

32003D0466

25.6.2003

IL-ĠURNAL UFFIĊJALI TA' L-UNJONI EWROPEA

L 156/61

ID-DEĊIŻJONI TAL-KUMMISSJONI

tat-13 ta' Ġunju 2003

li tistabbilixxi kriterji għat-taqsim ta' territorju f'żoni u għas-sorveljanza uffiċjali wara suspetti jew konferma tal-preżenza ta' anemija tas-salamun infettiva (ISA)

(notifikata permezz ta' dokument numru K(2003) 1831)

(Test b'rilevanza għaž-ŻEE)

(2003/466/KE)

IL-KUMMISSJONI TAL-KOMUNITAJIET EWROPEJ,

Wara li kkunsidrat it-Trattat li jstabbilixxi l-Komunitajiet Ewropej,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 91/67/KEE tat-28 ta' Jannar 1991 dwar il-kondizzjonijiet tas-saħħa ta' l-annimali li tirregola t-tqegħid fuq is-suq ta' annimali u prodotti⁽¹⁾ ta' l-akkwakultura, kif l-ahħar emendata bir-Regolament (KE) Nru 806/2003⁽²⁾, u partikolarment l-Artikolu 15 tiegħu,

Wara li kkunsidrat id-Direttiva tal-Kunsill 93/53/KE tal-24 ta' Ġunju 1993 li tintroduci miżuri minimi tal-Komunità għall-kontroll ta' ċertu mard tal-hut⁽³⁾, kif l-ahħar emendata bid-Deciżjoni tal-Kummissjoni 2001/288/KE⁽⁴⁾, u partikolarment l-Artikolu 5(2) u l-Artikolu 6 tagħha,

Billi:

- (1) Id-Direttiva 93/53/KEE tistabbilixxi li t-teħid ta' kampjuni u eżaminazzjonijiet laboratorji għall-preżenza ta' mard fil-lista I u II (li huma msemmija fl-Anness A tad-Direttiva 91/67/KEE) għandhom ikunu magħmula bl-użu ta' metodi stabbilliti skond l-Artikolu 15 tad-Direttiva 91/67/KEE.
- (2) Il-pjanijiet tat-teħid tal-kampjuni u metodi dijanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' mard tal-hut fil-lista II, settiċemija virali emoraġika (VHS) u nekrosi hematopoe-tika infettiva (IHN) huma stabbilliti bid-Deciżjoni tal-Kummissjoni 2001/183/KE⁽⁵⁾.
- (3) Skond l-Artikolu 5(2) u l-Artikolu 6 tad-Direttiva 93/53/KEE, il-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut li jinsabu fl-istess żona ta' qabda ta' l-ilma jew f'żona mal-kosta li fiha jinsab post fejn jitrabba l-hut issuspettat jew ikkonfermat li huwa infettat bl-anemija tas-salamun

infettiv (ISA), għandu jkun mqiegħed taħt sorveljanza uffiċjali. Il-kriterji għat-taqsim ta' territorju f'żoni u għas-sorveljanza uffiċjali għandhom ikunu stabbilliti.

- (4) Sabiex ikunu definiti l-pjanijiet tat-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' l-ISA, u biex ikunu stabbilliti l-kriterji għat-taqsim ta' territorju f'żoni u s-sorveljanza uffiċjali wara suspett jew konferma ta' l-ISA, esperti tas-saħħa tal-hut u esperti tal-laboratorju kienu kkonsultati. Barra dan, il-linji ġenerali għad-dijanjosji ta' l-ISA stabbilliti fl-edizzjoni preżenti tal-manwal Dijanjostiku tal-mard ta' l-annimali akwatiċi ta' l-Uffiċju Internazzjonali ta' l-Epiżuti (OIE) għandhom ikunu kkunsidrati.
- (5) Perjodu ta' żmien suffiċjenti għandu jkun ipprovdut għall-implimentazzjoni ta' dawn il-htigiet godda.
- (6) Il-miżuri pprovduti f'din id-Deciżjoni huma skond l-opinjoni tal-Kumitat Permanenti dwar il-Food Chain u s-Saħħa ta' l-Annimali,

ADOTTAT DIN ID-DEĊIŻJONI:

Artikolu 1

Il-pjanijiet tat-teħid ta' kampjuni u l-metodi dijanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' l-anemija tas-salamun infettiva, kif ukoll il-kriterji għat-taqsim ta' territorju f'żoni u għas-sorveljanza uffiċjali wara suspett jew konferma ta' l-ISA, huma stabbilliti fl-Anness ta' din id-Deciżjoni.

Artikolu 2

Din id-Deciżjoni għandha tghodd mit-23 ta' Ottubru 2003.

⁽¹⁾ ĠU L 46, tad-19.02.91, pġ. 1.⁽²⁾ ĠU L 122, tas-16.05.03, pġ. 1.⁽³⁾ ĠU L 175, tad-19.07.93, pġ. 23.⁽⁴⁾ ĠU L 99, ta' 1-10.04.01, pġ. 11.⁽⁵⁾ ĠU L 67, tad-09.03.01, pġ. 65.

Artikolu 3

Din id-Deciżjoni hija indirizzata lill-Istati Membri.

Magħmula fi Brussel, fit-13 ta' Ġunju 2003.

Għall-Kummissjoni
David BYRNE
Membri tal-Kummissjoni

ANNEX

Pjanijiet tat-teħid ta' kampjuni u metodi dijanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma ta' l-anemija tas-salamun infettiv (ISA) u l-kriterji għat-taqsim ta' territorju f'żoni u għas-sorveljanza uffiċjali wara suspett jew konferma ta' l-ISA

INTRODUZZJONI U DEFINIZZJONIJET

Dan l-Anness:

- (a) jipprovdni linji ġenerali u htigiet minimi dwar pjanijiet tat-teħid ta' kampjuni u metodi dijanjostiċi għall-iskoperta u l-konferma tal-preżenza ta' l-ISA;
- (b) jintegra d-disposizzjonijiet u d-definizzjonijiet stabbiliti fid-Direttiva 91/67/KEE u d-Direttiva 93/53/KEE;
- (c) ifassal disposizzjonijiet bil-għan li jkun hemm dijanjosi xierqa, kontroll u sorveljanza ta' l-ISA, f'każ ta' suspett jew konferma ta' l-ISA;
- (d) huwa indirizzat kemm għall-awtoritajiet responsabbli għall-kontroll ta' l-ISA u għall-persunal tal-laboratorju li jwettaq it-testijiet dwar din il-marda. Enfasi hija magħmula fuq il-proċeduri tat-teħid ta' kampjuni, prinċipji u applikazzjonijiet ta' testijiet tal-laboratorju u valutazzjoni tar-riżultati tagħhom, kif ukoll fuq tekniki tal-laboratorju dettaljati. Madankollu, meta jkun approprijat, il-laboratorji jistgħu japplikaw modifikazzjonijiet tat-testijiet deskritti fl-Anness, jew jużaw testijiet differenti, sakemm sensitività ta' l-istess daqs jew superjuri tista' tkun ipprovduta. Barra dan, kriterji għall-istabbiliment ta' żoni u sorveljanza uffiċjali wara suspett jew konferma ta' l-ISA huma stabbiliti. Għall-għan ta' dan l-Anness, id-definizzjonijiet addizzjonali li ġejjin għandhom jghoddu.

“Żona ta' qbid ta' l-ilma” tfisser iż-żona ta' qbid kollha mill-egħjun tal-kanali sa l-estwarju, jew parti miż-żona ta' qbid mill-egħjun tal-kanal sal-limitu naturali jew artifiċjali li jwaqqaf l-emigrazzjoni tal-hut minn dak il-limitu.

“Żona tal-kosta” tfisser parti mill-kosta jew ilma baħar jew estwarju b'delimitazzjoni ġeografika preċiża li tikkonsisti f'sistema omogenja idrodinamika jew serje ta' dawn is-sistemi.

Parti I tistabbilixxi l-prinċipji ġenerali u l-kriterji għad-dijanjosi u l-konferma ta' l-ISA u l-kriterji għat-taqsim ta' territorju f'żoni u s-sorveljanza uffiċjali li għandha tkun magħmula wara suspett jew konferma ta' l-ISA.

Parti II tistabbilixxi l-ispezzjonijiet u t-teħid ta' kampjuni li għandhom ikunu magħmula sabiex tkun skoperta l-preżenza ta' l-ISA.

Parti III tistabbilixxi l-metodi li għandhom ikunu użati għall-eżaminazzjoni viroloġika.

Parti IV tesponi l-proċedura għall-eżaminazzjoni tat-teħid ta' kampjuni bil-RT-PCR għall-iskoperta ta' l-ISA.

Parti V tiddekrivi l-Protokoll li għandu jkun intużat għall-eżaminazzjoni tal-marki tal-kliewi permezz ta' l-IFAT (test indirett ta' anti-korp fluworexxenti) dwar l-ISA.

Parti VI tinkludi l-metodoloġija għall-istoloġija.

Parti VII telenka l-akronimi u l-abbrevjazzjonijiet użati.

I. Kriterji għad-dijanjosi ta' l-ISA u għall-istabbiliment ta' zoni, ċerti miżuri ta' kontroll u sorveljanza uffiċjali**I.1. Prinċipji ġenerali għad-dijanjosi ta' l-ISA**

Raġunijiet xierqa biex il-hut ikun suspettat li hu infettat bl-ISAV huma esponenti fil-Parti I.2 ta' dan l-Anness. L-Istati Membri għandhom jiżguraw li, wara suspett li l-hut ta' post fejn jitrabba l-hut huwa nfettat bl-ISAV, investigazzjoni uffiċjali biex tkun ikkonfermata jew eskluża l-preżenza tal-marda għandha tkun magħmula mill-aktar malajr possibbli, u għandhom ukoll ikunu applikati l-ispezzjonijiet u l-eżaminazzjonijiet kliniċi, kif ukoll, il-kollezzjoni u s-selezzjoni ta' kampjuni u l-metodi ta' l-eżaminazzjonijiet tal-laboratorju kif stabbiliti fil-Parti III-VI ta' dan l-Anness. Sabiex tkun ikkonfermata uffiċjalment il-preżenza ta' l-ISA, kwalunkwe wiehed mit-tlett settijiet ta' kriterji stabbiliti fil-Parti I.3 ta' dan l-Anness għandu jkun issodisfatt

I.2. Suspett ta' infezzjoni bl-ISA

I.2.1. Il-preżenza ta' l-ISA għandha tkun issuspettata jekk għall-anqas wiehed minn dawn il-kriterji li ġejjin ikun milhuq:

- (a) il-preżenza ta' sejbiet wara l-mewt li jkunu konsistenti ma' l-ISA, b'sinjali jew mingħajr sinjali kliniċi ta' mard. Sejbiet wara l-mewt u sinjali kliniċi ta' mard għandhom ikunu skond dawki stabbiliti fl-edizzjoni preżenti tal-manwal Dijanjostiku ta' l-OIE għall-mard ta' annimali akwatiċi;
- (b) iżolazzjoni u identifikazzjoni ta' l-ISAV f'kultura ċellolari minn kampjun wiehed minn kwalunkwe hut tal-farm kif deskritt fil-Parti III;

- (c) Evidenza xierqa tal-preżenza ta' l-ISAV minn żewġ testijiet laboratorji indipendenti bħal RT-PCR (Parti IV) u IFAT (Parti V);
- (d) it-trasferiment ta' ħut ħaj ġewwa farm fejn hemm raġunijiet xierqa li jkun issuspettat li l-ISA kienet preżenti fiż-żmien tat-trasferiment tal-ħut;
- (e) fejn investigazzjoni turi kollegamenti sostanzjali epidemologiċi oħra ma' farms fejn l-ISA hija ssuspettata jew ikkonfermata.

1.2.2. Suspett ta' l-ISA jista' jkun eskluż jekk investigazzjonijiet kontinwi li jinvolvu ta' lanqas ispezzjoni klinika waħda fix-xahar għall-perjodu ta' sitt xhur juru li ma hemmx aktar evidenza sinifikattiva tal-preżenza ta' l-ISA.

I.3. Konferma ta' l-ISA

Il-preżenza ta' l-ISA għandha tkun ikkunsidrata bħala kkonfermata jekk il-kriterji fl-(a) jew (b) jew (c) ikunu milhuqa:

- (a) sinjali kliniċi u sejbiet wara l-mewt konsistenti ma' l-ISA skond l-edizzjoni preżenti tal-manwal Dijanjostiku ta' l-OIE għall-mard ta' animali akkwatiċi, inklużi ħut mejta, dgħajfa jew li għandhom imġieba anormali, sinjali ta' anemija, sejbiet oħra wara l-mewt u kambjamenti patologiċi, huma osservati, u l-ISAV tkun skoperta permezz ta' wiehed jew aktar minn dawn il-metodi li ġejjin:
 - (i) l-iżolazzjoni u l-identifikazzjoni ta' l-ISAV f'kultura ċellolari minn ta' lanqas kampjun wiehed minn kwalunkwe ħut fil-farm kif deskritt fil-Parti III,
 - (ii) l-iskoperta ta' l-ISAV permezz ta' RT-PCR bil-metodi deskritti fil-Parti IV,
 - (iii) l-iskoperta ta' l-ISAV f'tessuti jew preparazzjonijiet ta' tessuti permezz ta' anti-korpi speċifiċi kontra l-ISAV (eż. IFAT dwar marki tal-kliewi kif deskritt fil-Parti V);
- (b) l-iżolazzjoni u l-identifikazzjoni ta' l-ISAV f'żewġ kampjuni minn wiehed jew aktar ħut fil-post fejn jitrabba l-ħut eżaminati f'okkażjonijiet separati bl-użu tal-metodu deskritt fil-Parti III;
- (c) l-iżolazzjoni u l-identifikazzjoni ta' l-ISAV minn ta' lanqas kampjun wiehed minn kwalunkwe ħut fil-post fejn jitrabba l-ħut bl-użu tal-metodu deskritt fil-Parti III u b'evidenza korroborattiva ta' l-ISAV fi preparazzjonijiet ta' tessuti minn kwalunkwe ħut fil-post fejn jitrabba l-ħut bl-użu ta' RT-PCR (Parti IV) jew IFAT (Parti V).

I.4. Kriterji għall-istabbiliment u r-revokazzjoni ta' żoni għall-kontroll u sorveljanza uffiċjali wara suspett jew konferma ta' l-ISA

1.4.1. Bil-għan li jkun stabbilit programm uffiċjali ta' sorveljanza fuq bażi ta' riskju, l-Istati Membri fil-viċinanza ta' post fejn jitrabba l-ħut suspettat jew ikkonfermat li hu infettat bl-ISA, għandhom jistabbilixxu kontroll xieraq u żoni ta' sorveljanza.

1.4.2. Iż-żoni li għandhom ikunu stabbiliti għandhom ikunu definiti fuq bażi ta' analiżi ta' kull każ dwar ir-riskji ta' aktar tixrid tal-marda. Skond is-sitwazzjoni epizooloġika, iż-żona ta' qbid ta' l-ilma jew iż-żona tal-kosta ta' konċern:

- għandha tkun definita bħala żona ta' kontroll, jew
- tista' tkun, f'żoni ta' qbid estensiv ta' l-ilma jew żoni tal-kosta, diviża f'żona ta' kontroll u żona ta' sorveljanza jekk il-prevenzjoni tat-tixrid ta' l-ISA ma tkunx kompromessa.

Barra dan, sorveljanza addizzjonali tista', jekk neċessarju, tkun stabbilita, barra iż-żona ta' qbid ta' l-ilma jew iż-żona tal-kosta.

1.4.3. Il-fatturi prinċipali li għandhom ikunu kkunsidrati għall-istabbiliment ta' żoni msemmeja hawn fuq huma dawk li jinfluenzaw ir-riskji tat-tixrid tal-marda għall-ħut imrobbi u ħut f'ibhra miftuħa, bħal: in-numru, ir-rata u d-distribuzzjoni ta' mortalità ta' ħut fil-post fejn jitrabba l-ħut issuspettat jew ikkonfermat li hu infettat bl-ISAV; il-kawża tal-mortalità fil-post fejn jitrabba l-ħut ikkonċernat; id-distanza għal u d-densità ta' postijiet fejn jitrabba l-ħut li jinsabu qrib; postijiet fejn jitrabba l-ħut li jmissu ma' xulxin; l-ispeċi preżenti fil-postijiet fejn jitrabba l-ħut; il-ġestjoni tal-post fejn jitrabba l-ħut affetwat u tal-postijiet fejn jitrabba l-ħut li jinsabu qrib; il-kondizzjonijiet idrodinamiċi u fatturi oħra ta' sinifikanza epidemoloġika identifikati fil-qafas ta' l-investigazzjonijiet epizoti magħmula skond l-Artikoli 5(2) u 8 tad-Direttiva 93/53/KEE.

1.4.4. Il-kriterji minimi li ġejjin għandhom japplikaw għall-istabbiliment ta' żoni.

1.4.4.1. Għandha tkun stabbilita "Żona ta' kontroll" mill-Istati Membri fil-viċinanza ta' post fejn jitrabba l-hut li jkun ikkonfermat li huwa infettat bl-ISAV kif ġej:

- f'żoni tal-kosta: iz-żona inkluża f'ċirku ta' raġġ ta' mill-inqas dawra waħda tal-marea jew għall-anqas 5 km, biċ-ċentru jkun dak il-post fejn jitrabba l-hut ikkonfermat li hu infettat bl-ISAV, jew żona ekwivalenti ddeterminata skond informazzjoni idrodinamika jew epidemoloġika approprijata, jew
- f'żoni ġewwiena: iz-żona kollha ta' qbid ta' l-ilma tal-post fejn jitrabba l-hut ikkonfermat li hu infettat bl-ISAV; l-Istat Membru jista', f'żoni estensivi ta' qbid ta' l-ilma, jillimita l-estenzjoni taż-żona sa partijiet taż-żona ta' qbid ta' l-ilma sakemm il-prevenzjoni tat-tixrid ta' l-ISA ma tkunx kompromessa.

1.4.4.2. "żona temporanja ta' kontroll" għandha tkun stabbilita f'każ ta' suspett tal-preżenza ta' l-ISA, ibbażata fuq l-istess kriterji kif esposti għaž-żona ta' kontroll.

1.4.4.3. "żona ta' sorveljanza" għandha tkun stabbilita bhala neċessarja mill-Istat Membru barra ż-żona ta' kontroll f'żoni fejn sorveljanza anqas intensiva hija mifhuma li tkun suffiċjenti u għandha tikkorrispondi għal:

- f'żoni kostali: żona li tiċċirkonda ż-żona ta' kontroll ta' żoni ta' eskursjonijiet tal-marea li jokkoinċidu f'xi partijiet, żona li tiċċirkonda ż-żona ta' kontroll u inkluża f'ċirku ta' radju ta' 10 km miċ-ċentru taż-żona ta' kontroll jew żona ekwivalenti ddeterminata skond data idrodinamika jew epidemoloġika approprijata, jew
- f'żoni ġewwiena: jekk huwa neċessarju, bhala żona li testendi barra ż-żona ta' kontroll kif stabbilita.

1.5. *Is-serħan u r-revoka ta' żoni stabbiliti*

1.5.1. L-awtorità kompetenti ta' l-Istat Membru għandha tiżgura li l-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut ġewwa ż-żona ta' kontroll ikunu suġġetti għall-perjodu approprijat ta' tqallib wara li jkunu mbattla mill-hut u diżinfettati kif neċessarju. It-tul ta' żmien ta' mistrieħ fil-postijiet fejn jitrabba l-hut ikkonfermati li huma infettati bl-ISA għandu jkun ta' mhux anqas minn sitt xhur. It-tul ta' żmien ta' mistrieħ għal postijiet oħra fejn jitrabba l-hut f'żoni ta' kontroll għandu jkun iddeterminat mill-awtorità kompetenti fuq bażi ta' evalwazzjoni ta' riskju każ b'każ. Meta l-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut fiż-żona ta' kontroll jiġu mbattla, mhux anqas minn sitt xhur ta' mistrieħ issinkronizzat għandhom jgħoddu.

Barra dan, l-awtorità kompetenti tista' tiddeciedi dwar is-serħan ta' postijiet fejn jitrabba l-hut f'żoni ta' sorveljanza stabbiliti.

1.5.2. Żoni ta' kontroll stabbiliti ma jistgħux ikunu rrevokati u jerġġu jkunu stokkjati sakemm il-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut li jinsabu fiż-żoni jkunu mbattla mill-hut, iddiżinfettati kif neċessarju u mserrha skond 1.5.1. Meta ż-żoni jkunu ġew ristokkjati, iż-żoni ta' kontroll għandhom ikunu mibdula f'żoni ta' sorveljanza kif stabbilit fi 1.4.4.3.

1.5.3. Żoni ta' kontroll temporanju stabbiliti ma jistgħux ikunu rrevokati sakemm is-suspett ta' l-ISA ikun eskluż skond Parti 1.2.2. F'każ ta' konferma ta' l-ISA skond Parti 1.3, iż-żona ta' kontroll temporanju għandha tkun mibdula f'żona ta' kontroll.

1.5.4. Żoni ta' sorveljanza stabbiliti ma jistgħux ikunu rrevokati qabel sentejn mir-revoka taż-żona ta' kontroll.

1.6. *Sorveljanza uffiċjali wara suspett jew konferma ta' l-ISA*

1.6.1. B'referenza għall-Artikolu 5(2) u 6 tad-Direttiva 93/53/KEE u sabiex tkun stabbilita d-distribuzzjoni u l-evoluzzjoni tal-marda wara suspett jew konferma ta' l-ISA f'post fejn jitrabba l-hut, programm ta' sorveljanza uffiċjali bbażat fuq riskju għandu jkun magħmul mill-awtorità kompetenti, jew minn servizzi kkwalfikati għas-saħħa tal-hut b'konsultazzjoni ma' u taħt il-kontroll ta' l-awtorità kompetenti, fuq il-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut li jinsabu fiż-żoni stabbiliti.

1.6.2. Bil-ghan li jkun applikat dan il-programm ta' sorveljanza uffiċjali, l-awtorità kompetenti għandha, jekk neċessarju, permezz ta' ispezjoni fuq il-post, tidentifika il-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut fiż-żoni stabbiliti u tagħmel ċensiment uffiċjali ta' l-ispeċi, kategoriji u numru ta' hut miżmum fil-postijiet fejn jitrabba l-hut, inklużi figuri ta' mortalita'.

1.6.3. Wara ċ-ċensiment uffiċjali inizjali, il-postijiet fejn jitrabba l-hut ġewwa żoni ta' kontroll temporanjament stabbiliti, li qed iżommu salamun Atlantiku (*Salmo salar*), jew kwalunkwe speċi oħra msemmija fl-edizzjoni l-aktar reċenti tal-kodiċi tas-sahha ta' l-animali akwatiċi bhala suxxettibbli għal jew li għandhom il-potenzal li jgħaddu l-ISA, għandhom jirrapurtaw il-mortalitajiet kull 14-il jum lill-awtorità kompetenti. Żieda fil-mortalità għandha tkun irrapurtata fuq bażi ta' kull ġurnata u kull gaġġa. L-awtorità kompetenti għandha tinvestiga kwalunkwe żieda sinifikanti ta' mortalità fil-post fejn jitrabba l-hut.

Jekk is-suspett ikun ikkonfermat, il-postijiet kollha fejn jitrabba l-hut fiż-żoni ta' kontroll stabbiliti għandhom jirrapurtaw kull ġimgha lill-awtorità kompetenti dwar il-mortalità, fuq bażi ta' kull gaġġa u kull ġurnata.

Postijiet fejn jitrabba l-hut f'żoni ta' sorveljanza għandhom jirrapurtaw mortalitajiet lill-awtorità kompetenti kull 14-il jum.

Barra dan, spezzjonijiet għandhom ikunu magħmula regolarment matul is-sena fiż-żoni stabbiliti u bi frekwenza kif hu espost fit-Tabella 1. Madanakollu, meta kondizzjonijiet klimatiċi irendu dawn l-ispezzjonijiet impossibbli matul parti mis-sena, l-Istati Membri jistgħu jistabbilixxu frekwenzi oħra ta' l-ispezzjonijiet fil-pjan komtingenti.

Tabella 1

Programm uffiċjali ta' sorveljanza

Lokalità tal-post fejn jitrabba l-hut	Numru minimu ta' spezzjonijiet fis-sena	Numru minimu ta' spezzjonijiet fis-sena wara li ż-żona ta' kontroll tkun irrevokata
Żona ta' kontroll	12	
Iż-żona ta' sorveljanza	6	6
Żona temporanja ta' kontroll	6	

Il-programm ta' sorveljanza għandu jkun magħmul sakemm iż-żoni jkunu revokati.

1.6.4. L-ispezzjonijiet, kif ukoll is-selezzjoni, il-kollezzjoni, il-preparazzjoni u l-ġarr ta' kampjuni fuq vapur, għandhom ikunu magħmula kif definit fil-Partijiet II.1 sa II.4. L-eżaminazzjoni ta' kampjuni għandha tkun skond il-Partijiet III sa VI.

II. Spezzjoni u teħid ta' kampjuni

II.1. Spezzjoni, selezzjoni u kollezzjoni ta' kampjuni ġewwa post fejn jitrabba l-hut fejn il-preżenza ta' l-ISA hija ssuspettata

II.1.1. Fl-ispezzjonijiet regolari magħmula fil-qafas tal-programm ta' sorveljanza uffiċjali espost fil-Parti I.6, u ġewwa postijiet fejn jitrabba l-hut li huma ssuspettati li huma infettati bl-ISA, il-faċilitajiet kollha tal-post fejn jitrabba l-hut (gaġġ, tankijiet jew għadajjar) għandhom ikunu spezzjonati għall-preżenza ta' hut mejta, dgħajfa jew li qed jaġixxu b'mod abnormali. Fejn hu possibbli, mortalitajiet reċenti (mhux dikomposti), u hut dgħajfa jew hut li qed jaġixxu b'mod anormali għandhom ikunu eżaminati għal sinjali kliniċi jew sejbiet ta' wara l-mewt ta' l-ISA kif deskritt fl-edizzjoni preżenti tal-manwal Dijanjostiku ta' l-OIE għall-mard ta' animali akwatiċi.

II.1.2. Jekk sinjali kliniċi reċenti konsistenti ma' l-ISA huma osservati, jew spettur jew veterinarju għandu kwalunkwe raġuni li jissuspetta li hut jista' jkun infettat, minimu ta' għaxar ħutiet għandhom ikunu mehuda bhala kampjun. Il-kampjun għandu jkun magħmul minn mortalitajiet reċenti u hut dgħajfa jew li qed jaġixxu b'mod anormali fejn hu possibbli. Jekk ma hemmx numri suffiċjenti ta' hut affettwat klinikament, in-numri fil-kampjun għandhom ikunu mizjuda b'ħut b'sahħtu selezzjonat mill-gaġġ, tankijiet jew għadajjar li juru l-ogħla numru ta' mortalitajiet jew hut li juri sinjali kliniċi ta' mard.

II.1.3. Jekk mortalitajiet reċenti jew hut dgħajfa jew li qed jaġixxu b'mod abnormali huma osservati, iżda s-sinjali kliniċi u sejbiet ta' wara l-mewt ma humiex konsistenti ma' l-ISA, it-teħid ta' kampjuni ma huwiex obbligatorju, għalkemm kampjuni li jkunu meħtieġa sabiex tkun magħmula dijanjosi differenzjali jistgħu jkunu mehuda fid-diskrezzjoni ta' l-ispettur jew tal-veterinarju.

II.1.4. Fejn hut mill-ambjent naturali tiegħu huwa ssuspettat li hu infettat bl-ISA, l-Istati Membri għandhom jiżguraw li kampjuni approprjati jkunu mehuda u eżaminati permezz ta' metodi kliniċi approprjati u metodi laboratorji kif stabbiliti fil-Partijiet II sa VI sabiex tkun eskluża jew ikkonfermata l-preżenza ta' l-ISA u biex ikun stimat jekk l-okkorrenza tal-marda tippreżenta theddida sinifikattiva għall-hut imrobbi.

II.2. Preparazzjoni ta' kampjuni minn hut

II.2.1. Kampjuni għall-eżami istoloġiku għandhom ikunu mehuda biss minn hut li għadu kif ikun maqtul li juri sinjali kliniċi jew sejbiet ta' wara l-mewt konsistenti mal-preżenza tal-marda. Kwalunkwe leżjonijiet esterni jew interni għandhom ikunu mehuda bhala kampjuni u fi kwalunkwe każ kampjuni tal-fwied, min-nofs il-kilwa, tal-qalb u tal-milsa għandhom ikunu mnehhija mill-huta individwali bl-użu ta' skarpell u trasferiti go 8 sa 10 % (vol/vol) formol mielah ibbafferjat. Il-proporzjon ta' sustanza li twaħhal għat-tessuti għandu jkun ta' lanqas 20:1 biex tkun żgurata l-preservazzjoni sodisfacenti tat-tessuti.

II.2.2. Tessuti għall-eżaminazzjoni viroloġika għandhom jittiehdu mill-hut kollu li jkun mehud bhala kampjun. Kampjuni doppji għandhom jittiehdu għal skopijiet korroborattivi. Biċċiet tal-fwied, tal-kilwa anterjuri, tal-qalb u tal-milsa għandhom ikunu mnehhija bl-użu ta' instrument sterilizzat u trasferiti ġewwa tubi tal-plastik, li jikkontjenu 9 ml soluzzjoni ta' trasport, i.e. kultura ċellolari medja b'antibijotiċi. Tagħqid ta' 12,5 µg ml⁻¹ *fungizone*, 200 IU ml⁻¹ *polymixin B*, u 200 µg ml⁻¹ *kanamycin* huwa xieraq imma tagħqid ieħor ta' effikaċja ppruvata jistgħu jkunu użati. Tessuti minn mhux aktar minn hames ħutiet jistgħu jkunu miġbura ftubu wiehed li jkkontjeni soluzzjoni ta' trasport u jirrapreżentaw kampjun wiehed ippuljat. Il-piż tat-tessuti f'kampjun wiehed għandu jkun 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3. Marki tal-kliewi għandhom jittiehdu għall-eżami tal-IFAT minn hut li jkun għadu kif inqatel biss, i.e. fi zmien sagħtejn mill-mewt. Biċċa min-nofs il-kilwa għandha tkun imnehhija mill-hut bl-użu ta' strumenti sterilizzati. It-tessut għandu jkun ixxugat fuq karta li tassorbi biex ikun imneħhi l-eċċess ta' demm, imbagħad magħfus repetutament ma' slajd tal-ħġieg miksija bil *poly-L-lysine*. Il-marki individwali għandhom ikunu hdejn xulxin, iżda mhux imrikkba, biex jagħtu saff wiehed kontinwu ta' ċelloli. Fluwidu ta' demm u tessuti ma humiex materjal rilevanti għal dan l-eżami. It-thallija tal-kampjun tal-kliewi biex jiskula fuq karta li tassorbi għandu jkun evitat għax dan jista' jirriżulta f'embolu li jikkawza d-depożitu ta' ammonti kbar ta' proteini tas-serum fuq is-sajd ta' l-eżami. Il-marki għandhom ikunu mnixxa bl-arja mbagħad miżmuma keshin u xotti jekk ma humiex ser ikunu mwahhlin immedjatament. It-twaħhil tal-marki għandu jkun magħmul fi 72 sghat minn meta l-hut kien mehud għall-kampjun. Alternattivament, il-marki jistgħu jkunu ffrizati wara jkunu mnixxa bl-arja u merfugha għal mhux aktar minn xaxar f'20 °C qabel it-twaħhil.

II.2.4. Hut li juri sinjali ta' anemija jistgħu jkunu storduti u kampjuni ta' demm eparinizzati jistgħu jkunu mehuda immedjatament għall-eżami ematoloġiku, bħal ma huwa l-miżurazzjoni ta' l-ematokrit.

II.2.5. Tessut għall-analiżi ta' RT-PCR għandu jittiehed mill-hut kollu mehud bhala kampjun. Biċċa mill-antjerjuri jew minn nofs il-kilwa għandha tkun imnehhija mill-hut bl-użu ta' strument sterili u trasferiti ftubu mikro-fuge li jkkontjeni 1 ml RNA soluzzjoni preservattiva ta' effikaċja ppruvata. Tessut minn mhux aktar minn hames ħutiet jistgħu jkunu miġbura ftubu wiehed ta' soluzzjoni preservattiva u jirrapreżenta kampjun wiehed ippuljat. Il-piż ta' tessut f'kampjun wiehed għandu jkun approssimattivament ta' 0,5 g. Meta l-hut huwa żgħir wisq sabiex jinkiseb kampjun tal-piż neċessarju, biċċiet mill-kilwa, mill-qalb, mill-milsa, mill-fwied jew mill-*pyloric caeca* jistgħu jkunu mehuda, f'dak l-ordni ta' preferenza, sabiex jintlaħaq 0,5 g.

II.3. Ġarr fuq vapuri ta' kampjuni mill-hut

II.3.1. Kampjuni ta' demm u tubi li jkkontjenu tessuti tal-hut għall-eżami viroloġiku jew analiżi ta' RT-PCR għandhom ikunu mqieghda f'kontenituri iżolati (bħal per eżempju kaxxa hoxnin tal-polisterin) flimkien ma' silġ suffiċjenti jew "blokki tal-friza" biex ikun żgurat tkessih tal-kampjuni waqt it-trasportazzjoni għal-laboratorju. L-iffriżar għandu jkun evitat u silġ għad għandu jkun preżenti fil-kaxxa tat-trasport mal-wasla jew wahda jew aktar mill-"blokki tal-friza" għad għandha tkun parzjalment jew kompletament iffriżata. F'ċirkostanzi eċċezzjonali kampjuni ta' RT-PCR u kampjuni għall-eżami viroloġiku jistgħu jkunu *snap-frozen* u trasportati sal-laboratorju f'20 °C jew anqas.

II.3.2. Slajds għall-IFAT għandhom ikunu mġarra bil-vapuri ġewwa detenturi ta' l-isajds b'desikkant suffiċjenti sabiex il-marki jinżammu xotti u mkessha bħal kif imsemmi hawn fuq.

II.3.3. Jekk tessuti tal-hut ikunu trasportati ġewwa sustanza li twaħhal għall-eżami istoloġiku għandhom ikunu mġarra bil-vapuri ftubi li ma johroġ xejn minnhom li jkunu jinsabu f'kontenituri rezistenti għall-impatt, bħal kaxxi hoxnin tal-polisterin.

- II.3.4. Sakemm kampjuni ikunu ġew iffriżati, l-eżami viroloġiku għandu jkun mibdi mill-aktar fiss possibbli u mhux aktar tard minn 72 siegħa wara il-ġbir tal-kampjuni. Il-kampjun għall-analiżi korroborattiva għandu jkun merfugħ f' 20 °C jew anqas mal-wasla fil-laboratorju.
- II.3.5. Hut shiħ jista' jkun trasportat għal-laboratorju jekk ir-rekwiziti tat-temperatura waqt it-trasport, kif deskritti fi II.3.1, jistgħu jkunu sodisfatti. Hut shiħ għandu jkun imgeżwer f'karti li jassorbu u mġorrija bil-vapuri ġewwa baskett tal-plastik, imkessaħ kif menzjonat akter 'il fuq.
- II.3.6. Hut haġ jista' jkun ukoll imġorr bil-vapuri imma dan jista' jsir biss taħt is-sorveljanza tas-servizz uffiċjali.
- II.3.7. Għall-analiżi ta' RT-PCR tat-tessuti ppreżervati ġewwa RNAlater, it-tnehhija ta' RNA għall-kampjuni merfugħa f'temperaturi differenti għandha tkun magħmula f'ċertu perjodu ta' żmien. Dawn il-hinijiet huma mogħtija kif ġej:
- | | |
|---------|------------------|
| — 37 °C | ġurnata |
| — 25 °C | ġimgħa |
| — 4 °C | xahar |
| — 20 °C | indefinitivament |
- II.3.8. L-ippakkettjar kollu u l-ittikkettjar għandu jkun magħmul skond regolamenti preżenti tat-trasport nazzjonali u internazzjonali kif xieraq.

II.4. Ġbir ta' materjal dijanjostiku supplimentari

Bil-ftehim tal-laboratorju dijanjostiku, tessuti oħra ta' hut jistgħu jkunu miġbura u ppreparati għall-eżami supplimentari.

III. Eżami viroloġiku

III.1. Preparazzjoni ta' kampjuni

- III.1.1. Fejn iqumu diffikultajiet prattiċi li jirrendu impossibbli t-tilqim ta' ċelluli f'72 siegħa wara l-ġbir tal-kampjuni tat-tessuti, huwa aċċettat li t-tessut ikun iffriżat fi - 80 °C għall-28 ġurnata. It-tessut għandu jkun iffriżat u skonġelat darba waħda biss qabel l-eżami.
- III.1.2. Kull kampjun (gabra ta' tessut f'soluzzjoni ta' trasport) għandu jkun kompletament omoġenizzat bl-użu ta' *stomacher*, blender jew mehrież u lida, ċentrifugat f'2000 ta' 4000 x g għal 15-il minuta f'0 sa 6 °C, u is-sustanza li tghum fil-wiċċ għandha tkun iffiltrata (0,45 µm) u inkubata ma' volum ugwali ta' gabra ta' anti-sera mghammda b'mod xieraq ma' serotipi indigeni ta' IPNV. It-titre ta' l-antiserum għandu jkun mhux anqas minn 1:2000 ġewwa 50 % tat-test tan-newtralizzazzjoni tal-plakka. It-tahlita għandha tkun inkubata għal siegħa fi 15 °C. Dan jirrapreżenta s-sustanza wżata għat-tilqim.

Trattament tas-sustanzi kollha użati għat-tilqim bl-antiserum għal vajrus ta' l-IPN (vajrus li f'ċertu partijiet ta' l-Ewropa jseħh f'50 % tal-kampjuni ta' hut) bil-ghan li jipprevjeni CPE kawżat mill-vajrus ta' l-IPN milli jiżviluppa ġewwa kulturi ta' ċelluli mlaqqma. Dan għandu jnaqqas it-tul tal-eżami viroloġiku kif ukoll in-numru ta' kazijiet fejn is-seħh ta' CPE ikollha tkun ikkunsidarta bhala potenzjalment indikattiva ta' ISAV.

Meta kampjuni jkunu ġejjin minn unitajiet tal-produzzjoni li huma kkunsidrati hielsa minn IPN, trattament tas-sustanzi użati għat-tilqim bl-antiserum lil vajrus ta' l-IPN jistgħu jkunu esklużi.

III.2. Tilqim ta' kulturi ta' ċelluli

- III.2.1. Ċelluli SHK-1 (wara t-80 jew anqas) jew ċelloli TO għandhom ikunu mkabbru ġewwa L-15 medju li jikkontjeni 5 % serum tal-fetu ta' l-ifrat, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin, u 0,08 % (v/v) 50 mM 2-*mercaptoetanol* ġewwa 12- jew 24- platti tal-ġabriet. Linji oħra ta' ċelluli ta' effettività u sensitività ppruvata fl-iżolazzjoni ta' ISAV jistgħu jkunu użati, u tkun mehuda kunsiderazzjoni tal-varjabilità tat-tensjoni molekulari u l-abilità ta' diversi tensjonijiet li jirreplikaw f'linji ta' ċelluli differenti. Sospensjoni ta' l-organu trattat bl-antiserum għandu jkun imlaqqam ġewwa kulturi ta' ċelluli żgħar u li qegħdin attivament jikbru sabiex jagħtu dilwit finali tal-materjal tat-tessut għal kultura medja ta' 1:1000. Għal kull sospensjoni ta' organu 40 µl ta' sustanza użata għat-tilqim għandha tkun miżjuda ma' gabra waħda li tikkontjeni 2 ml ta' kultura medja. Sabiex ikun minimizzat ir-riskju ta' kontaminazzjoni trasversali huwa rrikommandat li 12- jew 24- platti separate tal-ġabriet ikunu intużati għal kampjuni minn postijiet differenti fejn jitrabba l-hut.

III.2.2. Platt wiehed għandu jinżamm mhux imlaqqam biex iservi bhala kontroll negattiv. Platt separat għandu jkun imlaqqam b'izolanti referenti ta' l-ISAV bhala kontroll pożittiv, kif ġej. Mija ul tal-preparat mażun ta' l-ISAV (titre minimu ta' 107 TCID₅₀ ml⁻¹) għandu jkun imlaqqam fl-ewwel gabra u mhallat sew. Volum ta' dan il-materjal għandu jkun trasferit mill-ewwel gabra għat-tieni gabra biex jintlaħaq 1:10 tas-sustanza dilwita u mhallta sew. Dan għandu jkun ripetut tul il-platt sabiex ikunu magħmula sitt sustanzi dilwiti għal għaxar darbiet. Hażniet ta' l-ISAV jistgħu jkunu merfugħa fi 80 °C għal mill-inqas sentejn imma minn meta jkunu skongelati għandhom ikunu użati fi tliet ijiem. Nota: attenzjoni għandha tkun mehuda sabiex, a jithallix kontaminazzjoni trasversali ta' platti għall-eżami b'materjal ta' kontroll pożittiv. Sabiex ikun evitat dan ir-riskju kontrolli pożittivi għandhom ikunu stabbiliti u ittrattati separatament mill-platti għall-eżami.

III.2.3. Kampjuni għandhom ikunu inkubati f'14 ± 2 °C għal hmistax-il ġurnata.

III.3. Mikroskopija

Bl-użu ta' mikroskopju, kulturi ta' ċelluli għandhom ikunu eżaminati għal CPE darbtejn, bejn hamsa u sebgha u 12 sa 14-il ġurnata wara it-tilqim. Jekk xi gabra turi CPE, proċeduri ta' identifikazzjoni tal-vajrus għandhom ikunu mibdija immedjatament (III.6). Jekk ebda CPE ma tkun osservata sal-ġurnata 14, eżami ta' hemassorbentazzjoni (III.4) għandu jkun esegwit.

III.4. Hemassorbentazzjoni

Replikazzjoni ta' ISAV f'kulturi ta' ċelluli ma tirriżultax dejjem f'CPE. Għalhekk, kull gabra għandha tkun sugġetta għall-eżami ta' hemassorbentazzjoni kif deskritt afkar 'l isfel, jew inkella, kull gabra għandha tkun sugġetta għall-eżami IF kif deskritt III.6.1.

III.4.1. Kulturi ta' ċelluli medja għandhom ikunu mnehhija minn kull gabra, inklużi dawk ta' kontrolli pożittivi u negattivi, u mpoġġija ftubi sterili mmarkati. Hames mija ul ta' 0,2 % (v/v) sospensjoni ta' ċelluli tad-demmi homor maħsula tal-fenek jew taz-ziemel, jew 0,05 % (v/v) sospensjoni ta' ċelluli tad-demmi homor maħsula ta' *rainbow trout* jew tas-salamun Atlantiku, għandhom ikunu miżjuda ma' kull gabra u inkubati fit-temperatura tal-kamra għal 45 minuta. Iċ-ċelluli tad-demmi homor għandhom ikunu mnehhija u kull waħda maħsula għal darbtejn bil-L-15 *medium*. Kull gabra għandha tkun eżaminata bl-użu ta' mikroskopju.

III.4.2. Il-preżenza ta' għenieqed ta' ċelluli tad-demmi homor li jmissu mal-wiċċ ta' SHK-1 jew taċ-ċelluli TO għandha tkun indikattiva ta' infezzjoni preżunta b'ortomixovajrus. Jekk eżami ta' hemassorbentazzjoni huwa pożittiv eżami ta' identifikazzjoni tal-vajrus għandu jkun esegwit immedjatament (III.6).

III.5. Subkultivazzjoni jew passagg

III.5.1. Subkultivazzjoni għandha tkun magħmula bejn il-ġranet 13 sa 15. Mitejn u hamsa u għoxrin ul ta' kultura tas-sustanza li tghum fil-wiċċ għandha tkun miżjuda mal-ġabriet li jikkontjenu ċelluli SHK-1 godda li jikbru attivament ġewwa 12- platti tal-ġabriet u inkubati f'14 ± 2 °C għal 18-il ġurnata. Bl-użu ta' mikroskopju, kulturi ta' ċelluli għandhom ikunu eżaminati għal CPE darbtejn, bejn il-ġranet hamsa u sebgha u 14 sa 18 wara t-tilqim. Jekk xi gabra turi CPE, proċeduri ta' identifikazzjoni tal-vajrus għandhom ikunu miżjuda immedjatament (III.6). Jekk ebda CPE ma tkun osservata sal-ġranet 14 sa 18, eżami tal-hemassorbentazzjoni għandu jkun (III.4).

III.5.2. Jekk ċitotossicità issehh fl-ewwel sebat ijiem ta' inkubazzjoni, subkultivazzjoni għandha tkun esegwita f'dak l-istadju, u ċ-ċelluli għandhom ikunu nkubati għal 14 sa 18-il ġurnata u jergħu jkunu subkultivati b'14 sa 18-il ġurnata ohra ta' inkubazzjoni. Jekk ċitotossicità issehh wara sebat ijiem, subkultivazzjoni għandha tkun esegwita darba u ċ-ċelluli għandhom ikunu inkubati biex jintlaħaq it-total ta' 28 sa 36 ġurnata inkubazzjoni mill-inokulazzjoni primarja.

III.5.3. Jekk kontaminazzjoni batterjoloġika issehh fil-kultura primarja, l-eżami għandu jergħu jkun magħmul bl-użu tat-tessut omoġenat merfugħ fi - 80 °C. Qabel it-tilqim it-tessut omoġenat huwa ċentrifugat fi 4000 x g għal 30 minuta f'0 sa 6 °C u s-sustanza li tghum fil-wiċċ hija ffiltrata fi 0,22 µm. Jekk kontaminazzjoni batterjoloġika issehh waqt l-istadju tas-subkultivazzjoni s-sustanza lit għum fil-wiċċ għandha tkun iffiltrata fi 0,22 µm, imlaqqma ġewwa ċelluli godda u inkubata għal 14 sa 18-il ġurnata ohra.

III.6. Eżamijiet ta' identifikazzjoni tal-vajrus

Jekk evidenza ta' CPE hija osservata fi kwalunkwe stadju, jew jekk l-eżami ta' hemassorbentazzjoni huwa pożittiv, l-identifikazzjoni tal-vajrus tkun magħmula. Il-metodi ta' l-għażla għall-identifikazzjoni ta' l-ISAV huma IF (III.6.1) u RT-PCR (Parti IV). Jekk ikun ikkunsidrat li vajrusis oħra jistgħu jkunu preżenti huwa rikkomandat li eżamijiet supplimentarji ta' identifikazzjoni tal-vajrus ikunu magħmula. Jekk dawn l-eżamijiet ma jkunux hallew l-identifikazzjoni definitiiva tal-vajrus f'gimgha, is-sustanza lit għum fil-wiċċ għandha tkun mogħtija lil laboratorju nazzjonali referenti jew lil-laboratorju referenti tal-mard tal-hut ta' l-UE għall-identifikazzjoni mmedjata.

III.6.1. IF

III.6.1.1. Ċelluli SHK-1 (sa 80 jew anqas) jew ċelluli TO cells għandhom ikunu mkabbra fi L-15 medja li jikkontjeni 5 % serum fetali ta' l-ifrat, 2 % (v/v) 200 mM L-glutamin u 0,08 % (v/v) 50 mM 2-mercaptoetanol ġewwa 24- jew 96- platti tal-gabriet u użati f'konfluenza ta' aktar minn 50 %. Linji ta' ċelluli oħra jew mezz ta' tkabbir ta' effikaċja ppruvata jistgħu wkoll jkunu ntuzati. Mitejn u hamsa u ghoxrin μ l ta' kultura ta' sustanza li tghum fil-wiċċ putattivament infettata bil-vajrus għandha tkun miżjuda ma' kull waħda minn żewġ gabriet, imhallta u 225 μ l ttrasferiti ġewwa żewġ gabriet oħra, i.e. dilwit ta' 1:5. Żewġ gabriet addizzjonali għandhom jibqgħu mhux imlaqqma biex jaġixxu bhala kontrolli. Kampjuni minn kull post fejn jitrabba l-hut għandhom ikunu trattati fuq platti separati, kif ukoll il-kontroll tal-vajrus. Kontroll tal-vajrus għandu jkun stabbilit bl-użu ta' iżolant referenti ta' l-ISAV.

III.6.1.2. Platti għandhom ikunu inkubati f'14 \pm 2 °C u eżaminati mikroskopament għal sebat ijiem. Meta CPE bikri huwa osservat, jew jekk ebda CPE ma jkun osservat f'sebat ijiem, il-pass li jmiss għandu jkun it-twahħil. Il-gabriet għandhom hawnhekk ikunu maħsula bil-PBS u mwahħla bl-inkubazzjoni ma 80 % aċetun għal 20 minuta f'temperatura tal-kamra. Platti għandhom ikunu mnixxa bl-arja u mtebba' immedjatament jew merfugħa f'0 sa 6 °C għal mhux aktar minn 24 siegħa qabel ma jkunu mtebba'.

III.6.1.3. Ġabriet replikati għandhom ikunu mtebba' bl-anti-korp prodott b'mod artifiċjali minn klona waħda 3H6F8 lil ISAV, jew anti-korp prodott minn klona waħda ieħor ta' effettività u specificità ppruvata, dilwit fi PBS u inkubat fi 37 \pm 4 °C għal 30 minuta. Anti-korp prodott b'mod artifiċjali minn klona waħda għandu jkun imneħhi u platti maħsula tliet darbiet bi 0,05 % Tween 20 fi PBS. Aċidu kontra l-ġrieden IgG FITC dilwit fi PBS għandu jkun mijud f'kull gabra u inkubat fi 37 \pm 4 °C għal 30 minuta. Nota: id-dilwit ta' gruppi differenti ta' anti-korp prodott b'mod artifiċjali minn klona waħda u aċidu FITC għandu jkun ottimizzati f'kull laboratorju. Anti-korp għandu jkun imneħhi u platti għandhom ikunu maħsula tliet darbiet bi 0,05 % Tween 20 fi PBS.

III.6.1.4. Ġabriet għandhom ikunu eżaminati immedjatament bl-użu ta' mikroskopju invertit mibni għall-mikroskopija fluworexxenti b'filtru xieraq għall-istimulazzjoni tal-FITC. Eżami jkun ikkunsidrat pożittiv jekk ċelluli fluworexxenti huma osservati. Biex eżami jkun validu l-kontrolli pożittivi għandhom jirriżutaw pożittivi u l-kontrolli negattivi għandhom jirriżultaw negattivi.

IV. Eżaminazzjoni tal-kampjuni bi RT-PCR

IV.1. *Din it-taqsima tiddekrivi l-proċeduri li huma rekwiżiti għall-amplifikazzjoni tal-PCR ta' parti tas-segment 8 tal-ġenomu ta' l-ISAV li jista' jkun magħmul fuq tessuti tal-hut jew ISAV f'kultura*

IV.1.1. RNA estradizzjoni

- RNA later huwa mneħhi minn kull kampjun. 1 ml ta' dH₂O trattat bi DEPC-għandu jkun miżjud f'kull tubu u tubi għandhom ikunu ċentrifugati fi 13000 rpm għal hames minuti fi 0 sa 6 °C.
- Is-sustanza li tghum fil-wiċċ għandha tkun imneħhija minn kull kampjun, 800 μ l TRIzol (Invitrogen), jew reagent alternattiv li hu ppruvat li hu ta' effikaċja indaqs jew akbar, għandu jkun miżjud ma' kull kampjun u tubu ta' kontroll li jikkontjeni materjal xieraq ta' kontroll (400 μ l dH₂O jew omoġenat tal-kliewi minn hut speċifikat hieles mill-patogenu). Jekk neċessarju, tessuti għandhom ikunu imharbta b'ippittetjar ripetut. Tubi għandhom ikunu inkubati f'temperatura tal-kamra għal hames minuti. 160 μ l kloroform għandu jkun miżjud f'kull tubu u tubi għandhom ikunu mhawda vigorozament għal tliet minuti, imbagħad ċentrifugati fi 13 000 rpm għal 15-il minuta fi 0 sa 6 °C.
- L-istrat milwiem ta' fuq għandu jkun imneħhi għal 1,5 ml tubu mikrofuġe mmarkat li jikkontjeni 500 μ l izopropanol u tubi għandhom ikunu inkubati għal għaxar minuti f'temperatura tal-kamra, imbagħad ċentrifugati fi 6500 rpm għal 15-il minuta fi 0 sa 6 °C.

- (d) Is-sustanza li tgħum fil-wiċċ għandha tkun imnehhija u 1 ml 75 % etanol mizjud mal-pritkuna RNA. Tubi imbagħad għandhom ikunu ċentrifugati fi 6500 rpm għal hames minuti f'0 sa 6 °C.
- (e) Is-sustanza li tgħum fil-wiċċ għandha tkun imnehhija u t-tubi mħollija miftuħa għal approssimattivament tliet minuti biex r-residwu ta' l-etanol jkun jista' jevapora. 15 µl ta' dH2O trattat bi DEPC għandu jkun mizjud biex tkun risospiza l-pritkuna, b'moviment brevi rotatorju jekk hu neċessarju.
- (f) Spettrofotometru għandu jkun intużat biex tkun ikkalkulata l-konċentrazzjoni tal-RNA u l-purità tal-kampjuni. Densitajiet Ottikali huma miżurati fi 260 u 280 nm.
- (g) RNA li għandha tkun intużata immedjatament (l-istess ġurnata), tista' tkun temporanjament merfugħa f'0 sa 6 °C. RNA li mhux intużata f'daqqa għandha tkun merfugħa fi - 80 °C.

IV.1.2. RT

- (a) Żewġ lg RNA għandhom ikunu dilwiti fi dH2O trattat bi DEPC fi 1,5 ml tubi mikrofuge. Fejn il-konċentrazzjoni tal-RNA ta' kampjun hija wisq baxxa biex thalli l-użu ta' 2 µg fir-reazzjoni ta' l-RT, l-ammont massimu li hu possibbli ta' RNA għandu jkun inkubat fi 55 sa 60 °C għal għaxar minuti.
- (b) Tubi li jikkontjenu RNA għandhom imbagħad ikunu mqieghda fuq silġ u reaġenti RT mizjuda biex jagħtu l-konċentrazzjonijiet finali ta' 1x baffer, 1mM dNTPs, 100 ng eżameri irregolari, impeditur 20 U RNase u 200 U MMLV-RT f'volum totali ta' 20 µl.
- (c) Tubi għandhom ikunu inkubati fi 37 °C għal siegħa.
- (d) cDNA għandha tkun merfugħa f'0 sa 6 °C sakemm mehtiegħ u għandha tkun intużata fi PCR mill-aktar fis possibbli.

IV.1.3. PCR

- (a) Hames µl cDNA għandhom ikunu mizjuda ma' tahlita ta' 45 µl PCR biex jagħtu l-konċentrazzjonijiet finali ta' 1x baffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM kull dNTP, 25 pmol kull prajmer u 1U Taq polimerejs. Primers huma ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-C-3') (forward primer) u ISA- (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (prajmer ta' wara). Kontrolli negattivi għall-estrazzjoni, l-istadji ta' RT u PCR għandhom ikunu nkluzi.
- (b) Tubi għandhom ikunu mqieghda ġewwa termociklun ipprogrammat fi 94 °C għal hames minuti seqwit minn 35 ċikli ta' 94 °C għal minuta, 55 °C għal minuta u 72 °C għal minuta b'inkubazzjoni finali ta' 72 °C għal hames minuti.
- (c) Riżultati tal-PCR għandhom ikunu stmata wara elektroforesi bl-użu ta' 2 % ġel agariku mtebba' bl-etidjum bromur u inkluzi sinjalatur tal-qies matul il-kampjuni u l-kontrolli negattivi mill-istadji tal-RT u tal-PCR. Prodott wiehed tal-PCR ta' 15 5bp għandu jkun ikkunsidrat indikattiv tal-preżenza ta' ISAV RNA. Kampjuni li jikkontjenu prodott wiehed addizzjonali, ta' 310bp, għandu wkoll ikun ikkunsidrat li jikkontjeni ISAV RNA. Kampjuni li jagħtu prodotti multipli ta' PCR, inkluzi mill-anqas wiehed ta' approssimattivament 155 bp, jistgħu jikkontjenu ISAV RNA. Dawn jistgħu jkunu investigati iktar bl-użu ta' sondi ta' DNA jew sekwenza ta' nukleotide.

IV.1.4. Konferma ta' PCR ta' l-izolazzjoni ta' l-ISAV f'kultura ta' tessut

Jekk CPE shih sehħ waqt eżami virologiku ta' kampjuni tart-tessuti f'ċelluli SHK-1, 400 µl tas-sustanza li tgħum fil-wiċċ għandha tkun imnehhija mill-gabra u mqieghda fi,5 ml tubu sterili. RNA għandha tkun estratta minn dan il-kampjun kif imsemmi fi III.1 u RT-PCR għandu jkun magħmul. Jekk kulturi mingħajr CPE shih huma intużati, is-sustanza li tgħum fi-wiċċ għandha tkun imnehhija, ċelluli għandhom ikunu mibruxa mill-wiċċ tal-gabra jew flixxkun u mqieghda fi 1,5 ml tubu sterili għall-estazzjoni tal-RNA u RT-PCR.

IV.1.5. Konferma ta' sonda ta' DNA ta' prodotti ta' PCR

- (a) L-ispeċifità ta' 155bp prodott ta' PCR tista' tkun stmata permezz ta' investigazzjoni b'oligonukleotide li tibrizizza lil reġjun tal-prodott tal-PCR, internament tal-prajmers. Prodotti ta' PCR għandhom ikunu suġġetti għall-elektroforesi fi 1 % ġel agariku matul senjalaturi tal-qies u kontrolli pożittivi u l-kontrolli negattivi mill-istadji ta' RT u PCR.

- (b) DNA għandu jkun ixxugat fin-Nofsinhar fuq membrana u l-*oligonucleotide* immarkat (5'-CGGGAGTTGATCAGACATGCACTGA AGGTG-3') għandu jkun inkubat mal-membrana wara passi approprijati qabel l-ibridizzazzjoni.
- (c) Sondi mhux marbuta u mhux speċifikament marbuta għandhom ikunu maħsula mill-membrana u sondi marbuta viżwalizzati.
- (d) Sondi marbuta ma' framment ta' 155 bp (u 310 bp jekk preżenti) għandhom ikunu evidenza ta' speċifità ta' PCR u jindika li ISAV RNA kienet preżenti fil-kampjun.

IV.1.6. Sekwenzi ta' *nucleotide* ta' prodotti ta' PCR

L-ispeċifità ta' PCR tista' tkun atmata bl-eżami tas-sekwenza tan-*nukleotide* ta' 155 bp ta' prodott ta' PCR.

- (a) Prodott ta' PCR għandu jkun ippurifikat minn ġel jew soluzzjoni agarika.
- (b) Il-framment għandu jkun sekwenzat bl-użu ta' l-istess prajmers li kienu wżati fil-PCR jew prajmers vektor jekk ikklonati f'vektor qabel is-sekwenza.
- (c) Is-sekwenza tan-*nukleotide* għandha tkun imqabbla ma' dawk għall-ISAV segment 8 disponibbli fil-bażi tad-data fis-sekwenza tan-*nukleotide* EMBL (numri ta' adeżjoni Y10404, AJ012285, AJ242016).
- (d) Preżenza ta' sekwenza li tikkorrispondi għal dik ta' l-ISAV segment 8 hija evidenza li l-kampjun kien jikkontjeni ISAV RNA.

V. Eżami ta' marki tal-kliewi bl-IFAT

V.1. Il-protokoll lo ġej ġie imwaqqaf għall-eżami ta' mark ital-kliewi bl-IFAT.

V.2. Preparazzjoni u ttebbar tal-marki

- V.2.1. L-islajds għandhom ikunu mwahhla fl-aċetun jew methanol/aċetun (1:1) għal tlett minuti u mnixxa bl-arja. Qabel ma tkun imtebba' kull slajd għandha tkun eżaminata u rġjuni approprijati ta' l-islajd għandhom ikunu ċirkoskritti b'pinna ImmEdgeTM, jew simili, u mhollija jinxfu bl-arja. L-islajds għandhom imbagħad ikunu mqieghda ġewwa soluzzjoni li twaqqaf (6 % halib xkumat fi PBS li jikkontjeni 0,25 Tween 20) u nkubati b'aġitazzjoni ġentili għal 30 minuta ftemperatura tal-kamra. Kull slajd għandha tkun ixxuttata u mqieghda orizzontalment f'kaxxa ta' l-islajds li tikkontjeni karta assorbenti imxarba biex tinzamm atmosfera umida.
- V.2.2. Kull marka għandha tkun mghottija b'soluzzjoni ta' anti-korp prodott minn klona waħda 3H6F8 lil ISAV (jew anti-korp ieħor ta' speċifità u effikaċja ppruvata) u l-kaxxa ta' l-islajd għandha tkun magħluqa u inkubata b'aġitazzjoni għal 60 minuta ftemperatura tal-kamra. L-anti-korp għandu mormalment ikun dilwit 1:10 sa 1:100 ġewwa 1 % halib xkumat imma huwa neċessarju li d-dilwit reali jkun iddeterminat għal kull grupp. L-islajds għandhom ikunu maħsula tliet darbiet għal żewġ minuti fi PBS li jikkontjeni 0,1 % Tween 20. Kull marka għandha tkun mogħttija b'soluzzjoni li tikkontjeni aċidu FITC mogħoż kontra l-ġrieden dilwit 1:1000 fi 1 % halib xkumat u nkubata f'ambjent umidu għal 60 minuta ftemperatura tal-kamra. L-islajds għandhom ikunu maħsula tliet darbiet għal żewġ minuti fi PBS li jikkontjeni 0,1 % Tween 20. Kull slajd għandha tkun mghottija b'soluzzjoni CITIFLUORTM (500 ul CITIFLUORTM mħallta bi 1,5 ml 0,1 % (v/v) Tween 20 fi PBS) jew mezz approprijat ieħor li jimmonta għal 10 minuti. L-islajds għandhom ikunu maħsula tliet darbiet fi PBA li jikkontjeni 0,1 % Tween 20. Jekk tebgha opposta hija meħtieġa, kull marka tista' tkun mogħttija bil-jodur tal-propidjum (0,01 mg/ml) fi PBS li jikkontjeni 0,1 % Tween 20 u nkubata għal tlett minuti ftemperatura tal-kamra. L-islajds għandhom ikunu maħsula tliet darbiet għal żewġ minuti fi PBS li jikkontjeni 0,1 % Tween 20. Slajds għandhom ikunu mbattla u mmuntati fi CITIFLUORTM jew mezz approprijat ieħor ta' l-immuntaġġ. Slajds għandhom ikunu merfugħa fid-dlam fi 4 °C qabel l-eżami mikroskopiku.

V.3. Eżami bl-użu ta' mikroskopija fluworexxenti

Kull slajd għandha tkun eżaminata fuq mikroskopju approprijat għall-illuminazzjoni epi-fluworexxenti, bl-użu ta' filter approprijat li jstimula FITC, u ġieghluh jarmi fluworexxenza hadra karratteristika. Is-sezzjonijiet kollha fir-riġjuni definiti bil-pinna ImmEdgeTM għandhom ikunu eżaminati taht objettiv x10 u x20 u żoni suspetti (dawk li juru fluworexxenza hadra) għandhom ikunu eżaminati taht objettiv x40 u illuminazzjoni fażi/fluworexxenti biex ikun żgurat li t-tbajja fluworexxenti huma assoċjati maċ-ċelluli. Il-kordinati ta' l-istadju għar-riġjuni suspetti għandhom ikunu rreġistrati għall-konferma aktar tard tan-natura tal-fluworexxenza minn eżaminatur sekondarju. Wara eżami mil-lezzur primarju l-islajds li huma pożittivi jew suspetti għandhom ikunu re-eżaminati mil-lezzur sekondarju u r-riżultati kkonfermati.

V.4. Kontrolli

- V.4.1. Tliet tipi ta' kontroll għandhom ikunu inkluzi ma' kull grupp ta' slajds imtebba' għall-IFAT:
- marka tal-kilwa minn salamun Atlantiku mhux infettat (kontroll negattiv),
 - kulturi ta' ċelluli SHK-1 li mhux infettati jew kulturi oħra ta' ċelluli suxxettibbli, (kontroll negattiv),
 - Kulturi ta' ċelluli SHK-1 infettati bl-ISAV jew kulturi ta' ċelluli oħra suxxettibbli (kontroll positivi).
- V.4.2. Jekk disponibbli, marka tal-kilwa minn Salamun Atlantiku nfettat bl-ISAV hija rakkomandata bħala kontroll pozitv addizzjonali.
- V.4.3. Jekk riżultat pozitv ikun miksub permezz ta' kwalunkwe kontroll negattiv l-eżami huwa kkunsidrat invalidu għall-islaids kollha f'dak il-grupp. Jekk l-islaids kollha f'dak il-grupp, inklusi l-kontrolli positivi, huma negattivi l-eżami huwa kkunsidrat invalidu għall-islaids kollha f'dak il-grupp. F'kazijiet fejn il-falliment tal-kontrolli tinvalida grupp ta' slajds, daww is-slaids għandhom ikunu mkissra u eżami ieħor għandu jkun magħmul bl-użu tal-marki duplikati.

V.5. Eżami ta' tessuti oħra

Din it-teknika tista' tkun applikata fuq tessuti oħra ta' ħut bħalma huma l-fwied, il-milsa u l-qalb li tipprovdi kwantità raġonevoli ta' ċelluli endotelji, lewkoċiti jew limfoċiti li jistgħu jkunu depożitati fuq is-slajd. ytes can be deposited on the slide. Il-proċedura tat-tbajja tibqa' l-istess għal kull tessut, iżda għal xi tessuti jista' jkun preferibbli li jkunu esklużi t-tbajja tal-jodur propidju bid-dipendenza fuq l-illuminazzjoni ffazijiet għall-identifikazzjoni tat-tipi ta' ċelluli preżenti fil-marka.

VI. ISTOLOĠIJA

Sezzjonijiet fil-paraffina għandhom ikunu maqtugħa fi 5 µm u mtebba' bl-użu ta' *hematoxilin* u eosina. Kambjamenti istoloġiċi assoċjati ma' l-ISA huma deskritti fl-edizzjoni kurrenti tal-manwal Dijanjostiku OIE għall-mard ta' annimali akkwatiċi.

VII. Akronimi u abbrevjazzjonijiet

cDNA	Āidu Deoxyribonuklejk Komplimentari
CPE	Effett ċitopatiku effect
DEPC	Dietylpyrokarbonat
dNTP	Deoxynukleotide trifosfat
FITC	Fluorescein isothiocyanate
IF	Immunofluworexxenza
IFAT	Eżami indirett ta' anti-korp fluworexxeti
OIE	Uffiċċju internazzjonali ta' l-epizoti
IPN(V)	Nekrosi pankraeatika infettiva (vajrus)
ISA(V)	Anemija infettiva tas-salamun (vajrus)
PBS	Soluzzjoni ta' ilma u melh ibbafferjata bil-fosfat
RNA	Āidu ribonuklejiku
RT-(PCR)	<i>Reverse transcriptase</i> (polimerejs mesnslin f'sekwenza molekulari)
SHK-1	Ĉ Ĉelluli tas-salamun tar-ras u tal-kliewi
TCID ₅₀	Doża ta' kultura tat-tessut infettiva fil-50 % punt ta' l-aħħar