργανώνεται εκ νέου η δοκιμασία με τους αποθηκευμένους σε θερμοκρασία - 80 °C ομογενοποιημένους ιστούς. Πριν από τον ενοφθαλμισμό, φυγοκεντρώνονται οι ομογενοποιημένοι ιστοί σε 4 000 × g επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία 0-6 °C, η δε υπερκείμενη στιβάδα διηθείται σε 0,22 μm. Εάν εκδηλωθεί βακτηριακή μόλυνση στο στάδιο της υποκαλλιέργειας, η υπερκείμενη στιβάδα διηθείται σε 0,22 μm, ενοφθαλμίζεται σε νωπά κύτταρα και επωάζεται για ένα περαιτέρω διάστημα 14 έως 18 ημερών.

### III.6. Δοκιμασίες ταυτοποίησης ιού

Εάν, σε οιοδήποτε στάδιο, παρατηρηθούν ενδείξεις CPE, ή εάν κάποια δοκιμασία αιμοπροσρόφησης αποβεί θετική, διενεργείται ταυτοποίηση. Οι μέθοδοι επιλογής για την ταυτοποίηση του ΛΑΣV είναι οι IF (III.6.1) και RT-PCR (μέρος IV). Εάν θεωρείται ενδεχόμενη η παρουσία άλλων ιών, συνιστάται η διενέργεια συμπληρωματικών δοκιμασιών ταυτοποίησης ιού. Εάν οι δοκιμασίες αυτές δεν επιτρέψουν την τελεσίδικη ταυτοποίηση του ιού εντός εβδομάδος, η υπερκείμενη στιβάδα μεταφέρεται για άμεση ταυτοποίηση σε εθνικό εργαστήριο αναφοράς ή σε εργαστήριο αναφοράς της ΕΕ, το οποίο ασχολείται με τις νόσους των ψαριών.

#### III.6.1. Δοκιμασία ανοσοφθορισμού (IF)

III.6.1.1. Κύτταρα SHK-1 (pass 80 ή μικρότερο) ή κύτταρα ΤΟ καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό L-15 το οποίο περιέχει 5 % εμβρυακό βόειο ορό, 2 % (v/v) 200 mM L-γλουταμίνη, και 0,08 % (v/v) 50 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη σε τριβλία 24 ή 96 κοιλωμάτων και χρησιμοποιούνται με συμβολή μεγαλύτερη του 50 %. Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν άλλες κυτταρικές σειρές ή θρεπτικό υλικό, αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας. Σε καθένα από τα δύο κοιλώματα προστίθενται 225 μl υπερκείμενης στιβάδας για την οποία υπάρχουν υπόνοιες μόλυνσης από ιό, αναμειγνύονται και 225 μl μεταφέρονται σε δύο άλλα κοιλώματα: προκύπτει δηλαδή αραιώση 1:5. Δύο επιπλέον κοιλώματα παραμένουν χωρίς ενοφθαλμισμό, προκειμένου να χρησιμεύσουν ως μάρτυρες. Τα δείγματα από κάθε ιχθυοεκμετάλλευση τυγχάνουν επεξεργασίας σε χωριστά τριβλία, όπως και ο έλεγχος για ιούς. Διενεργείται έλεγχος ιών με τη χρήση απομονωμένου υλικού του ιού της ΛΑΣ.

III.6.1.2. Τα τριβλία επωάζονται στους  $14 \pm 2$  °C και εξετάζονται μικροσκοπικά για διάστημα όχι μεγαλύτερο των επτά ημερών. Εάν παρατηρηθεί πρόωμη CPE, ή δεν παρατηρηθεί καθόλου CPE εντός επτά ημερών, το επόμενο βήμα είναι η μονιμοποίηση. Τα κοιλώματα εκπλύνονται με PBS και μονιμοποιούνται με επώαση με τη βοήθεια ακετόνης 80 % επί 20 λεπτά, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα τριβλία ξηραίνονται δι' αέρος και υποβάλλονται πάραυτα σε χρώση, ή αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 0-6 °C, για διάστημα όχι μεγαλύτερο των 24 ωρών, προτού υποβληθούν σε χρώση.

III.6.1.3. Τα εις διπλούν κοιλώματα υποβάλλονται σε χρώση με το μονοκλωνικό αντίσωμα 3H6F8 του ΛΑΣV, ή με άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητας και εξειδίκευσης, αραιώνονται σε PBS και επωάζονται στους  $37 \pm 4$  °C επί 30 λεπτά. Αφαιρείται το μονοκλωνικό αντίσωμα και τα τριβλία εκπλύνονται τρεις φορές με Tween 20, 0,05 %, σε PBS. Αντίσωμα κατά της IgG ποντικού, συζευγμένο με FITC και αραιωμένο σε PBS, προστίθεται σε κάθε κοιλώμα και επωάζεται σε  $37 \pm 4$  °C επί 30 λεπτά. Σημείωση: σε κάθε εργαστήριο προσδιορίζονται οι βέλτιστες αραιώσεις των διαφόρων παρτίδων μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένων με FITC. Απομακρύνονται τα αντισώματα και τα τριβλία εκπλύνονται τρεις φορές με Tween 20, 0,05 σε PBS.

III.6.1.4. Εξετάζονται τα κοιλώματα αμέσως, με τη χρήση ανεστραμμένου μικροσκοπίου κατάλληλου για μικροσκοπία ανοσοφθορισμού, με ειδικό φίλτρο διέγερσης του FITC. Το αποτέλεσμα της δοκιμασίας θεωρείται θετικό εάν παρατηρηθούν φθορίζοντα κύτταρα. Για να είναι έγκυρη η δοκιμασία, οι θετικοί μάρτυρες πρέπει να δώσουν θετικό αποτέλεσμα και οι αρνητικοί μάρτυρες αρνητικό.

### IV. Εξέταση δειγμάτων με την βοήθεια αναστροφής μεταγραφάσης — αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (RT — PCR)

IV.1. Εξετάζονται οι διαδικασίες που απαιτούνται για την αντιγραφή PCR μέρους του τμήματος 8 του γονιδιώματος του ιού ΛΑΣ, που μπορεί να διενεργηθεί σε ιχθυοϊστός ή σε καλλιέργεια ιών ΛΑΣ

#### IV.1.1. Εξαγωγή RNA

α) Αφαιρείται RNAlater από κάθε δείγμα. Προστίθεται 1 ml dH<sub>2</sub>O επεξεργασμένου με DEPC σε κάθε σωλήνα και οι σωλήνες φυγοκεντρώνται σε 13 000 στροφές ανά λεπτό (rpm) επί πέντε λεπτά σε θερμοκρασία 0-6 °C.

β) Αφαιρείται από κάθε δείγμα η υπερκείμενη στιβάδα και προστίθενται 800 μl TRIzol (Invitrogen), ή εναλλακτικό αντιδραστήριο αποδεδειγμένα ίσης ή μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας, σε κάθε δείγμα και σε σωλήνα-μάρτυρα που περιέχει κατάλληλο υλικό-μάρτυρα (400 μl dH<sub>2</sub>O ή νεφρικούς ομογενοποιημένους ιστούς από ψάρια απηλλαγμένα συγκεκριμένων παθογόνων παραγόντων. Εφόσον κριθεί σκόπιμο, διενεργείται λύση ιστών δι' επανειλημμένων αναρροφήσεων με μικροσιφόνιο. Οι σωλήνες επωάζονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επί πέντε λεπτά. Προστίθενται 160 μl χλωροφορμίου σε κάθε σωλήνα και οι σωλήνες ανακινούνται δυνατά επί τρία λεπτά, στη συνέχεια δε υφίστανται φυγοκέντρηση σε 13 000 στροφές ανά λεπτό (rpm) για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 0-6 °C.

γ) Αφαιρείται η υδατήνη υπερκείμενη στιβάδα και μεταφέρεται σε επισημασμένο σωλήνα 1,5 ml που περιέχει 500 μl ισοπροπανόλης και οι σωλήνες επωάζονται επί δέκα λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, στη συνέχεια δε υφίστανται φυγοκέντρηση σε 6 500 στροφές ανά λεπτό (rpm) επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία 0-6 °C.

- δ) Αφαιρείται η υπερκείμενη στιβάδα και προστίθεται στο σφαιρίδιο RNA 1 ml αιθανόλης 75 %. Στη συνέχεια οι σωλήνες υφίστανται φυγοκέντρηση σε 6 500 στροφές ανά λεπτό (rpm) επί πέντε λεπτά σε θερμοκρασία 0-6 °C.
- ε) Αφαιρείται η υπερκείμενη στιβάδα και οι σωλήνες παραμένουν ανοικτοί για τρία περίπου λεπτά ώστε να καταστεί δυνατή η εξάτμιση της εναπομένουσας αιθανόλης. Προστίθενται 15 µl dH<sub>2</sub>O που έχει υποστεί επεξεργασία με DEPC, ώστε να σχηματισθεί εναιώρημα, με ανακίνηση σε μαγνητικό αναδευτήρα για σύντομο χρονικό διάστημα, εφόσον κριθεί αναγκαίο.
- στ) Χρησιμοποιείται φασμοφωτόμετρο για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του RNA και της καθαρότητας των δειγμάτων. Οι οπτικές πυκνότητες μετρούνται σε 260 και 280 nm.
- ζ) Το RNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί πάραυτα (την ίδια ημέρα), μπορεί να αποθηκευθεί προσωρινά σε θερμοκρασία 0-6 °C. Το RNA που δεν χρησιμοποιείται πάραυτα αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -80 °C.

#### IV.1.2. RT (ανάστροφη μεταγραφάση)

- α) Διαλύονται 2 µg RNA σε επεξεργασμένο με DEPC dH<sub>2</sub>O σε σωλήνες φυγοκέντρησης 1,5 ml. Όταν η συγκέντρωση RNA κάποιου δείγματος είναι τόσο χαμηλή ώστε να μην επιτρέπει την χρήση 2 µg στην αντίδραση RT, χρησιμοποιείται η μέγιστη δυνατή ποσότητα RNA. Το διάλυμα RNA επωάζεται σε θερμοκρασία 55-60 °C επί δέκα λεπτά.
- β) Στη συνέχεια, οι περιέχοντες RNA σωλήνες τοποθετούνται σε πάγο και προστίθενται αντιδραστήρια RT ώστε να επιτευχθούν τελικές συγκεντρώσεις ρυθμιστικού 1x, 1mM dNTPs, 100 ng εξαμερή τυχαίας αλληλουχίας, 20 U αναστολέα της RNάσης και 200 U MMLV-RT, σε συνολικό όγκο 20 µl.
- γ) Οι σωλήνες επωάζονται επί μία ώρα σε θερμοκρασία 37 °C.
- δ) Το cDNA αποθηκεύεται για όσο διάστημα χρειαστεί σε θερμοκρασία 0-6 °C και χρησιμοποιείται στο PCR το συντομότερο δυνατόν.

#### IV.1.3. PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)

- α) Προστίθενται 5 µl cDNA σε μείγμα 45 µl PCR με στόχο τελικές συγκεντρώσεις 1x ρυθμιστικού, διαλύματος 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM κάθε dNTP, 25 pmol κάθε εκκινητή και 1 U Taq πολυμεράσης. Οι εκκινητές είναι οι ΛΑΣ + (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (εκκινητής ευθείας αντίδρασης) και ΛΑΣ - (5'-GCC-AAG-TGT-AAAG-TAG-CAC-TCC-3') (εκκινητής αντίστροφης αντίδρασης). Περιέχονται οι αρνητικοί μάρτυρες για τα στάδια της εξαγωγής, RT και PCR.
- β) Οι σωλήνες τοποθετούνται σε κλίβανο θερμικών κύκλων προγραμματισμένο στους 94 °C για διάστημα πέντε λεπτών, ακολουθούμενου από 35 κύκλους των 94 °C επί ένα λεπτό, 55 °C επί ένα λεπτό και 72 °C επί ένα λεπτό, με τελική επώαση στους 72 °C επί πέντε λεπτά.
- γ) Τα αποτελέσματα της PCR αξιολογούνται μετά από ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιώντας πήκτωμα αгарόζης 2 % κεχρωσμένο με βρωμιούχο αιθίδιο και περιέχον ιχνηθέτες μεγέθους με τα δείγματα και τους αρνητικούς μάρτυρες από τα στάδια RT και PCR. Ένα και μόνο προϊόν PCR 155 bp θα θεωρηθεί ενδεικτικό της παρουσίας RNA του ιού ΛΑΣ. Τα δείγματα που περιέχουν ένα επιπλέον προϊόν, 310 bp, θεωρούνται επίσης ως περιέχοντα RNA του ιού ΛΑΣ. Τα δείγματα στα οποία περιέχονται πλείονα προϊόντα PCR, και τουλάχιστον ένα περίπου 155 bp, δύνανται να περιέχουν RNA του ιού ΛΑΣ. Αυτά μπορούν να διερευνηθούν περαιτέρω με τη χρήση ανιχνευτών DNA ή προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

#### IV.1.4. Επιβεβαίωση PCR της απομόνωσης ιού ΛΑΣ σε ιστοκαλλιέργεια

Εάν, κατά την ιολογική εξέταση ιστοδειγμάτων σε κύτταρα SHK-1, επιβεβαιώνεται πλήρες κυτταροπαθογενές φαινόμενο (CPE), αφαιρούνται από το κοιλώμα 400 µl υπερκείμενης στιβάδας και τοποθετούνται σε στείρο σωλήνα 1,5 ml. Εξάγεται από το δείγμα αυτό RNA, όπως περιγράφεται στο σημείο III.1 και διενεργείται RT-PCR. Εάν χρησιμοποιούνται καλλιέργειες χωρίς πλήρη CPE, αφαιρείται η υπερκείμενη στιβάδα, αποξέονται κύτταρα από την επιφάνεια του κοιλώματος ή της φιάλης και μεταφέρονται σε στείρο σωλήνα 1.5 ml για εξαγωγή RNA και RT-PCR.

#### IV.1.5. Ανίχνευση προϊόντων PCR με τη βοήθεια ανιχνευτή DNA

- α) Η ιδιαιτερότητα ενός προϊόντος PCR 155 bp μπορεί να εκτιμηθεί με τη χρήση, ως ανιχνευτή, ολιγονουκλεοτιδίου που υβριδοποιείται σε περιοχή του προϊόντος PCR, στο εσωτερικό των εκκινητών. Τα προϊόντα PCR υποβάλλονται σε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1 % με ιχνηθέτες μεγέθους και έναν θετικό μάρτυρα και αρνητικούς μάρτυρες από τα στάδια RT και PCR.

- β) Λαμβάνεται αποτύπωμα Southern από DNA σε μεμβράνη και το επισημασμένο ολιγονουκλεοτίδιο (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') επωάζεται με την μεμβράνη μετά από κατάλληλα στάδια προ-υβριδοποίησης.
- γ) Εκπλύνεται από την μεμβράνη ο μη δεσμευμένος και ο μη — ειδικά — δεσμευμένος ανιχνευτής και εμφανίζεται ο δεσμευμένος ανιχνευτής.
- δ) Η δέσμευση ανιχνευτή σε τμήμα 155 bp (και 310 bp, εφόσον υπάρχει) αποτελεί απόδειξη της εξειδίκευσης του PCR και αποδεικνύει την ύπαρξη ιού ΛΑΣ RNA στο δείγμα.

#### IV.1.6. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των προϊόντων PCR

Η εξειδίκευση της PCR αξιολογείται εξετάζοντας την νουκλεοτιδική αλληλουχία του προϊόντος 155 bp PCR.

- α) Το προϊόν PCR απαλλάσσεται από το πήκτωμα αγαρόζης ή από το διάλυμα αγαρόζης.
- β) Προσδιορίζεται η αλληλουχία του τμήματος με την χρήση των ίδιων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR ή εκκινητών-φορέων, εφόσον κλωνοποιηθούν σε φορέα πριν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας.
- γ) Η νουκλεοτιδική αλληλουχία συγκρίνεται με αυτήν του τμήματος 8 του ιού ΛΑΣ που υπάρχει στην βάση δεδομένων νουκλεοτιδικής αλληλουχίας EMBL (αριθμοί πρόσβασης Y10404, AJ012285, AJ242016).
- δ) Η ύπαρξη αλληλουχίας που αντιστοιχεί σε αυτήν του τμήματος 8 του ιού ΛΑΣ αποτελεί απόδειξη ότι το δείγμα περιείχε RNA ιού ΛΑΣ.

### V. Εξέταση νεφρικών αποτυπωμάτων μέσω IFAT

V.1. Για την εξέταση νεφρικών αποτυπωμάτων μέσω IFAT καταρτίστηκε το ακόλουθο πρωτόκολλο

V.2. Προπαρασκευή και χρήση των αποτυπωμάτων

V.2.1. Τα πλακίδια μονιμοποιούνται σε ακετόνη ή μεθανόλη/ακετόνη (1:1) για τρία λεπτά και ξηραίνονται δι' αέρος. Πριν από τη χρήση εξετάζεται κάθε πλακίδιο και κατάλληλες περιοχές του πλακιδίου οριοθετούνται με μαρκαδόρο ImmEdge™ ή με παρόμοιο μαρκαδόρο, και αφήνεται να ξηρανθεί δι' αέρος. Στη συνέχεια, τα πλακίδια τοποθετούνται σε δεσμευτικό διάλυμα (αποκορυφωμένο γάλα 6 % σε PBS που περιέχει Tween 20 0,2 %) και επωάζεται με ελαφρά ανακίνηση επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Κάθε πλακίδιο ξηραίνεται και τοποθετείται οριζοντίως σε πλακιδιοθήκη που περιέχει υγρό απορροφητικό χαρτί προκειμένου να διατηρηθεί υγρή ατμόσφαιρα.

V.2.2. Κάθε αποτύπωμα καλύπτεται με διάλυμα μονοκλωνικού αντισώματος 3H6F8 έναντι του ιού ΛΑΣ (ή άλλο αντισώματος αποδεδειγμένης εξειδίκευσης και αποτελεσματικότητας), ενώ κλείνεται η πλακιδιοθήκη και επωάζεται με παράλληλη ανακίνηση επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Καλώς εχόντων των πραγμάτων, το αντίσωμα αραιώνεται 1:10 έως 1:100 σε αποκορυφωμένο γάλα 1 % η πραγματική αραιώση πρέπει να προσδιορίζεται για κάθε παρτίδα. Τα πλακίδια εκπλύνονται τρεις φορές επί δύο λεπτά σε PBS που περιέχει Tween 20 0,1 %. Κάθε αποτύπωμα καλύπτεται με διάλυμα που περιέχει αντίσωμα αγός κατά της IgG ποντικού συζευγμένο με FITC σε αραιώση 1:1000 σε αποκορυφωμένο γάλα 1 % και επωάζεται σε υγρό περιβάλλον επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πλακίδια εκπλύνονται τρεις φορές επί δύο λεπτά σε PBS που περιέχει Tween 20 0,1 %. Κάθε πλακίδιο καλύπτεται με διάλυμα Citifluor™ [500 ul Citifluor™ αναμειγμένα με 1,5 ml Tween 20 0,1 % (v/v) σε PBS] ή άλλο κατάλληλο (διαθλαστικό) μέσο αντικειμενοφόρου επί 10 λεπτά. Τα πλακίδια εκπλύνονται τρεις φορές σε PBS που περιέχει Tween 20 0,1 %. Εάν απαιτείται δεύτερη χρωστική, κάθε πλακίδιο μπορεί να καλυφθεί με ιωδιούχο προπίδιο (0,01 mg/ml) σε PBS που περιέχει Tween 20 0,1 % και επωάζεται επί τρία λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πλακίδια εκπλύνονται τρεις φορές επί δύο λεπτά σε PBS που περιέχει Tween 20 0,1 %. Τα πλακίδια στραγγίζονται και χρησιμοποιείται Citifluor™ ή άλλο κατάλληλο (διαθλαστικό) μέσο αντικειμενοφόρου. Τα πλακίδια αποθηκεύονται σε συνθήκες σκότους στους 4 °C προτού υποστούν μικροσκοπική εξέταση.

V.3. Μικροσκοπική εξέταση φθορισμού

Κάθε πλακίδιο εξετάζεται σε μικροσκόπιο κατάλληλο για φωτισμό επιφθορισμού με τη χρήση κατάλληλου φίλτρου που διεγείρει το περίβλημα FITC ώστε να εκπέμψει το χαρακτηριστικό πράσινο φθορίζον χρώμα. Όλοι οι τομείς εντός των περιοχών που οριοθετούνται από τον μαρκαδόρο ImmEdge™ εξετάζονται με φακούς × 10 και × 20 και οι ύποπτες περιοχές (που εμφανίζουν πράσινο φθορισμό) εξετάζονται περαιτέρω με φακό × 40 και φωτισμό φάσεως/φθορισμού ώστε να εξασφαλιστεί ότι ο φθορίζων χρωματισμός είναι κυτταροσύνδετος. Τα στοιχεία της φάσης για τις ύποπτες περιοχές καταγράφονται για επακόλουθη επιβεβαίωση της φύσης του φθορισμού από δεύτερο εξεταστή. Μετά την εξέταση από τον πρώτο εξεταστή, τα θετικά ή ύποπτα πλακίδια επανεξετάζονται από δεύτερο εξεταστή και επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα.

## V.4. Μάρτυρες

V.4.1. Τρεις είναι οι τύποι ελέγχου που πρέπει να περιλαμβάνονται σε κάθε παρτίδα πλακιδίων που χρωματίζονται για IFAT:

- νεφρικό αποτύπωμα από μη μολυνθέντα σολομό του Ατλαντικού (αρνητικός μάρτυρας),
- μη μολυνθείσα κυτταροκαλλιέργεια SHK-1 ή άλλη υποκείμενη κυτταροκαλλιέργεια (αρνητικός μάρτυρας),
- κυτταροκαλλιέργεια SHK-1 μολυνθείσα από ΛΑΣV ή άλλη υποκείμενη κυτταροκαλλιέργεια (θετικός μάρτυρας).

V.4.2. Εφόσον υπάρχει, συνιστάται νεφρικό αποτύπωμα από σολομό του Ατλαντικού μολυνθέντα από ΛΑΣV, ως προσθετικός θετικός μάρτυρας.

V.4.3. Εάν επιτυγχάνεται θετικό αποτέλεσμα με τυχόν αρνητικούς μάρτυρες, η δοκιμασία θεωρείται άκυρη για όλα τα πλακίδια της συγκεκριμένης παρτίδας. Εάν όλα τα πλακίδια σε κάποια παρτίδα, συμπεριλαμβανομένων των θετικών μαρτύρων, είναι αρνητικά, η δοκιμασία θεωρείται άκυρη για όλα τα πλακίδια της συγκεκριμένης παρτίδας. Στις περιπτώσεις όπου η αποτυχία των μαρτύρων ακυρώνει παρτίδα πλακιδίων, τα εν λόγω πλακίδια καταστρέφονται και διενεργείται νέα δοκιμασία με τα εφεδρικά αποτυπώματα.

## V.5. Εξέταση άλλων ιστών

Η τεχνική αυτή μπορεί να εφαρμοστεί σε άλλους ιχθυοίστους, όπως το ήπαρ, η σπλήνα και η καρδιά, εφόσον είναι δυνατή η εναπόθεση, στο πλακίδιο, λογικής ποσότητας ενδοθηλιακών κυττάρων, λευκοκυττάρων ή λεμφοκυττάρων. Η διαδικασία χρώσεως παραμένει η ίδια για κάθε ιστό, μολονότι για ορισμένους ιστούς θα ήταν ίσως προτιμότερη η αποφυγή του χρωματισμού με ιωδιούχο προπίδιο, και η στήριξη στην μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων, ώστε να προσδιοριστούν οι κυτταρικοί τύποι που είναι παρόντες στο αποτύπωμα.

## VI. Ιστολογία

Τα εγκλεισμένα σε παραφίνη τμήματα κόβονται σε μέγεθος 5 μm και χρωματίζονται με αιμοτοξιλίνη και εωσίνη. Οι ιστολογικές αλλοιώσεις που συνδέονται με τη ΛΑΣ περιγράφονται στην τρέχουσα έκδοση του διαγνωστικού εγχειριδίου του ΔΓΕ για ασθένειες υδρόβιων ζώων.

## VII. Ακρωνύμια και συντομογραφίες

cDNA	Συμπληρωματικό δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
CPE	Κυτταροπαθογενές φαινόμενο
DEPC	Πυροανθρακικό διαιθύλιο
dNTP	Τριφωσφορικό δεσοξυνουκλεοτιδίο
FITC	Ισοθειοκυανάτη φθοριεσκίνη
IF	Ανοσοφθορισμός
IFAT	Δοκιμή έμμεσου ανοσοφθορισμού
OIE	Διεθνές Γραφείο Επιζωοτιών
IPN(V)	Λοιμώδης παγκρεατική νέκρωση (ιός)
ΛΑΣ(ιός)	Λοιμώδης αναμία του σολομού (ιός)
PBS	Φυσιολογικός ορρός με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RT-(PCR)	Ανάστροφη μεταγραφάση (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)
SHK-1	Πρόνεφος του σολομού
TCID <sub>50</sub>	Μολυσματική δόση ιστοκαλλιέργειας στο τελικό αποτέλεσμα 50 %