

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА

от 22 февруари 2001 година

**относно определяне на планове за вземане на проби и диагностичните
методи за откриване и потвърждаване на някои болести по рибите и за
отмяна на Решение 92/532/ЕИО**

(нотифицирано под № C(2001) 426)

(Текст от значение за ЕИП)

(2001/183/ЕО)

КОМИСИЯТА НА ЕВРОПЕЙСКИТЕ ОБЩНОСТИ,

като взе предвид Договора за създаване на Европейската общност,

като взе предвид Директива 91/67/ЕИО на Съвета от 28 януари 1991 г. относно ветеринарно-санитарните изисквания за пускане на пазара на аквакултури и продукти от тях¹, последно изменена с Директива 98/45/ЕО², и по-специално член 15 от нея,

като има предвид, че:

- 1) Планове за вземане на проби и диагностичните методи за откриване и потвърждаване на някои болести по рибите са определени в Решение 92/532/ЕИО на Комисията³, последно изменено с Решение 96/240/ЕО⁴.
- 2) От приемането на Решение 92/532/ЕИО бе осъществен напредък в практически и научен план и Директива 91/67/ЕИО бе изменена. Това развитие изисква актуализация на планове за вземане на проби и на диагностичните методи.
- 3) Тази актуализация се отнася за изследването и идентифицирането на вирусите, предизвикващи вирусната хеморагична септицемия (ВХС) и инфекциозната хемопоеична некроза (ИХН) и за адаптациите съгласно последните изменения на Директива 91/67/ЕИО.
- 4) Бе направена консултация с референтната лаборатория на Общността по болестите по рибите, учредена с Директива 93/53/ЕИО на Съвета⁵.

¹ ОВ L 46, 19.2.1991 г., стр. 1.

² ОВ L 189, 3.7.1998 г., стр. 12.

³ ОВ L 337, 21.11.1992 г., стр. 18.

⁴ ОВ L 79, 29.3.1996 г., стр. 19.

⁵ ОВ L 175, 19.7.1993 г., стр. 23.

5) С цел постигане на яснота, уместно е да бъдат отменени плановете за взимане на проби и диагностичните методи за откриване и потвърждаване на наличието на някои болести по рибите, въведени с Решение 92/532/ЕИО.

6) Мерките, предвидени в настоящото решение, са в съответствие със становището на Постоянния ветеринарен комитет,

РЕШИ:

Член 1

Плановете за взимане на проби и методите за диагностициране и потвърждаване на наличието на вирусна хеморагична септисемия (ВХС) и на инфекциозната хемопоеична некроза (ИХН) са определени в приложението към настоящото решение.

Член 2

Решение 92/532/ЕИО се отменя.

Член 3

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 22 февруари 2001 година.

За Комисията
David BYRNE
Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

ПЛАНОВЕ ЗА ВЗИМАНЕ НА ПРОБИ И ДИАГНОСТИЧНИ МЕТОДИ ЗА ОТКРИВАНЕ И ПОТВЪРЖДАВАНЕ НА НАЛИЧИЕТО НА ВИРУСНА ХЕМОРАГИЧНА СЕПТИСЕМИЯ (ВХС) И НА ИНФЕКЦИОЗНАТА ХЕМОПОЕТИЧНА НЕКРОЗА (ИХН)

УВОД

Настоящото приложение:

а) предвижда основните насоки и минималните изисквания прилагани за планове за взимане на проби и диагностичните методи за откриване и потвърждаване на наличието на вирусна хеморагична септисемия (ВХС) и инфекциозната хемопоетична некроза (ИХН);

б) интегрира разпоредбите на приложения Б и В към Директива 91/67/ЕИО относно одобряването и запазването на статута на одобрени зони и на стопанства в неодобрени зони;

в) определя разпоредби, имащи за цел правилното диагностициране на ВХС и ИХН и официалното признаване на статута на зони и на одобрени стопанства в неодобрени зони съгласно членове 5 и 6 от Директива 91/67/ЕИО;

г) е предназначено както за органите, отговарящи за контрола на ВХС и ИХН, така и за персонала в лабораториите, извършващи тестове за тези болести. Съответно акцентът е поставен върху процедурите за взимане на проби, принципите и приложенията на лабораторните тестове и оценката на техните резултати, както и върху подробните лабораторни техники. Въпреки това обаче, когато е необходимо, лабораториите могат да внасят промени в описаните в настоящото приложение тестове или да използват други тестове, при условие, че може да бъде доказана еквивалентни чувствителност и специфика.

Част I включва планове за взимане на проби и диагностичните методи за наблюдение на ВХС и ИХН с цел получаване и запазване на статута на одобрена зона или на стопанства в неодобрена зона.

Част II описва диагностичните процедури за потвърждаване на ВХС и ИХН в случай на подозрение.

Част III определя критериите и общите насоки, които се прилагат към програмата за официална здравна инспекция, документираща предходно отсъствие на ВХС и/или ИХН.

Част IV дава препоръки за процедурата, прилагана за титруването на вирусите на ВХС и/или ИХН, с цел да се провери възприемчивостта на клетъчните култури към инфекцията.

Акронимите и съкращенията са изброени в част V.

ЧАСТ I

Планове за взимане на проби и диагностични методи за наблюдение на ВХС и ИХН с цел получаване и запазване на статут на одобрена зона или на стопанство в неодобрена зона

I. Инспекции и взимане на проби

- 1. Общи разпоредби относно клиничните здравни инспекции, събирането и подбора на пробите за наблюдение в зони или в стопанствата в неодобрени зони с цел получаване или запазване на одобрен статут за ВХС и/или ИХН*

Клиничните санитарни здравни инспекции и взимането на проби от тъкани от риба и/или овариална течност, които трябва да бъдат извършени в зони или стопанства в неодобрени зони с цел получаване или запазване на одобрението що се отнася за ВХС и/или ИХН съгласно приложения Б и В към Директива 91/67/ЕИО са резюмирани в таблици 1А, 1Б и 1В. По-подробните условия са определени в част I.I. 2 – I.I.4. Таблици 1А и 1Б не се прилагат за новите стопанства или за стопанствата, които започват дейност с риби, яйца или гамети, произхождащи от одобрена зона или одобрено стопанство в неодобрена зона, при условие че отговарят на изискванията, определени в Директива 91/67/ЕИО, приложение В, част I.A.6, букви а) или б) или II.A.3, букви а) или б).

Клиничните инспекции трябва да бъдат извършени в периода от октомври до юни, или в който и да е момент, когато температурата на водата е под 14°C. Когато стопанствата трябва да бъдат обект на клинична проверка два пъти годишно, интервалите между инспекциите трябва да бъдат най-малко четири месеца. Всички производствени единици (водоеми, вани, клетки и т.н.) трябва да бъдат инспектирани с цел установяване на наличието на мъртви риби, слаби или с аномално поведение риби. Специално внимание трябва да бъде отделено на водоотливната точка, където има тенденция за натрупване на слаби риби поради течението.

Рибите, от които трябва да се вземат проби, се подбират, както следва:

- Ако са налице дъгови пъстърви, за взимането на проби се подбират само риби от този вид. Ако няма дъгови пъстърви, пробата трябва да бъде съставена от всички други налични видове, доколкото тези видове са възприемчиви към вируса на ВХС и/или на ИХН (изброени в приложение А към Директива 91/67/ЕИО на Съвета). В пробата видовете трябва да бъдат представени пропорционално.
- Ако за производството на рибата се използва повече от един водоизточник, в пробата трябва да бъдат включени риби, представляващи всички водоизточници.

- Ако има слаби риби, риби с аномално поведение или такива, които току-що са умрели (още неразложени), те трябва да бъдат подбрани на първо място. Ако такива риби не присъстват, пробата трябва да бъде съставена от риби с нормален вид, в добро здраве, събрани по такъв начин, че всички части на стопанството, както и всички възрастови групи по години да бъдат пропорционално представени в пробата.

2. Специални разпоредби, включително в областта на вземането на проби, относно наблюдението на зоните или стопанствата в неодобрен зони с цел получаване или запазване на одобрен статут, що се отнася за ВХС и/или ИХН

1. Зона или стопанство в неодобрена зона, поставена под наблюдение на официалните служби може да получи одобрен статут по отношение на ВХС и/или ИХН при условие, че се подложи на една от следните две програми:

а) Модел А – Програма за двугодишно наблюдение

След минимум две години отсъствие на всякакъв клиничен или друг признак за ВХС и/или ИХН, всички стопанства в зоната или всяко стопанство в неодобрена зона, които трябва да бъдат одобрени, трябва да бъдат обект на здравна инспекция два пъти годишно в рамките на две години. През този период на двугодишен контрол, предшестващ получаването на одобрен статут, трябва да е продължила липсата на клинични или други признаци за ВХС и/или ИХН и трябва да бъдат взети проби за изследване съгласно таблица 1А. Освен това пробите трябва да бъдат подбрани, подготвени и изследвани съгласно описанието в част I.I до I.IV, а лабораторните изследвания трябва да дадат отрицателни резултати за ВХС и/или ИХН.

или

б) Модел Б – Програма за двугодишно наблюдение с намален размер на пробата

След програма за официални здравни инспекции, доказващи отсъствието на ВХС и/или ИХН по време най-малко на последните четири години, всички стопанства в зоната или всяко стопанство в неодобрена зона, които трябва да бъдат одобрени, трябва да бъдат обект на здравна инспекция два пъти годишно за две години. По време на този двугодишен контролен период, предшестващ получаването на одобрен статус, трябва да е продължила липсата на клинични или други признаци за ВХС и/или ИХН и трябва да бъдат взети проби за изследване съгласно таблица 1Б. Освен това пробите трябва да бъдат подбрани, подготвени и изследвани съгласно разпоредбите на част I.I до I.IV, а лабораторните изследвания трябва да дадат отрицателни резултати за ВХС и/или ИХН. За да може програмата за здравни инспекции да бъде призната от официалните служби като доказваща

отсъствието преди това на ВХС и/или ИХН, тя трябва да отговаря на критериите и да спазва основните насоки, установени в част III.

2. Специални разпоредби за одобряване на нови стопанства и стопанства, които възобновяват дейността си с риби, яйца и гамети, произхождащи от одобрена зона или от одобрено стопанство в неодобрена зона

Новите стопанства и стопанствата, които възобновяват дейността си с риби, яйца или гамети, произхождащи от одобрена зона или от одобрено стопанство в неодобрена зона, могат да получат одобрен статут съгласно изискванията, определени в Директива 91/67/ЕИО, приложение В, част I.A.6, букви а) и б) или II.A.3, букви а) и б). Съответно разпоредбите за взимане на проби, установени в гореуказаните модели А и Б (части I.I.2.1, букви а) и б)) не се прилагат за тези стопанства.

3. Програма за наблюдение за запазване на одобрения статут по отношение на ВХС и/или ИХН

С цел запазване одобрения статут на дадена зона или стопанство в неодобрена зона по отношение на ВХС и/или ИХН, трябва да се извършват инспекции и взимане на проби за изследване съгласно таблица 1В. Пробите трябва да бъдат подбрани, подготвени и изследвани съгласно описанието в част I.I до I.IV, а резултатите от лабораторните изследвания трябва да бъдат отрицателни за ВХС и/или ИХН.

3. Подготовка и експедиция на рибните проби

Преди да бъдат изпратени или препратени към лабораторията, парченцата от органи, които трябва да се изследват, трябва да бъдат взети от рибата посредством стерилни дисекционни инструменти и поставени в стерилни пластмасови тубички, съдържащи транспортната среда, тоест средата за клетъчна култура, съдържаща 10% телешки серум и антибиотици. Може да бъде препоръчана комбинацията от 200 UI пеницилин, 200 µg стрептомицин и 200 µg канамицин на милилитър (ml), но могат да се използват и други антибиотици с доказана ефикасност. Тъканите, които трябва да се изследват, са от далака, предната част на бъбрека, и освен това или сърце, или мозък. В някои случаи трябва да се изследва овариалната течност (таблици 1А - 1В).

Овариалната течност или парченцата от органи от максимум десет риби (таблици 1А - 1В) могат да бъдат събрани в стерилна туба, съдържаща минимум 4 ml транспортна среда и представляваща една обща проба. Тъканите от всяка проба трябва да са с тегло минимум 0,5 g.

Тубите следва да бъдат поставени в изолирани съдове (например, полистиренови кутии с дебели стени) с достатъчно количество лед или „охлаждащи блокчета”, за да се гарантира охлаждането на пробите по време на транспорта до лабораторията. Трябва да се предотврати замръзването на пробите. Температурата на пробата по време на транспортирането ѝ не трябва в нито един

момента да надвишава 10°C, а при получаването ѝ в съда за транспортиране следва все още да има лед или едно или няколко охлаждащи блокчета трябва още да са частично или изцяло замръзнали.

Вирусологичното изследване трябва да започне възможно най-бързо и най-късно 48 часа след събирането на пробите. При изключителни случаи⁶ вирусологичното изследване може да започне най-късно 72 часа след събирането на материала за изследване, при условие че той е защитен от транспортната среда и че са били спазени изискванията за температурата (част I.I.3, параграф 3).

Цели риби могат да бъдат изпратени в лабораторията, ако са спазени изискванията за температурата по време на транспортирането. Цялата риба може да бъде увита в абсорбираща хартия и в крайна сметка трябва да бъде транспортирана в найлоново пликче, охладена както бе посочено. Живи риби също могат да бъдат изпращани.

Опаковката и етиктирането трябва да отговарят на действащите национални и международни разпоредби в областта на транспорта, както е уместно.

4. Събиране на допълнителен диагностичен материал

Съгласувано със съответната диагностична лаборатория и други тъкани, могат също така да бъдат събирани и подготвени за допълнителни изследвания.

II. Подготовка на пробите за вирусологично изследване

1. Замразяване в изключителни случаи

Ако възникнат практически затруднения (например, лоши климатични условия, неработни дни, проблеми с лабораторията и т.н.), които възпрепятстват инокулирането на клетките до 48 часа след събирането на тъканните проби, допуска се тези тъканни проби да бъдат замразени в среда за клетъчна култура при – 20 °C или при по-ниска температура, а вирусологичното изследване да се направи до 14 дни. Тъканите обаче могат да бъдат замразени и размразени само един път преди изследването им. Трябва да се водят регистри, в които да се посочва причината за всяко замразяване на тъканни проби (например буря, мъртви клетъчни линии и т.н.).

2. Хомогенизация на органи

В лабораторията тъканите, които се съдържат в тубите, трябва да бъдат напълно хомогенизирани (посредством мелница „stomacher“, смесител, чукче и хаванче и стерилен пясък) и поставени след това в суспензия в първоначалната транспортна среда.

Ако пробата се състои от цели риби с дължина под 4 см, те следва да бъдат надробени на малки парченца посредством стерилни ножици или със скалпел, след като се премахне частта от тялото зад коремния отвор. Ако пробата се

⁶ Например, когато рибите произхождат от много отдалечени зони и не могат да бъдат експедирани всекидневно.

състои от цели риби с дължина 4-6 см, вътрешностите, включително бъбреците, следва да бъдат събрани. Ако пробата се състои от цели риби с дължина над 6 см, тъканните проби следва да бъдат събрани, както е описано в част I.I.3. Тъканните проби следва да бъдат надробени на малки парченца посредством стерилни ножици или със скалпел, хомогенизирани както е описано по-горе и поставени в суспензия в транспортната среда.

Крайното съотношение между тъканния материал и транспортната среда трябва да се нагласи в лабораторията 1:10.

3. Центрофугиране на хомогенат

Хомогенатът се центрофугира в охладена центрофуга на температура между 2° и 5°C, при 2000 – 4000 x g за петнайсет минути, а супернатантата се събира и третира с антибиотици или за 4 часа при 15 °C, или за една нощ при 4 °C (например 1 mg/ml гентамицин може да бъде полезен на този етап).

Ако пробата е изпратена в транспортна среда (тоест, на антибиотици), третирането на супернатантата с антибиотици не е необходимо.

Третирането с антибиотици цели да се овладее бактериалната зараза на пробите и прави излишно филтрирането през мембранни филтри. Ако събраната супернатанта е съхранена при – 80 °C през 48-те часа след взимането на пробите, тя може да се използва само още един път за вирусологично изследване.

Ако се явят затруднения от практически характер (например повреда на инкубатор, проблеми с клетъчните култури и т.н.), които възпрепятстват инокулирането на клетки в рамките на 48-те часа след събирането на тъканните проби, допуска се супернатантата да бъде замразена на – 80 °C през тези 48 часа след взимането на тъканните проби и вирусологичното изследване да бъде направено до 14 дни.

Преди да се инокулират клетките, супернатантата се смесва в равни части с пул от антисеруми против местните серотипове на вируса на ИХН, разтворени по съответния начин и се инкубира така най-малко един час при 15 °C или максимум 18 часа при 4 °C. Титърът на антисерума трябва да е най-малко 1/2000 при неутрализационен тест на плаки по 50%.

Третирането на всички инокулуми с антивирусен серум ИХН (вирус, който в някои региони в Европа присъства в 50% от рибните проби) цели да се възпрепятства появата в инокулирани клетъчни култури на цитопатогенен ефект (ЕСР) следствие вируса на инфекциозна панкреатична некроза (ИПН). Това третиране позволява да се намали времето за вирусологичните изследвания, както и броя на случаите, при които появата на ЕСР трябва да се разглежда като потенциална индикация за ВХС или за ИХН.

Когато пробите произхождат от производствени единици, считани за свободни от ИПН, третирането на инокулумите с антивирусен серум ИПН може да бъде пропуснато.

III. Вирусологично изследване

1. Клетъчни култури и среди

Клетки BF-2 или RTG-2 и EPC или FHM се култивират на температура от 20 до 30 °C в подходяща среда, например Eagle's MEM (или модифицирани версии), към която е добавен 10% серум от говежди фетус и антибиотици в стандартни концентрации.

Когато клетките се култивират в затворени флакони, препоръчва се средата да се буферира с бикарбонат. Средата използвана за клетъчна култура в открити стъкленици може да се буферира посредством Tris-HCl (23 mM) и натриев бикарбонат (6 mM); рН трябва да бъде $7,6 \pm 0,2$.

Клетъчните култури, които ще се използват за инокулацията с тъканен материал следва да бъдат млади (от 4 до 48 часа) и в активна фаза на растеж (не конфлуентни) в момента на инокулацията.

2. Инокулация на клетъчните култури

В клетъчните култури трябва да се инокулира суспензия от органите, третирана с антибиотици, с две разреждания: първоначалното разреждане и след това разрежено 1:10, което дава съответно крайни разреждания на тъканния материал 1:100 и 1:1000 (така че да се предотвратят хомологичните интерференции). Трябва да бъдат инокуирани поне две клетъчни линии (виж част I. III.1). Съотношението между размера на инокулума и обема на средата на клетъчната култура следва да е около 1:10.

За всяко разреждане и всяка клетъчна култура трябва да се използва минимум около 2 см² клетки, което съответства на едно гнездо от плочка за тъканна култура с 24 гнезда. Препоръчва се използването на плочки за тъканна култура, но и други съдове с подобна или по-голяма площ на растеж могат да бъдат подходящи.

3. Инкубация на клетъчни култури

Инокуираните клетъчни култури се инкубират при 15 °C, седем до десет дни. Ако цветът на средата на клетъчната култура се промени от червено към жълто, индикация за ацидификация на средата, рН трябва да се напасне посредством стерилен бикарбонатов разтвор или еквивалентни субстанции, за да се гарантира податливостта на клетката към вирусната инфекция.

Най-малко на шест месеца или когато има подозрение за намаляване на клетъчната податливост се извършва титруване на замразените запаси от вируси на ВХС и ИХН, за да се провери чувствителността на клетъчните култури към инфекцията. Препоръчителна процедура е посочена в част IV.

4. Микроскопия

Инокулираните клетъчни култури трябва да се проверяват редовно (поне три пъти седмично), за да може да се открие появата на ЕСР при увеличение от 40 до 150 пъти. Ако отчетливо се появи ЕСР, незабавно трябва да се приложат процедурите за идентификация на вируса съгласно част IV.

5. Субкултура

Ако не се появи никакъв ЕСР след първата инкубация от 7 до 10 дни, да се направи нова субкултура от пресни клетъчни култури, като се използва клетъчна площ подобна на тази на първичната култура.

Аликвотни части от средата (супернатантата), произхождащи от всички култури/гнезда, съставляващи първичната култура се събират според клетъчната линия седем до десет дни след инокулацията. След това пуловете се инокулират в хомологичните клетъчни култури, неразредени и разредени 1:10 (даващи съответно крайните разреждания на супернатантата 1:10 и 1:100), както е описано в част I.III.2. Десетпроцентови аликвотни части от средата, съставляваща първичната култура, също могат да бъдат директно инокулирани в гнездото с пресни клетъчни култури (субкултура от гнездо в гнездо). Инокулацията може да се предшества от предварителна инкубация на разрежданията с антисерум против вируса на ИПН със съответното разреждане, както е описано в I.II.3.

След това инокулираните култури се инкубират 7 до 10 дни при температура 15°C, като се наблюдават съгласно част I.III 4.

Ако се получи токсичен ЕСР през първите три дни след инкубацията, на този етап може да бъде реализирана субкултура, но тогава клетките трябва да бъдат инкубирани седем дни и подложени на нова субкултура, след която следват още седем дни инкубация. Когато се появи токсичен ЕСР след три дни, клетките се пренасят един път и се инкубират, за да се получи общо 14 дни от първичната инокулация. Не трябва да има признак за токсичност през последните седем дни инкубация.

Ако се получи бактериална зараза въпреки третирането с антибиотици, субкултурата трябва да се предшества от центрофугиране при 2000-4000 x g за 15 до 30 минути, на температура 2 до 5°C, и/или от филтриране на супернатантата през филтър 0,45 µm (мембрана с нисък процент абсорбция на протеините). Освен това процедурите са същите като тези прилагани за токсичните ЕСР.

IV. Идентификация на вируса

1. Тестове за идентификация на вируса

Ако се получи ЕСР в клетъчна култура, средата (супернатантата) се събира и се изследва според една или няколко от следните техники: неутрализация, IF, ELISA. Ако тестовете не са позволили вирусът да бъде идентифициран окончателно за една седмица, супернатантата трябва да бъде препратена в национална референтна лаборатория или в референтната лаборатория на ЕС за болести по рибите, за да бъде незабавно идентифицирана.

2. Неутрализация

Премахват се клетките на събраната супернатанта чрез центрофугиране (2000 – 4000 x g) или чрез филтриране през мембрана с нисък процент на абсорбиране на протеините, след това супернатантата се разрежда 1:100 и 1: 1000 в среда за клетъчна култура.

Смесват се аликвотни части от двете разреждания на супернатантата и се инкубират поотделно за 60 минути при 15 °C в равни части със следните реактиви:

- серум, съдържащ група специфични антитела на вируса на ХВС при разреждане 1:50 (обем:обем)⁷,
- серум, съдържащ група специфични антитела на вируса на ИХН при разреждане 1:50 (обем:обем)⁷,
- група антисеруми срещу местните серотипове на вируса на ИПН при разреждане 1:50 (обем:обем)⁷,
- само среда за култура (положителен контрол)

За всяка една от смесите вирусна супернатанта - серум се инокулират най-малко две клетъчни култури, всяка една с 50 µl от смесените супернатанта и серум и се инкубира при 15 °C. Контролира се появата на ЕСР съгласно част I.III.4.

Някои щамове на вируса на ХВС не реагират при неутрализационните тестове. Тези изолати се идентифицират чрез техниките IF или ELISA.

Могат да бъдат прилагани други неутрализационни тестове, ако ефикасността им е доказана.

3. IF

За всеки вирусен изолат, който трябва да се идентифицира, се правят посеви върху осем стъкла с похлупаци или техния еквивалент с клетки, чиято гъстота поражда конфлуенция около 60-90% след 24 часа култура. Клетките ЕРС се препоръчват за тази цел поради силното им прилепване към стъклените повърхности, но други клетъчни линии като BF-2, RTG-2 или FHM могат също да бъдат използвани.

Когато клетките са се отложили по повърхността на стъклото (около един час след посевката) или когато културите са инкубирани максимум 24 часа, се инокулира вирусът, който трябва да бъде идентифициран. Инокулират се четири култури при съотношение на обемите 1:10 и четири култури при съотношение 1:1000. След това те се инкубират при 15 °C за 20-30 часа. След инкубацията, културите се изплакват два пъти със среда Eagle's MEM без серум, фиксират се с 80% разтвор от леден ацетон и тогава се осъществява реакцията IF. Първият слой на реактива се състои от поликлонални или моноклонални референтни антитела за качество. Вторият реактив е антисерум, съчетан с флуорохром, приготвен срещу имуноглобулините на първия серум. За всеки един от тестваните антисеруми се използва поне една култура, инокулирана с висока доза, и една

⁷ Или както е определено от референтната лаборатория по отношение на цитотоксичността на антисерумите.

култура, инокулирана с ниска доза. В теста трябва да се включат съответните отрицателни и положителни контроли. Като флуорохром се препоръчват FITC или TRITC.

Плочките с културите се монтират, като се използва солен глицеролов разтвор. Изследват се с ултравиолетови лъчи. Използват се окуляри 10 х или 12 х обективни лещи х 25 или х 40, чиито дигитални отвори са съответно > 0,7 и > 1,3.

IF техниката, описана по-горе, е дадена като пример. Могат да бъдат прилагани други IF техники (относно клетъчните култури, фиксирането и референтните антитела за качество), ако ефикасността им е доказана.

4. ELISA

Гнездата на плаките за микротитриране се покриват за една нощ с препоръчаните разреждания на фракции от пречистени имуноглобулини, получени от референтни серуми за качество.

Гнездата се изплакват с буферен разтвор PBS-Tween-20, в тях се добавя вирус за идентифициране, разреден две към две или четири към четири, и да се остави да реагира с покритието от антитела за 60 минути при 37°C. След изплакване с буферен разтвор PBS-Tween-20, да се добавят биотинилираните антитела, чиято специфика съответства на тази на покритието от антитела, и се оставя да реагира за 60 минути при 20°C. След още едно изплакване, както по-горе, се добавя HRP-конюгиран стрептавидин и се оставя да реагира за един час при 20°C. След едно последно изплакване, визуализирането на фиксирания ензим става посредством съответните субстрати ELISA (OPD или други).

Описаната по-горе техника ELISA, базираща се на биотин-авидина, е дадена като пример. Вместо нея могат да бъдат използвани други варианти на техниката ELISA, чиято ефикасност е доказана.

ТАБЛИЦА 1А

Схема за проверка и взимане на проби за зони и стопанства в неодобренни зони за двугодишния контролен период, предшестваш получаването на одобрен статут, що се отнася за ХВС и/или ИХН

(в съответствие с Директива 91/67/ЕИО, приложения Б и В и разпоредбите установени в част I на настоящото приложение)

	Брой клинични проверки годишно (две години)	Брой лабораторни изследвания годишно (две години)	Лабораторно изследване за откриване наличието на вирус ⁽¹⁾	
			Брой млади риби (органен материал)	Брой излюпени риби (овариална течност)
Континентални зони и				

стопанства				
а) рибовъдни стопанства със съоръжения за люпене	2	2	120 (първа инспекция) ⁽¹⁾ 150 (втора инспекция)	30 (първа инспекция) ⁽³⁾ 0 (втора проверка)
б) стопанства само със съоръжения за люпене	2	1	0	150 (първа или втора инспекция) ⁽³⁾
в) рибовъдни стопанства без съоръжения за мътене	2	2	150 (първа и втора инспекция)	0
Крайбрежни зони и стопанства				
а) рибовъдни стопанства със съоръжения за люпене	2	2	120 (първа инспекция) 150 (втора инспекция)	30 (първа инспекция) ⁽³⁾ 0 (втора инспекция)
б) рибовъдни стопанства за пъстървови риби без съоръжения за люпене	2	2	30 (първа и втора инспекция) ⁽⁴⁾	0
в) рибовъдни стопанства (без пъстървови), без съоръжения за люпене	2	2	150 (първа и втора инспекция)	0

Максимален брой риби на пул: 10

⁽¹⁾ Алтернативно може да бъде използвана намалена проба, както е посочено в таблица 1Б, при условие че са изпълнени изискванията, описани в текста на част II.1, част I.I.2.1.б и част III.

⁽²⁾ Клинични инспекции

⁽³⁾ При изключителни обстоятелства, ако не може да бъде получена овариална течност, вместо нея може да бъде използвана проба от органи.

⁽⁴⁾ Пробата трябва да бъде събрана преди изтичането на три седмици от прехвърлянето на рибата от прясна в солена вода.

ТАБЛИЦА 1Б

План за проверка и взимане на проби за двугодишния контролен период, предшестващ получаването на одобрен статут по отношение на ХВС и/или ИХН в зоните и стопанствата в неодобрен зони, за които отсъствието преди това на тези болести е официално доказано

(съгласно директива 91/67/ЕИО, приложения Б и В и разпоредбите, установени в части I и III на настоящото приложение)

	Брой клинични проверки годишно (две години)	Брой лабораторни изследвания годишно (две години)	Лабораторно изследване за откриване наличието на вирус	
			Брой млади риби (органен материал)	Брой излюпени риби (овариална течност)
Континентални зони и стопанства				
а) рибовъдни стопанства за отглеждане със съоръжения за люпене	2	2	0 (първа инспекция) ⁽¹⁾ 30 (втора инспекция)	30 (първа инспекция) ⁽²⁾ 0 (втора инспекция)
б) стопанства само със съоръжения за люпене	2	1	0	30 (първа или втора инспекция) ⁽²⁾
в) рибовъдни стопанства без съоръжения за люпене	2	2	30 (първа и втора инспекция)	0
Крайбрежни зони и стопанства				
а) рибовъдни стопанства със съоръжения за люпене	2	2	0 (първа инспекция) 30 (втора инспекция)	30 (първа инспекция) ⁽²⁾ 0 (втора инспекция)
б) рибовъдни стопанства за пъстървови риби без съоръжения за люпене	2	2	30 (първа и втора инспекция) ⁽³⁾	0
в) рибовъдни стопанства за риби, различни от пъстървовите, без съоръжения за люпене	2	2	30 (първа и втора инспекция)	0

Максимален брой риби на пул: 10

⁽¹⁾ Клинични инспекции

⁽²⁾ При изключителни обстоятелства, ако не може да бъде получена овариална течност, вместо нея може да бъде използвана проба от органи.

⁽³⁾ Пробата трябва да бъде събрана преди изтичането на три седмици от прехвърлянето на рибата от прясна в солена вода.

ТАБЛИЦА 1В

План за проверка и вземане на проби в зоните и стопанствата в неодобрили зони с цел запазване на одобрения статус по отношение на ХВС и/или ИХН,

(съгласно директива 91/67/ЕИО, приложения В и С, и разпоредбите, установени в част I на настоящото приложение)

	Брой клинични проверки годишно (две години)	Броя лабораторни изследвания годишно (две години)	Лабораторно изследване за откриване наличието на вирус	
			Брой млади риби (органен материал)	Брой излюпени риби (овариална течност)
Континентални зони и стопанства				
а) рибовъдни стопанства със съоръжения за люпене	2	2	20 (първа или втора проверка)	10 (първа или втора проверка)(2)
б) стопанства само със съоръжения за люпене	2	1	0	30 (първа или втора проверка)(2)
в) рибовъдни стопанства без съоръжения за люпене	1	2	30	0
Крайбрежни зони и стопанства				
а) рибовъдни стопанства със съоръжения за люпене	2	2	20 (първа или втора проверка)	10 (първа или втора проверка) (2)
б) рибовъдни стопанства без съоръжения за люпене	2	1	30 (3)	0

Максимален брой риби на пул: 10

⁽¹⁾ В одобрените зони трябва да се събират проби само при ежегодна ротация на 50% от рибовъдните стопанства.

⁽²⁾ При изключителни обстоятелства, ако не може да бъде получена овариална течност, вместо нея може да бъде използвана проба от органи.

⁽³⁾ Пробата трябва да бъде събрана преди изтичането на три седмици от прехвърлянето на рибата от прясна в солена вода.

ЧАСТ II

Диагностични процедури за потвърждение на ХВС и ИХН в случай на подозрение

За диагностициране на ХВС и ИХН се прилагат една или няколко от следните техники:

- А. Конвенционално изолиране на вируса, последвано от серологична идентификация на вируса,
- Б. Изолиране на вируса едновременно с идентификация на вируса,
- В. Други диагностични техники (IFAT, ELISA).

Потвърждаването на първия случай на ХВС и/или ИХН в стопанствата в одобрени зони не може да се основава единствено на метод В. Трябва също да се приложи или метод А или метод Б.

Тъканният материал, предназначен за вирусологично изследване в някои случаи може да се наложи да бъде придружен от допълнителен материал за бактериологично, паразитологично, хистологично или друго изследване с цел диференциална диагноза.

А. Конвенционално изолиране на вируса последвано от серологична идентификация на вируса

I.1. Подбор на пробите

За изследване трябва да се подберат минимум десет риби с типични признаци на ХВС или ИХН.

I.2. Подготовка и експедиране на рибните проби

Съгласно установеното в част I.1.3.

I.3. Събиране на допълнителен диагностичен материал

Съгласно установеното в част I.1.4.

II. Подготовка на пробите за вирусологично изследване

Съгласно установеното в част I.1.1.

III. Вирусологично изследване

Съгласно установеното в част I.1.1.

IV. Идентификация на вируса

Съгласно установеното в част I.IV.

Б. Изолитране на вируса с едновременна идентификация на вируса

I.1. Подбор на пробите

Съгласно установеното в част II.A.I.1.

I.2. Подготовка и експедиране на рибните проби

Съгласно установеното в част I.I.3.

I.3. Събиране на допълнителен диагностичен материал

Съгласно установеното в част I.I.4.

II.1. Хомогенизация на органите

Съгласно установеното в част I.II.2.

II.2. Центрофугиране на хомогената

Хомогенатът се центрофугира в охладена центрофуга при температура между 2 °C и 5°C, при 2000 – 4000 x g за петнайсет минути, а супернатантата се събира и третира с антибиотици за 4 часа на 15°C, например с 1 mg /ml гентамицин или се прекарва през мембранен филтър 0,45 µm (мембрана с нисък процент на абсорбция на протеините).

II.3. Третиране на супернатантата с диагностични антисеруми

Органовата суспензия, третирана с антибиотици или прекарана през мембранен филтър, се разрежда 1:10 и 1:1000 в среда за клетъчна култура и аликвотни части се смесват и инкубират за 60 минути при 15 °C с равни части от реактивите, изброени в част I.IV.2.

III.1. Клетъчни култури и среди

Съгласно установеното в част I.III.1.

III.2. Инокулация на клетъчните култури

От всяка смес вирус-серум (приготвена съгласно част II.B.II.3), се инокулират минимум две гнезда клетъчни култури на клетъчна линия с 50 µm всяка.

III.3. Инкубация на клетъчните култури

Съгласно установеното в част I.III.3.

III.4. Микроскопия

Инокулираните клетъчни култури се проверяват всеки ден, с цел да се открие появата на ЕСР при увеличение от 40-150 пъти. Ако образуването на ЕСР бъде възпрепятствано от един от използваните серуми, вирусът може да се счита за съответно идентифициран.

Ако появата на ЕСР не се възпрепятства от един от антисерумите, трябва да се приложат процедурите за идентификация на вируса съгласно част I.IV.

III.5. Субкултура

Ако не се получи никакъв ЕСР след 7-10 дни, трябва да се направи субкултура от инокуирани клетки със супернатанта плюс среда (част II.B.II.3) в съответствие с част I.III.5.

В. Други диагностични техники

Супернатантата, приготвена както е посочено в част I.II.2, може да бъде подложена на техниките IFAT или ELISA, съгласно част I.IV.3 или част I.IV.4. Тези бързи техники могат да бъдат допълнени с вирусологично изследване, съгласно А или Б, до 48 часа след взимането на проби:

а) ако е получен отрицателен резултат или

б) ако е получен положителен резултат от проби, представляващи първи случай на ХВС или ИХН в одобрена зона.

Тъканен материал може да бъде подложен на други диагностични техники, като техниките RT-PCR или IF върху замразени елементи или имунохистохимия върху тъканен материал, фиксиран с формалин. Тези техники трябва винаги да се съпътстват от инокулация на нефиксиран тъканен материал върху клетъчни култури.

ЧАСТ III

Доказателство за отсъствието преди това на ХВС и/или ИХН в неодобрени зони или стопанства в неодобрени зони

Основни насоки и критерии, прилагани към програмата за официална здравна инспекция

1. Програма за здравна инспекция може да бъде приложена единствено:

- след осъществяване на официално призната програма за изкореняване на ХВС и/или ИХН, налагаща отстраняване на всички риби в стопанството, почистване, дезинфекция и източване преди зарибяване с риби, произхождащи от одобрени стопанства или
- в рибни стопанства, където преди това не се е появявала никаква инфекция, свързана с вирусите на ХВС и ИХН.

2. Програмата за официална здравна инспекция трябва да се базира на клинични проверки и лабораторните изследвания.
3. Програмата трябва да включва две годишни клинични здравни инспекции, съгласно основните насоки, посочени в част I.
4. Поне при една от годишните инспекции 30 проби от тъкан от риба и/или от овариална течност се събират от всяко стопанство. Пробите се подбират, подготвят и се подлагат на лабораторно изследване съгласно части I, II и IV.
5. Програмата за здравна инспекция се изпълнява най-малко четири години във всички стопанства в зоната или в стопанството (в неодобрена зона), които следва да бъдат одобрени.
6. За да може програмата да бъде официално призната, не трябва да се появи или да бъде открит нито един случай на ХВС или ИХН (нито клинична инфекция, нито изолиране на вирус).

ЧАСТ IV

Титриране с цел проверка на податливостта на клетъчните култури към инфекцията

Препоръчителни процедури за титрирането, посочено в част I.III.3 са посочени по-долу.

Следва да се използват минимум два изолата на ХВС вируса и един изолат на ИХН вируса. Тези изолати следва да бъдат представителни за основните вируси в ЕС, напр. за вируса на ХВС, един патогенен изолат от дъгова пъстърва и един морски патогенен изолат за калкана в морска вода, а що се отнася за ИХН, патогенен щам от дъгова пъстърва от Европа). Следва да се използват добре определени изолати, произхождащи от държавите-членки. Референтни изолати са на разположение в референтната лаборатория на ЕС за болестите по рибите.

Групи вируси с ниско число на преминаване в клетъчни култури се отглеждат във флакони с клетъчни култури върху клетки BF-2 или RTG-2 за вируса на ХВС, и върху клетки EPC за вируса на ИХН. Следва да се използва среда за клетъчна култура, към която е добавено минимум 10% серум. За инокулацията да се използва ниско MOI (<1).

Когато ECP е тотален, вирусът се събира чрез центрофугиране на супернатантата от клетъчната култура при 2000 x g за 15 минути, стерилизирана чрез филтриране през мембрана 0,45 µm и разпределена в етикетирани криотуби. Вирусът се съхранява при - 80°C.

Седмица след замразяването три епруветки от всеки вирус се размразяват под студена вода и титрират по съответните им клетъчни линии. Всеки вирусен изолат се размразява и титрира минимум на шест месеца или ако има подозрение за снижаване на податливостта на клетъчните линии.

Процедурите за титриране трябва да бъдат подробно описани и всеки път трябва да се прилага една и съща процедура.

Титрирането чрез гранично разреждане следва да включва минимум шест репликата от всяка серия разреждания. Титрите се сравняват с титрите, получени

преди това. Ако титърът на един от трите вирусни изолата намалее с фактор от 2 лога или повече спрямо първоначалния титър, клетъчната линия повече не следва да се използва за наблюдение.

Ако в лабораторията се съхраняват различни клетъчни линии, всяка линия следва да се изследва поотделно.

Регистрите следва да се съхраняват минимум 10 години.

ЧАСТ V

Акроними и съкращения

BF-2 Клетъчна линия Bluegill fry-2 ()

ЕСР Цитопатогенен ефект

LCR Референтна общностна лаборатория за болестите по рибите

ELISA Имуноабсорбционен ензимен метод

EPC *Epithelioma papulosum cyprinii* (клетъчна линия)

FHM Клетъчна линия Fathead minnow

FITS Флуоресцеинов изотиоцианат

Нерес N-2-хидроксиетилпиперазин-N'-2-етан-сулфонова киселина

HRP Пероксидаза от хрян

IF Имунофлуоресценция

IFAT Косвен имунофлуоресцентен тест

IHV (V) Инфекциозна хемопоеична некроза (ИХН) (вирус)

IPN Инфекциозна панкреатична некроза (ИПН) (вирус)

MEM Минимална есенциална среда

MOI Мултиплетност на инфекцията (брой инфекциозни вирусни частици добавени спрямо известно число клетки в една култура)

OPD Ортофенилендиамин

PBS Буфериран разтвор с фосфат

RTG-2 Гонада от дъгова пъстърва (клетъчна линия)

RT-PCR Обратна транскриптаза – верижна реакция на полимеразата

Tris-HCl Tris(хидроксиметил) аминометан - HCl

TRITC тетраметил-родамин-изотиоцианат

VHS(V) Вирусна хеморагична септисемия (вирус) ВХС