

REGLUGERÐ

um sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir við greiningu og staðfestingu á fisksjúkdómunum brisdrepi, iðradrepi og veirublæði.

1. gr.

Gildissvið.

Reglugerð þessi gildir um sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir við greiningu og staðfestingu á fisksjúkdómunum brisdrepi (IPN), iðradrepi (IHN) og veirublæði (VHS) við ákvörðun um hvort uppfyllt séu skilyrði fyrir markaðssetningu eldisdýra og afurða þeirra innan Evrópska efnahagssvæðisins.

2. gr.

Yfirstjórn og eftirlit.

Opinber eftirlitsaðili, hérlendis yfirdýralæknir hefur yfirstjórn og eftirlit með framkvæmd þessarar reglugerðar sem skal vera í samræmi við meðfylgjandi viðauka.

3. gr.

Lagaheimild og gildistaka.

Reglugerð þessi er sett samkvæmt heimild í lögum nr. 76/1970 um lax- og silungsveiði, lögum nr. 54/1990 um innflutning dýra og lögum nr. 25/1993 um dýrasjúkdóma og varnir gegn þeim með síðari breytingum, sbr. bráðabirgðalög nr. 103/2003 og með hliðsjón af ákvörðun framkvæmdastjórnar Evrópubandalaganna nr. 2001/183/EB frá 22. febrúar 2001, sbr. ákvörðun sameiginlegu EES-nefndarinnar nr. 76/2002 frá 25. febrúar 2002. Reglugerð þessi öðlast gildi 21. júlí 2003.

Landbúnaðarráðuneytinu, 16. júlí 2003.

F. h. r.

Ólafur Friðriksson.

Sigríður Norðmann.

VIÐAUKI

Sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir við greiningu og staðfestingu á brisdrepi, veirublæði og iðradrepi.

INNGANGUR

Þessi viðauki:

- a) inniheldur viðmiðunarreglur og lágmarkskröfur um sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir við greiningu og staðfestingu á brisdrepi (IPN), veirublæði (VHS) og iðradrepi (IHN);
- b) samþættir ákvæði viðauka B og C við reglugerð nr. 526/2003 um skilyrði á sviði dýraheilbrigðis sem áhrif hafa á markaðssetningu eldisdýra og afurða þeirra að því er varðar viðurkenningu og viðhald á stöðu svæða og eldisstöðva á svæði sem ekki er viðurkennt;

- c) inniheldur ákvæði um rétta greiningu á brisdrepi, veirublæði og iðradrepi og opinbera viðurkenningu á stöðu svæða og eldisstöðva á svæði sem ekki er viðurkennt í samræmi við 5. og 6. gr. tilskipunar 91/67/EBE;¹⁾
- d) varðar bæði yfirvöld sem sjá um eftirlit með brisdrepi, veirublæði og iðradrepi og starfsfólk á rannsóknastofum sem sér um prófanir með tilliti til þessara sjúkdóma. Til samræmis við það er lögð áhersla á aðferðir við sýnatöku, meginreglur og framkvæmd rannsóknastofuprófana og mat á niðurstöðum þeirra sem og nákvæma rannsóknastofutækni. Þrátt fyrir það geta rannsóknastofur, ef við á, breytt þeim prófunum sem lýst er í þessum viðauka eða viðhaft aðrar prófanir, að því tilskildu að unnt sé að sýna fram á sambærilega næmni og sérhæfni.

¹⁾ Stjórnartíðindi EB, nr. L 46, 19.2.1991, bls. 10-11, sbr. og Stjórnartíðindi EB, nr. L 175, 19.7.1993, bls. 34-35.

I. hluti nær yfir sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir við eftirlit með brisdrepi, veirublæði og iðradrepi í því skyni að fá og viðhalda stöðu viðurkennds svæðis eða eldisstöðvar á svæði sem ekki er viðurkennt.

Í II. hluta er lýst aðferðum við greiningu til að staðfesta brisdrep, veirublæði og iðradrep leiki grunur á að sjúkdómurinn hafi komið upp.

Í III. hluta eru viðmiðanir og viðmiðunarreglur um opinbera áætlun um heilbrigðiskoðun, sem felst í því að skjalfesta að brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep hafi ekki komið upp áður.

Í IV. hluta eru tilmæli um aðferðir við VHS- og IHN-veirutítun til að sannprófa að frumurækt sé móttækileg fyrir sýkingu. Skrá yfir skammstafanir er að finna í V. hluta.

I. HLUTI

Sýnatökuáætlanir og greiningaraðferðir við eftirlit með brisdrepi, veirublæði og iðradrepi í því skyni að fá og viðhalda stöðu viðurkennds svæðis eða viðurkenndrar eldisstöðvar á svæði sem ekki er viðurkennt.

I. Skoðun og sýnataka.

1. *Almenn ákvæði um klínísku heilbrigðisskoðun, söfnun og val sýna í tengslum við eftirlit með svæðum eða eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt, með tilliti til þess að fá eða viðhalda viðurkenndri stöðu að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep.*

Í töflum 1A, 1B og 1C er samantekt á klínískri heilbrigðisskoðun og sýnatöku úr fiskvef og/eða hrognavökva, sem á að fara fram á svæðum eða eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt, með tilliti til þess að fá eða viðhalda viðurkenndri stöðu að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep í samræmi við viðauka B og viðauka C við reglugerð nr. 526/2003. Í I.I.2 - I.I.4. eru nánari upplýsingar þar að lútandi. Tafla 1A og tafla 1B eiga ekki við um nýjar eldisstöðvar og eldisstöðvar sem taka aftur upp starfsemi sína með fisk, egg eða svil frá viðurkenndu svæði eða viðurkenndri eldisstöð á svæði sem ekki er viðurkennt, að því tilskildu að þær fullnægi þeim kröfum sem mælt er fyrir um í viðauka C við reglugerð nr. 526/2003, a- eða b-lið 6. tölul. þáttar A í I. hluta eða a- eða b-lið 3. tölul. þáttar A í II. hluta.

Klínísk skoðun verður að fara fram á tímabilinu frá október og fram í júní eða þegar hitastig vatns er lægra en 14°C. Þegar klínísk skoðun eldisstöðva fer fram tvisvar á ári verða að líða að minnsta kosti fjórir mánuðir milli skoðana. Skoða skal allar framleiðslueiningar (tjarnir, tanka, netbúr o.s.frv.) og kanna hvort í þeim er dauður fiskur eða veikburða eða fiskur sem

hagar sér óeðlilega. Kanna skal sérstaklega vatnsfrárásarsvæðið þar sem veikburða fiskur hefur tilhneigingu til að safnast saman vegna vatnsstraumsins.

Velja skal fisk til sýnatöku sem hér segir:

- Ef regnbogasilungur er til staðar skal einungis velja þá fisktegund til sýnatöku. Ef ekki er um regnbogasilung að ræða skal sýnið vera úr öllum öðrum fisktegundum sem eru til staðar og eru móttækilegar fyrir brisdrepi, veirublæði og/eða iðradrepi (eins og tilgreint er í viðauka A við reglugerð nr. 526/2003. Sýnið skal gefa rétta mynd af hlutfalli tegundanna.
- Ef vatn úr fleiri en einni lind er notað við fiskframleiðslu skal velja fisk úr öllum vatnslindum til sýnatöku.
- Ef veikburða fiskur, fiskur sem hagar sér óeðlilega eða nýdauður fiskur (órotinn) er til staðar skal hann fyrst og fremst valinn. Ef slíkur fiskur er ekki til staðar skal heilbrigður fiskur, sem lítur eðlilega út, vera í úrtakinu sem safnað er með þeim hætti að það gefi hlutfallslega rétta mynd af öllum hlutum eldisstöðvarinnar og öllum árgöngum.

2. *Sérákvæði, þ.m.t. um söfnun sýna í tengslum við eftirlit með svæðum eða eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt, með tilliti til þess að fá eða viðhalda viðurkenndri stöðu að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep.*

1. Svæði eða eldisstöð á svæði sem ekki er viðurkennt, sem opinber eftirlitsaðili hefur eftirlit með, getur öðlast stöðu viðurkennds svæðis eða eldisstöðvar, annaðhvort samkvæmt:

a) Aðferð A - eftirlitsáætlun til tveggja ára.

Þegar liðin eru minnst tvö ár án þess að nokkur klínísk vísbending eða önnur vísbending hafi fundist um brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep verður að fara fram heilbrigðisskoðun að minnsta kosti tvisvar á ári í tvö ár á öllum eldisstöðvum á svæðinu eða á hverri eldisstöð sem á að viðurkenna á svæði sem ekki er viðurkennt. Á tveggja ára eftirlitstímabilinu, áður en viðurkennd staða hlotnast, má ekki finnast nein klínísk vísbending eða önnur vísbending um brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep og safna verður sýnum til rannsóknar í samræmi við töflu 1A. Enn fremur verður að velja, undirbúa og rannsaka sýnin eins og lýst er í I.I–I.IV og rannsóknir á rannsóknarstofu verða að hafa sýnt neikvæðar niðurstöður að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep; eða

b) Aðferð B - eftirlitsáætlun til tveggja ára með hlutasýni.

Í kjölfar opinberrar áætlunar um heilbrigðisskoðun, sem felst í því að skjalfesta að brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep hafi ekki komið upp í að minnsta kosti fjögur ár, verður að fara fram heilbrigðisskoðun að minnsta kosti tvisvar á ári í tvö ár á öllum eldisstöðvum á svæðinu eða á hverri eldisstöð sem á að viðurkenna á svæði sem ekki er viðurkennt. Á tveggja ára eftirlitstímabilinu, áður en viðurkennd staða hlotnast, má ekki finnast nein klínísk vísbending eða önnur vísbending um brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep og sýnum til rannsóknar verður að safna í samræmi við töflu 1B. Enn fremur verður að velja, undirbúa og rannsaka sýnin eins og lýst er í I.I–I.IV og rannsóknir á rannsóknarstofu verða að sýna neikvæðar niðurstöður að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep. Til þess að opinberir eftirlitsaðilar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep hafi ekki komið upp áður, verður hún að standast viðmiðanir og viðmiðunarreglur III. hluta.

2. Sérákvæði um að viðurkenna nýjar eldisstöðvar og eldisstöðvar sem taka aftur upp starfsemi sína með fisk, egg eða svil frá viðurkenndu svæði eða viðurkenndri eldisstöð á svæði sem ekki er viðurkennt.

Nýjar eldisstöðvar og eldisstöðvar, sem taka aftur upp starfsemi sína með fisk, egg eða svil frá viðurkenndu svæði eða viðurkenndri eldisstöð á svæði sem ekki er viðurkennt, geta öðlast stöðu viðurkenndrar eldisstöðvar í samræmi við kröfurnar í viðauka C við reglugerð nr. 526/2003, a- eða b-lið 6. tölul. þáttar A í I. hluta eða a- eða b-lið 3. tölul. þáttar A í II. hluta. Til samræmis við það eiga sýnatökuákvæðin, sbr. aðferð A og aðferð B hér að framan (í I.I.2.1.a og I.I.2.1.b), ekki við um slíkar eldisstöðvar.

3. Eftirlitsáætlun um viðhald viðurkenndrar stöðu að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep.

Til að viðhalda stöðu viðurkennds svæðis eða viðurkenndrar eldisstöðvar, á svæði sem ekki er viðurkennt að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep, verður skoðun og sýnataka að fara fram í samræmi við töflu 1C. Sýnin verður að velja, undirbúa og rannsaka eins og lýst er í I.I.–I.IV og rannsóknir á rannsóknastofu verða að hafa verið neikvæðar að því er varðar sjúkdómsvalda brisdreps, veirublæði og/eða iðradreps.

3. Undirbúningur og flutningur sýna úr fiski.

Hlutar þeirra líffæra sem rannsaka á eru fjarlægðir úr fiskinum með dauðhreinsuðum áhöldum, áður en þeir eru fluttir eða sendir til rannsóknastofu, og færðir yfir í dauðhreinsaðar plastpípur með flutningsefni, þ.e. frumuæti með 10% kálfasermi og sýklalyfjum. Unnt er að mæla með samsetningunni 200 a.e. penisillín, 200 µg streptomýsín og 200 µg kanamýsín í millílítra (ml) en einnig er heimilt að nota önnur sýklalyf með staðfesta virkni. Rannsaka skal vef úr milta, fremra nýra og að auki annaðhvort úr hjarta eða heila. Í sumum tilfellum verður að rannsaka hrognavökva (tafla 1A–C).

Heimilt er að safna hrognavökva eða líffærahlutum úr tíu fiskum hið mesta (töflur 1A–C) í eina dauðhreinsaða pípu, sem inniheldur að minnsta kosti 4 ml flutningsefnis, og mynda eitt hópssýni. Vefurinn í hverju sýni skal vega að minnsta kosti 0,5 grömm (g).

Pípurarnar skulu settar í einangruð ílát (t.d. pólýstýren-kassa með þykkum veggjum) ásamt nægum ís eða „ísklumpum“ til að tryggja kælingu sýnanna meðan á flutningi til rannsóknarstofu stendur. Varast ber að frysta sýnin. Hitastig sýnis skal aldrei fara yfir 10°C í flutningi og ís skal ennþá vera í flutningskassanum á viðtökustað eða einn eða fleiri ísklumpar verða þá enn að vera frosnir að hluta eða alveg.

Hefja skal veirufræðilega rannsókn eins fljótt og auðið er og ekki seinna en 48 klukkustundum eftir að sýnunum er safnað saman. Í undantekningartilvikum (1) er heimilt að hefja veirufræðilega rannsókn ekki seinna en 72 klukkustundum eftir að efninu, sem á að rannsaka, er safnað saman, að því tilskildu að það sé varið í flutningsefni og unnt sé að fullnægja kröfum um tiltekið hitastig í flutningi (3. liður í 1.1.3).

Senda má fisk í heilu lagi til rannsóknastofu ef unnt er að fullnægja kröfum um tiltekið hitastig í flutningi. Vefja má fisk í heilu lagi inn í rakadrægan pappír og senda síðan í plastpoka sem er kældur eins og áður er getið. Einnig er heimilt að senda lifandi fisk.

Öll pökkun og merking verður að vera í samræmi við núgildandi innlendar og alþjóðlegar flutningsreglur eftir því sem við á.

4. *Söfnun viðbótargreiningarefnis.*

Samkvæmt samkomulagi við þá rannsóknarstofu, sem annast greininguna, er einnig heimilt að safna öðrum fiskvefjum og undirbúa fyrir viðbótarrannsóknir.

II. Undirbúningur sýna fyrir veirufræðilega rannsókn.

1. *Frysting í undantekningartilvikum.*

Ef upp koma erfiðleikar í framkvæmd (t.d. slæm veðurskilyrði, lokunardagar, vandamál á rannsóknarstofu o.s.frv.) sem koma í veg fyrir að hægt sé að sá á frumur innan 48 klukkustunda frá því að vefjasýnin eru tekin er heimilt að frysta vefjasýnin í frumuæti við -20°C eða lægra hitastig og framkvæma veirufræðilegar rannsóknir innan 14 daga. Vefjasýnin er aðeins heimilt að þíða og endurnota einu sinni áður en rannsókn fer fram. Nauðsynlegt er að halda skrá með nákvæmum upplýsingum um ástæður fyrir hverri frystingu vefjasýna (óveður, dauðar frumulínur o.s.frv.).

2. *Jafnblöndun líffæra.*

Gera skal vefinn í pípunum fullkomlega einsleitun (annaðhvort með speldi eða kvörn eða með mortéli og stauti með dauðhreinsuðum sandi) og setja síðan í sviflausn í upphaflega flutningsefninu.

Ef sýnið er samsett úr heilum fiskum, sem eru undir 4 cm að lengd, skulu þeir brytjaðir smátt með dauðhreinsuðum klippum eða skurðarhníf eftir að bolurinn hefur verið fjarlægður aftan við þarmaop. Ef sýnið er samsett úr heilum fiskum, sem eru 4–6 cm að lengd, skal safna innflunum, þ.m.t. nýra. Ef sýnið er samsett úr heilum fiskum, sem eru yfir 6 cm að lengd, skal safna vefjasýnum eins og lýst er í I.I.3. Vefjasýnin skulu brytjuð smátt með dauðhreinsuðum klippum eða skurðarhníf, gerð einsleit eins og lýst hér að framan og sett í sviflausn í flutningsefninu.

Á rannsóknastofunni skal endanlegt hlutfall milli vefs og flutningsefnis fært að 1:10.

3. *Skiljun jafnings.*

Jafningurinn er skilinn í kældri skilvindu við $2-5^{\circ}\text{C}$ við 2000 til 4000 x g í 15 mínútur og flotinu safnað og það meðhöndlað, annaðhvort í fjórar klukkustundir við 15°C eða næturlangt við 4°C með sýklalyfjum, t.d. kann gentamísín, 1 mg/ml, að koma að notum á þessu stigi.

Hafi sýnið verið flutt í flutningsefni (þ.e. komist í snertingu við sýklalyf) má sleppa meðhöndlun flotsins með sýklalyfjum.

Markmiðið með sýklalyfjameðferð er að hafa stjórn á bakteríumengun í sýnunum og gerir hún að verkum að óþarft er að sía gegnum himnusúr.

Ef flotið, sem er safnað, er sett í geymslu við -80°C innan 48 klukkustunda eftir að sýnin voru tekin er aðeins heimilt að þíða það og endurnota einu sinni til veirufræðilegra rannsókna. (1) Í undantekningartilvikum, þ.e. þegar fiski er safnað á mjög afskekktum svæðum þar sem ekki er dagleg pósthjónusta.

Ef upp koma erfiðleikar í framkvæmd (t.d. hitaskápur bilar, erfiðleikar í frumuræktun o.s.frv.) sem koma í veg fyrir að hægt sé að sá á frumur innan 48 klukkustunda frá því að vefjasýnin eru tekin er heimilt að frysta flotið við -80°C og framkvæma veirufræðilegar rannsóknir innan 14 daga.

Áður en sáð er á frumurnar er flotinu blandað saman við sama magn af hæfilega þynntri blöndu af mótsermi gegn staðbundnum sermigerðum IPN-veiru og ræktað í þessu í að minnsta kosti eina klukkustund við 15°C eða mest 18 klukkustundir við 4°C. Títíri mótsermisins skal vera minnst 1/2000 í 50% mótefnaprófi sem hindrar skellumyndun.

Markmiðið með því að meðhöndla allt sáð með mótsermi gegn IPN-veiru (veira sem sums staðar í Evrópu kemur fyrir í 50% fisksýna) er að koma í veg fyrir að frumuskemmdir (CPE), sem stafa af IPN-veiru, myndist í frumurækt sem sáð hefur verið í. Þetta stýttir veirufraðilegu rannsóknina og fækkar þeim tilfellum þar sem telja verður tilkomu frumuskemmda hugsanlega vísbendingu um veirublæði eða iðradrep.

Þegar sýni koma frá framleiðslueiningum sem álitnar eru lausar við brisdrep (IPN) er heimilt að sleppa því að meðhöndla sáð með mótsermi gegn IPN-veiru.

III. Veirufraðileg rannsókn.

1. Frumurækt og æti.

BF-2- eða RTG-2- og annaðhvort EPC- eða FHM-frumur eru ræktaðar við 20–25°C í hentugu æti, t.d. Eagles- MEM (eða afbrigði af því) að viðbættum 10% af nautgripafóstursermi og sýklalyfjum með stöðluðum styrkleika.

Þegar frumurnar eru ræktaðar í lokuðum hettuglössum er mælt með því að sýrustig ætisins sé stillt með bíkARBónati. Heimilt er að stilla sýrustig ætisins, sem er notað við ræktun frumna í opnum einingum, með Tris- HCl (23 mM) og Na-bíkARBónati (6 mM). Sýrustig (pH) verður að vera $7,6 \pm 0,2$.

Frumurækt, sem nota á til að sá vefjarefni í, skal vera ný (4 til 48 klukkustunda gömul) og í góðum vexti (ekki samfellt frumulag) við sáningu.

2. Sáning í frumurækt.

Líffærasviflausn, meðhöndluð með sýklalyfjum, er sáð í frumurækt í tveimur þynningum, þ.e. frumþynningu og, að auki, 1:10 þynningu hennar, sem gefur endanlega þynningu vefjarefnis í frumuræktaræti sem er 1:100 og 1:1000 í hvoru tilviki um sig (til að koma í veg fyrir samstæða truflun). Sá skal að minnsta kosti í tvær frumulínur (sjá I. III.1). Hlutfallið milli sáðmagns og magns frumuræktarætis ætti að vera um 1:10. Fyrir hvora þynningu og frumulínu skal að minnsta kosti nota um 2 cm² frumusvæði sem svarar til eins bolla í 24 bolla frumuræktarbakka. Mælt er með því að nota frumuræktarbakka en aðrar einingar með álíka eða stærra ræktunarsvæði eru einnig nothæfar.

3. Frumurækt.

Frumurækt, sem sáð hefur verið í, er rækтуð við 15°C í sjö til tíu daga. Breytist litur frumuræktarætis úr rauðu í gult, sem bendir til súrnunar ætis, skal stilla sýrustigið með dauðhreinsaðri bíkARBónatlausn eða jafngildum efnum til að tryggja sé að frumur séu móttækilegar fyrir veirusýkingu.

Á að minnsta kosti sex mánaða fresti, eða þegar grunur leikur á um að frumur séu ekki lengur jafnmóttækilegar fyrir veirusýkingu, fer fram títrun frosinna IPNV-, VHSV- og IHNV-stofna til að sannprófa að frumurækt sé móttækileg fyrir sýkingu. Ráðlagðri aðferð er lýst í IV. hluta.

4. *Smásjárskoðun.*

Skoða skal reglulega (minnst þrisvar í viku) hvort frumuskemmdir koma fyrir í frumurækt, sem sáð hefur verið í, við um það bil fertugfalda stækkun. Séu greinileg merki um frumuskemmdir skal grípa strax til sanngreiningar veira samkvæmt aðferðinni í I.IV.

5. *Umsáning.*

Hafi engar frumuskemmdir orðið eftir frumræktun í sjö til tíu daga fer fram umsáning yfir á nýja frumurækt þar sem svipað frumusvæði er notað og í frumræktuninni.

Ætisskammtar (flot) úr hverri rækt eða bolla, sem mynda frumræktina, eru blandaðir eftir frumulínu sjö til tíu dögum eftir sáningu. Blöndunum er síðan sáð í samstæðar frumuræktir sem eru óþynntar eða þynntar 1:10 (sem gefur endanlega þynningu flots sem er 1:10 og 1:100 í hvoru tilviki um sig), eins og lýst er í I.III.2. Annar kostur er að sá skömmtum úr 10% af ætinu, sem myndar frumræktina, beint í bolla með nýrri frumurækt (umsáning frá bolla yfir í bolla). Heimilt er að forræktun þynntu vökvanna fari fram á undan sáningunni þar sem mótsermi gegn IPN-veiru er notað og hæfilega þynnt eins og lýst er í I.II.3.

Ræktir, sem sáð hefur verið í, eru því næst ræktaðar í sjö til tíu daga við 15°C undir eftirliti eins og lýst er í I.III.4. Komi fram frumuskemmd vegna eituráhrifa á fyrstu þremur dögum ræktunar getur umsáning farið fram á því stigi en þá skal rækta frumurnar í sjö daga og umsá þeim aftur sjö daga til viðbótar.

Komi fram frumuskemmd vegna eituráhrifa eftir þrjú daga er heimilt að umsá einu sinni og rækta uns alls 14 dagar eru liðnir frá frumsáningu. Síðustu sjö daga ræktunar skulu engin ummerki um eituráhrif koma í ljós.

Verði bakteríumengun þrátt fyrir meðhöndlun með sýklalyfjum verður skiljun við 2000 til 4000 × g í 15 til 30 mínútur við 2–5°C að eiga sér stað fyrir umsáningu og/eða síun flotsins gegnum 0,45 µm síu (vægt prótínbindandi himna). Þar að auki eru aðferðir við umsáningu þær sömu og út af frumuskemmdum vegna eituráhrifa.

IV. Sanngreining veira.

1. *Próf til að sanngreina veirur.*

Ef merki um frumuskemmdir hafa fundist í frumurækt er æti (floti) safnað og það rannsakað með einni eða fleiri af eftirtöldum aðferðum: hlutleysingu, flúrskinsmerkingu mótefna (IF), ELISA-prófi. Hafi prófin ekki leitt til öruggrar sanngreiningar veirunnar á einni viku skal senda flotið til innlestrar tilvísunarrannsóknarstofu í fisksjúkdómum eða til tilvísunar-rannsóknastofu Evrópusambandsins í fisksjúkdómum til skjótrar sanngreiningar.

2. *Hlutleysing.*

Fjarlægja ber frumur úr flotinu, sem var safnað, í skilvindu (2000 til 4000 × g) eða með himnusíun (0,45 µm) með vægt prótínbindandi himnu og þynna flotið með frumuæti í 1:100 og 1:10000.

Skammtar af báðum þynningum flotsins eru blandaðir og settir í ræktun í 60 mínútur við 15°C með jafnstórum hlutum af eftirtöldum prófunarefnum, hver í sínu lagi:

- sermi sem inniheldur hópsérhæft mótefni gegn VHS-veiru, þynnt í hlutfallinu 1:50 (rúmmálshlutfall) ⁽¹⁾

- sermi sem inniheldur hópsérhæft mótefni gegn IHN-veiru, þynnt í hlutfallinu 1:50 (rúmmálshlutfall) ⁽¹⁾
- blanda mótserra gegn staðbundnum sermigerðum IPN-veiru, þynnt í hlutfallinu 1:50 (rúmmálshlutfall) ⁽¹⁾
- einungis æti (jákvæður samanburður)

Úr hverri veiruflostermiblöndu er sáð í að minnsta kosti tvær frumuræktir með 50 µl í hvora um sig og þær síðan ræktaðar við 15°C. Fylgst er með því hvort frumuskemmdir verða eins og lýst er í I.III.4.

Sum afbrigði VHS-veiru bindast ekki í hlutleysingarprófum. Slík einangur verður að sanngreina með flúrskinsmerktum mótefnum (IF) eða ELISA-prófi.

Heimilt er að nota önnur hlutleysingarpróf sem reynsla er fyrir að skili árangri.

3. *Aðferð með notkun flúrskinsmerktra mótefna (IF).*

Fyrir hvert veirueinangur, sem á að sanngreina, skal setja frumur á að minnsta kosti átta þekjugler eða tilsvandi, svo þétt að það leiði til um 60–90% samfellu frumulags eftir 24 klukkustunda ræktun. Mælt er með EPC-frumum í þessu skyni vegna mikillar viðloðunar við glerfleti en einnig er hægt að nota aðrar frumulínur, t. d. BF-2, RTG-2 eða FHM.

Þegar frumurnar hafa sest á glerflötinn (um einni klukkustund seinna), eða þegar rækt hefur staðið yfir í allt að 24 klukkustundir, er veirunni, sem á að sanngreina, sáð. Sáð er í fjórar ræktir í rúmmálshlutfallinu 1:10 og fjórar ræktir í hlutfallinu 1:1000. Ræktun við 15°C stendur síðan yfir í 20 til 30 klukkustundir.

Eftir ræktun eru ræktirnar skolaðar tvisvar í Eagles-MEM án sermis, festar í 80% af ísköldu asetoni og síðan litaðar með tveggja-laga IFAT. Fyrri prófunarefnalagið er fjöl- eða einstofna mótefni sem stenst kröfur um viðmiðunargæði. Síðara prófunarefnalagið er flúrskinsmerkt mótsermi gegn því ónæmisglóbúlíni sem notað er í fyrri laginu. Fyrir hvert mótsermi, sem prófað er, skal lita að minnsta kosti eina rækt sem sáð hefur verið í með stórum skammti og eina með litlum skammti. Þekkt neikvæð og jákvæð viðmiðunarsýni skulu vera hluti af prófinu. Mælt er með FITC- eða TRITC-flúrskini.

Litaðar ræktir eru undirbúnar með glýserólsalti. Þær ber að skoða undir aðfallandi útfjólubláu ljósi. Notað er augngler með tífaldri eða tólfaldri stækkun og stækkunargler með tuttugu og fimm- eða fertugfaldri stækkun og samsvarandi talnaopum > 0,7 og > 1,3.

Framangreind aðferð með flúrskinsmerktum mótefnum er sett fram sem dæmi. Heimilt er að beita öðrum aðferðum með flúrskinsmerktum mótefnum (með tilliti til frumuræktar, festingar og mótefna sem standast kröfur um viðmiðunargæði) sem reynst hafa skilað árangri.

(1) Eða eins og viðkomandi tilvísunarrannsóknarstofa tilgreinir með tilliti til hugsanlegra eiturrhifa mótserra á frumur.

4. *ELISA-próf.*

Bollar í míkrotítunarplötum eru þaktir næturlangt með ráðlögðum þynningum af hreinsuðum ónæmisglóbúlínþáttum mótefna sem standast kröfur um viðmiðunargæði.

Eftir að bollar hafa verið skolaðir með PBS-Tween-20 jafnalausn er þeirri veiru sem sanngreina á bætt í bollana, þynntri tvisvar eða fjórum sinnum, og leyft að bindast við húðunarefnið í 60 mínútur við 37°C. Eftir skolun með PBS-Tween-20 jafnalausn er bíótínúðum mótefnum, með sérhæfni sem svarar til sérhæfni húðunarefnanna, bætt við og leyft að bindast

í 60 mínútur við 20°C. Eftir aðra skolun, eins og að framan getur, er HRP-merktu streptaví-díni bætt við og leyft að bindast í eina klukkustund við 20°C. Eftir lokaskolun kemur bundið ensím í ljós með því að nota viðeigandi ELISA-ensímhvarfefni (OPD eða önnur).

Framangreind ELISA-aðferð, sem byggist á bítótín-avíðín, er sett fram sem dæmi. Þess í stað er heimilt að nota aðrar ELISA-aðferðir með staðfestri virkni.

TAFLA 1A

Skoðun og sýnatökuáætlun á svæðum og eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt, sem fer fram á tveggja ára eftirlitstímabili áður en viðurkennt staða fæst að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep.

(í samræmi við viðauka B og C við reglugerð nr. 526/2003 og ákvæði I. hluta þessa viðauka)

	Fjöldi klínískra skoðana á ári (tvö ár)	Fjöldi rannsóknarstofurannsókna á ári (tvö ár)	Rannsóknarstofurannsókn til að staðfesta tilvist veira ⁽¹⁾	
			Fjöldi fiska í vexti (Líffæri)	Seiðastofn: fjöldi fiska (Hrognavökvi)
Meginlandssvæði og eldisstöðvar á meginlandssvæði				
a) Eldisstöðvar með seiðastofn	2	3	120 (fyrsta skoðun) ⁽²⁾ 150 (önnur skoðun)	30 (fyrsta skoðun) ⁽³⁾ 0 (önnur skoðun)
b) Eldisstöðvar, einungis með seiðastofn	2	1	0	150 (fyrsta eða önnur skoðun) ⁽³⁾
c) Eldisstöðvar án seiðastofns	2	2	150 (fyrsta og önnur skoðun)	0
Strandsvæði og eldisstöðvar á strandsvæði				
a) Eldisstöðvar með seiðastofn	2	2	120 (fyrsta skoðun) 150 (önnur skoðun)	30 (fyrsta skoðun) ⁽³⁾ 0 (önnur skoðun)
b) Laxeldisstöðvar án seiðastofns	2	2	30 (fyrsta og önnur skoðun) ⁽⁴⁾	0
c) Eldisstöðvar, sem ekki eru laxeldisstöðvar, án seiðastofns	2	2	150 (fyrsta og önnur skoðun)	0
Hámarksfjöldi fiska í hverju hópsýni: 10				
(1) Einnig er heimilt að nota hlutasýni, sem er tilgreint í töflu 1 B, ef kröfunum sem er lýst í II.1, I.I.2.1.b og III er fullnægt.				
(2) Klínískar skoðanir.				
(3) Ef ekki er hægt í undantekningartilvikum að ná hrognavökva er heimilt að taka sýni úr líffærum þess í stað.				
(4) Sýnunum skal safnað í fyrsta lagi þremur vikum eftir að fiskur er fluttur úr ferskvatni í saltvatn.				

TAFLA 1B

Skoðun og sýnatökuáætlun, sem fer fram á tveggja ára eftirlitstímabili áður en viðurkennd staða fæst að því er varðar brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep, á svæðum og eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt en skjalfest er að brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep hafi ekki komið þar upp áður.

(í samræmi við viðauka B og C við reglugerð nr. 526/2003 og ákvæði I. og III. hluta þessa viðauka)

	Fjöldi klínískra skoðana á ári (tvö ár)	Fjöldi rannsóknarstofurannsóknna á ári (tvö ár)	Rannsóknarstofurannsókn til að staðfesta tilvist veira ⁽¹⁾	
			Fjöldi fiska í vexti (Líffæri)	Seiðastofn: fjöldi fiska (Hrognavökvi)
Meginlandssvæði og eldisstöðvar á meginlandssvæði				
a) Eldisstöðvar með seiðastofn	2	3	0 (fyrsta skoðun) ⁽¹⁾ 30 (önnur skoðun)	30 (fyrsta skoðun) ⁽²⁾ 0 (önnur skoðun)
b) Eldisstöðvar, einungis með seiðastofn	2	1	0	30 (fyrsta eða önnur skoðun) ⁽²⁾
c) Eldisstöðvar án seiðastofns	2	2	30 (fyrsta og önnur skoðun)	0
Strandsvæði og eldisstöðvar á strandsvæði				
a) Eldisstöðvar með seiðastofn	2	2	0 (fyrsta skoðun) 30 (önnur skoðun)	30 (fyrsta skoðun) ⁽²⁾ 0 (önnur skoðun)
b) Laxeldisstöðvar án seiðastofns	2	2	30 (fyrsta og önnur skoðun) ⁽³⁾	0
c) Eldisstöðvar, sem ekki eru laxeldisstöðvar, án seiðastofns	2	2	30 (fyrsta og önnur skoðun)	0
Hámarksfjöldi fiska í hverju hópsýni: 10				
(1) Klínískar skoðanir.				
(2) Ef ekki er hægt í undantekningartilvikum að ná hrognavökva er heimilt að taka sýni úr líffærum þess í stað.				
(3) Sýnunum skal safnað í fyrsta lagi þremur vikum eftir að fiskur er fluttur úr ferskvatni í saltvatn.				

TAFLA 1C
**Skoðun og sýnatökuáætlun á svæðum og eldisstöðvum á svæði sem ekki er
viðurkennt í því skyni að viðhalda viðurkenndri stöðu að því er varðar
brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep.**

(í samræmi við viðauka B og C við reglugerð nr. 526/2003 og ákvæði I. hluta þessa viðauka)

	Fjöldi klínískra skoðana á ári	Rannsóknarstofurannsókn til að staðfesta tilvist veira ⁽¹⁾	
		Fjöldi fiska í vexti (Líffæri)	Seiðastofn: fjöldi fiska (Hrognavökvi)
Meginlandssvæði og eldisstöðvar á meginlandssvæði			
a) Eldisstöðvar með seiðastofn	2	20 (fyrsta eða önnur skoðun)	10 (fyrsta eða önnur skoðun) ⁽²⁾
b) Eldisstöðvar, einungis með seiðastofn	2	0	30 (fyrsta eða önnur skoðun) ⁽²⁾
c) Eldisstöðvar án seiðastofns	2	30	0
Strandsvæði og eldisstöðvar á strandsvæði			
a) Eldisstöðvar með seiðastofn	2	20 (fyrsta eða önnur skoðun)	10 (fyrsta eða önnur skoðun) ⁽²⁾
b) Laxeldisstöðvar án seiðastofns	1	30 ⁽³⁾	0
Hámarksfjöldi fiska í hverju hópsýni: 10			
(1) Á viðurkenndum svæðum skal aðeins safna sýnum frá helmingi fiskeldisstöðva á svæðinu til skiptis ár hvert. Á viðurkenndum eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt skal safna sýnum ár hvert.			
(2) Ef ekki er hægt í undantekningartilvikum að ná hrognavökva er heimilt að taka sýni úr líffærum þess í stað.			
(3) Sýnunum skal safnað í fyrsta lagi þremur vikum eftir að fiskur er fluttur úr ferskvatni í saltvatn.			

II. HLUTI

Aðferðir við greiningu til að staðfesta brisdrep, veirublæði og iðradrep leiki grunur á að sjúkdómurinn hafi komið upp.

Greina skal brisdrep, veirublæði og iðradrep með einni af eftirfarandi aðferðum:

- A. hefðbundinni veirueinangrun þar sem sanngreining veira með mótefnum fylgir í kjölfarið,
- B. veirueinangrun samtímis sanngreiningu veira með mótefnum,
- C. öðrum greiningaraðferðum (IFAT, ELISA).

Fyrstu greiningu á brisdrepi, veirublæði og/eða iðradrepi í eldisstöðvum á viðurkenndum svæðum skal ekki byggja á aðferð C einvörðungu. Einnig skal nota aðferð A eða B.

Í sumum tilvikum kann að reynast nauðsynlegt að vefjarefni, sem er ætlað til veirufræðilegra rannsókna, fylgi viðbótarefni til gerlafræðilegra, sníklafræðilegra, vefjafræðilegra eða annarra rannsókna svo unnt sé að framkvæma samanburðargreiningu.

A. Hefðbundin veirueinangrun þar sem sanngreining veira með mótefnum fylgir í kjölfarið.

- I.1. *Sýni valið.*
Velja skal að minnsta kosti 10 fiska til rannsóknar með dæmigerð einkenni brisdreps, veirublæðis eða iðradreps.
- I.2. *Undirbúningur og flutningur sýna úr fiski.*
Eins og mælt er fyrir um í I.I.3.
- I.3. *Söfnun viðbótargreiningarefnis.*
Eins og mælt er fyrir um í I.I.4.
- II. *Undirbúningur sýna fyrir veirufræðilega rannsókn.*
Eins og mælt er fyrir um í I.II.
- III. *Veirufræðileg rannsókn.*
Eins og mælt er fyrir um í I.III.
- IV. *Sanngreining veira.*
Eins og mælt er fyrir um í I.IV.

B. Veirueinangrun samtímis sanngreiningu veira með mótefnum.

- I.1. *Sýni valið.*
Eins og mælt er fyrir um í II.A.I.1.
- I.2. *Undirbúningur og flutningur sýna úr fiski.*
Eins og mælt er fyrir um í I.I.3.
- I.3. *Söfnun viðbótargreiningarefnis.*
Eins og mælt er fyrir um í I.I.4.
- II.1. *Jafnblöndun líffæra.*
Eins og mælt er fyrir um í I.II.2.
- II.2. *Skiljun jafnings.*
Jafningurinn er skilinn í kældri skilvindu við 2–5°C við 2000 til 4000 x g í 15 mínútur og flotinu safnað og það meðhöndlað í fjórar klukkustundir við 15°C með sýklalyfjum, t.d. gentamisíni, 1 mg/ml, eða síað (0,45 µm) gegnum vægt prótínbindandi himnu.
- II.3. *Meðferð flots með greiningarmótsermi.*
Líffærasviflausn, meðhöndluð með sýklalyfjum eða himnusíuð, er þynnt 1:10 og 1:1000 í frumuræktaræti og skammtar blandaðir og ræktaðir í 60 mínútur við 15°C með prófunarefnunum, sem talin eru upp í I.IV.2, í jöfnum hlutföllum.
- III.1. *Frumurækt og æti.*
Eins og mælt er fyrir um í I.III.1.
- III.2. *Sáning í frumurækt.*
Úr hverri veirusermiblöndu (tilreidd samkvæmt II.B.II.3) er sáð í að minnsta kosti tvær frumuræktir á hverja frumulfnu með 50 µl í hvora um sig.

III.3. Frumurækt.

Eins og mælt er fyrir um í I.III.I.

III.4. Smásjárskoðun.

Skoða skal daglega hvort frumuskemmdir koma fyrir í frumurækt, sem sáð hefur verið í, við um það bil fertugfalda til hundrað og fimmtíufalda stækkun. Sé komið í veg fyrir frumuskemmdir með einum af þeim mótsermum sem notuð eru má líta svo á að veiran hafi þar af leiðandi verið sanngreind.

Komi ekkert mótsermanna í veg fyrir frumuskemmdir skal grípa til sanngreiningar veira með aðferðum samkvæmt I.IV.

III.5. Umsáning.

Hafi frumuskemmdir ekki komið fram að sjö til tíu dögum liðnum skal umsáning fara fram úr ræktunum sem sáð hefur verið í með floti og æti (II.B.II.3) samkvæmt I.III.5.

C. Aðrar greiningaraðferðir.

Flot, sem tilreitt er eins og lýst er í I.II.2, er greint með IFAT eða ELISA samkvæmt I.IV.3 eða I.IV.4 eftir atvikum. Auk þessara flýtiáðferða skal veirufræðileg rannsókn koma til, annaðhvort samkvæmt A eða B, innan 48 klukkustunda eftir að sýnatöku lýkur, ef:

- a) niðurstaðan er neikvæð; eða
- b) jákvæð niðurstaða fæst með efni frá fyrsta tilfelli af brisdrepi, iðradrepi eða veirublæði á viðurkenndu svæði.

Heimilt er að greina vefjarefni samkvæmt öðrum aðferðum á borð við RT-PCR, IF-greiningu á frosnum sneiðum eða mótefnalitun vefja á formalínfestu vefjarefni. Þessum aðferðum skal ætíð fylgja sáning í frumurækt með vefjarefni sem hefur ekki áður verið formalínfest.

III. HLUTI**Skjalfest að brisdrep, veirublæði og/eða iðradrep hafi ekki komið upp áður á svæðum eða eldisstöðvum á svæði sem ekki er viðurkennt.****Viðmiðunarreglur og viðmiðanir um opinbera áætlun um heilbrigðisskoðun.**

1. Áætlun um heilbrigðisskoðun getur einungis hafist:
 - eftir að framfylgt hefur verið áætlun um útrýmingu IPN-veiru, VHS-veiru og/eða IHN-veiru, sem felur í sér að allur fiskur á eldisstöðinni er fjarlægður og stöðin hreinsuð, sótthreinsuð og hvíld áður en endurnýjað er með fiski frá viðurkenndum eldisstöðvum, eða
 - á fiskeldisstöðvum þar sem aldrei hefur orðið vart við IPN-veirusýkingu, VHS-veirusýkingu eða IHN-veirusýkingu.
2. Áætlunin um heilbrigðisskoðun verður að byggjast bæði á klínískum skoðunum og rannsóknastofurannsóknum.
3. Áætlunin verður að ná yfir tvær árlegar klínískar heilbrigðisskoðanir samkvæmt viðmiðunarreglum í I. hluta.
4. Í að minnsta kosti einni af þeim skoðunum sem fara fram ár hvert skal safna þrjátíu sýnum úr fiskvefjum og/eða hrognavökva á hverri eldisstöð. Sýnin skulu valin, undirbúin og sett í rannsóknastofurannsókn samkvæmt I., II. og IV. hluta.

5. Áætluninni um heilbrigðisskoðun skal framfylgt í að minnsta kosti fjögur ár á öllum eldisstöðvum á því svæði sem ber að viðurkenna eða þeirri eldisstöð (á svæði sem ekki er viðurkennt) sem ber að viðurkenna.
6. Til að hægt sé að viðurkenna áætlunina opinberlega mega hvorki koma upp né greinast tilvik af brisdrepi, veirublæði eða iðradrepi (engar klínískar sýkingar eða veirueinangranir).

IV. HLUTI

Aðferðir við títrun til að sannprófa að frumurækt sé móttækileg fyrir sýkingu.

Ráðlagðar aðferðir við títrun, sem um getur í LIL3, eru tilgreindar hér á eftir.

Nota skal að minnsta kosti eitt IPN-veirueinangur, tvö VHS-veirueinangur og eitt IHN-veirueinangur. Þessi einangur skulu standa fyrir helstu veiruflokka innan Evrópusambandsins, þ.e. fyrir IPN-veiru eitt sjúkdómsvaldandi einangur úr laxi í ferskvatni, fyrir VHS-veiru eitt sjúkdómsvaldandi einangur úr regnbogasilungi í ferskvatni og eitt sjávarveirueinangur, sem er sjúkdómsvaldandi fyrir sandhverfu, og fyrir IHN-veiru einn evrópskur stofn sem er sjúkdómsvaldandi fyrir regnbogasilung. Nota skal vel skilgreind einangur frá aðildarríkjunum.

Tilvísunarrannsóknarstofa Evrópusambandsins í fisksjúkdómum getur látið í té tilvísunareinangur.

Veiruhirðingar í frumurækt með lágri umsáningsartölu (passage number) eru ræktaðir í frumuræktarflöskum á BF-2- eða RTG-2-frumum fyrir IPN- og VHS-veiru og EPC- eða FHM-frumum fyrir IHN-veiru. Nota skal frumuæti með að minnsta kosti 10% sermi. Nota skal lágt MOI við sáningu (< 1).

Þegar allar frumur hafa skemmst er veira hirt með skiljun frumuræktarflots við $2000 \times g$ í 15 mínútur, síusæfð gegnum 0,45 μm himnusúu og sett á merkt frystiglös. Veiran er geymd við $-80^{\circ}C$.

Einni viku eftir frystingu eru þrjú hettuglös með hverri veiru lätin þiðna í köldu vatni og títruð á viðkomandi frumulínu. Minnst sjötta hvern mánuð, eða ef grunur leikur á um að móttækileiki frumulínu fyrir sýkingu hafi minnkað, skal þiðna og títra hvert veirueinangur.

Aðferðum við títrun verður að lýsa nákvæmlega og nota sömu aðferð hvert sinn.

Endurtaka skal títrun minnst sex sinnum á hverju þynningarstigi fram að lokapynningu. Títrunargildi eru borin saman við fyrri títrunargildi. Hafi títrun einhvers veirueinangurs af þremur fallið um tvo logra eða þar yfir, samanborið við upphaflegu títrunina, skal frumulínan ekki notuð framar í eftirlitsskyni.

Ef nokkrar frumulínur eru geymdar á rannsóknastofunni skal rannsaka hverja línu fyrir sig.

Skrár skulu varðveittar í að minnsta kosti tíu ár.

V. HLUTI

Skammstafanir.

BF-2	bluegill fry -2 (frumulína).
CPE	frumuskemmdir (cytopathic effect).
CRL	tilvísunarrannsóknarstofa Evrópubandalagsins í fisksjúkdómum.

ELISA	ELISA-próf (enzyme-linked immunosorbent assay).
EPC	<i>epithelioma papulosum cyprini</i> (frumulína).
FHM	fathead minnow (frumulína).
FITC	flúorsínísóbíósýanat
Hepes	N-2- hýdroxýetýlpíperasín-N'-2-etansúlfonsýra.
HRP	piparrótar-peroxídasi (horse radish peroxidase).
IF	aðferð með notkun flúrskinsmerktra mótefna (immunofluorescence).
IFAT	óbeint flúrskinsmótefnapróf (indirect fluorescent antibody test).
IHN(V)	iðradrep (veira)
IPN (V)	brisdrep (veira).
MEM	nauðsynlegt lágmarksæti (minimum essential medium).
MOI	sýkingartala (hlutfallið milli fjölda viðbættra sýkjandi veiruagna og þekkts fjölda fruma í rækt).
OPD	ortófenýlendíamín.
PBS	fosfatstillt saltlausn (phosphate buffered saline).
RTG-2	kynkirtill regnbogasilungs (frumulína).
RT-PCR	öfug transkriptasa-pólýmerasa-keðjuhvörf.
Tris-HCl	tris(hýdroxýmetýl)amínómetan – HCl.
TRITC	tetrametýl-ródamín-ísóbíósýanat.
VHS(V)	veirublæði (veira).