

II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

KOMMISSION

ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 22. Februar 2001

zur Festlegung der Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen und zur Aufhebung der Entscheidung 92/532/EWG*(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2001) 426)***(Text von Bedeutung für den EWR)**

(2001/183/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 91/67/EWG des Rates vom 28. Januar 1991 betreffend die tierseuchenrechtlichen Vorschriften für die Vermarktung von Tieren und anderen Erzeugnissen der Aquakultur ⁽¹⁾, zuletzt geändert durch die Richtlinie 98/45/EG ⁽²⁾, insbesondere auf Artikel 15,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen wurden mit der Entscheidung 92/532/EWG der Kommission ⁽³⁾, geändert durch die Entscheidung 96/240/EG ⁽⁴⁾, festgelegt.
- (2) Seit der Annahme der Entscheidung 92/532/EWG haben praktische und wissenschaftliche Entwicklungen stattgefunden, und die Richtlinie 91/67/EWG ist geändert worden. Daher müssen die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren aktualisiert werden.
- (3) Diese Aktualisierung bezieht sich auf die Untersuchung und den Nachweis von Viren, die virale hämorrhagische Septikämie (VHS) und infektiöse hämatopoetische Nekrose (IHN) verursachen, sowie auf Änderungen gemäß den letzten Änderungen der Richtlinie 91/67/EWG.
- (4) Das mit der Richtlinie 93/53/EWG des Rates ⁽⁵⁾ eingerichtete Gemeinschaftliche Referenzlaboratorium für Fischseuchen ist konsultiert worden.

- (5) Die mit der Entscheidung 92/532/EWG festgelegten Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis bestimmter Fischseuchen müssen im Interesse der Klarheit aufgehoben werden.
- (6) Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Veterinärausschusses —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

Artikel 1

Die Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHN) sind im Anhang festgelegt.

Artikel 2

Die Entscheidung 92/532/EWG wird aufgehoben.

Artikel 3

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 22. Februar 2001

Für die Kommission

David BYRNE

Mitglied der Kommission

⁽¹⁾ ABl. L 46 vom 19.2.1991, S. 1.⁽²⁾ ABl. L 189 vom 3.7.1998, S. 12.⁽³⁾ ABl. L 337 vom 21.11.1992, S. 18.⁽⁴⁾ ABl. L 79 vom 29.3.1996, S. 19.⁽⁵⁾ ABl. L 175 vom 19.7.1993, S. 23.

ANHANG

PROBENAHMEPLÄNE UND DIAGNOSEVERFAHREN ZUR ERKENNUNG UND ZUM NACHWEIS DER VIRALEN HÄMORRHAGISCHEN SEPTIKÄMIE (VHS) UND DER INFEKTIOSEN HÄMATOPOETISCHEN NEKROSE (IHN)

EINLEITUNG

Dieser Anhang

- a) enthält Leitlinien und Mindestanforderungen für Probenahmepläne und Diagnoseverfahren zur Erkennung und zum Nachweis der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) und der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHN);
- b) umfasst die Bestimmungen der Anhänge B und C der Richtlinie 91/67/EWG für die Zulassung und die Aufrechterhaltung der Zulassung von Gebieten oder von Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten;
- c) legt Vorschriften für die ordnungsgemäße Diagnose von VHS und IHN und für die amtliche Anerkennung des Status von Gebieten und von Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten gemäß den Artikeln 5 und 6 der Richtlinie 91/67/EWG fest;
- d) richtet sich sowohl an die für die Bekämpfung von VHS und IHN zuständigen Behörden als auch an das Laborpersonal, das die Tests auf diese Fischseuchen durchführt. Schwerpunkte sind daher Probenahmeverfahren, Grundsätze und Durchführung der Labortests, die Auswertung der Testergebnisse sowie ausführliche Beschreibungen der Laborverfahren. Die Labors können die in diesem Anhang beschriebenen Tests jedoch erforderlichenfalls abändern oder andere Tests anwenden, wenn eine gleichwertige Empfindlichkeit und Spezifität nachgewiesen werden kann.

Teil I enthält Probenahmepläne und Diagnoseverfahren für die Überwachung von VHS und IHN im Hinblick auf die Erstzulassung und die Aufrechterhaltung der Zulassung eines Gebiets oder eines Betriebs in einem nicht zugelassenen Gebiet.

In Teil II werden die Diagnoseverfahren für den Nachweis von VHS und IHN bei Seuchenverdacht beschrieben.

In Teil III werden die Kriterien und Leitlinien für ein amtliches Untersuchungsprogramm zum Nachweis der Seuchenfreiheit in Bezug auf VHS und/oder IHN festgelegt.

Teil IV enthält Empfehlungen zum Verfahren der VHS- und IHN-Virustitration zur Überprüfung der Infektionsanfälligkeit der Zellkulturen.

Akronyme und Abkürzungen sind in Teil V erläutert.

TEIL I

Probenahmepläne und Diagnoseverfahren für die Überwachung von VHS und IHN zur Erlangung oder Aufrechterhaltung der Zulassung eines Gebiets oder eines Betriebs in einem nicht zugelassenen Gebiet**I. Untersuchungen und Probenahmen**

1. *Allgemeine Bestimmungen über klinische Untersuchungen, Entnahme und Auswahl von Proben für die Überwachung von Gebieten oder Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten im Hinblick auf die Erstzulassung oder die Aufrechterhaltung der Zulassung als VHS- und/oder IHN-frei*

Die klinischen Untersuchungen und die Probenahme von Fischgewebe und/oder Ovarienflüssigkeit, die in Gebieten oder in Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten durchzuführen sind, um gemäß der Anhänge B und C der Richtlinie 91/67/EWG die Erstzulassung als VHS- und/oder IHN-frei zu erhalten oder die Zulassung aufrechtzuerhalten, sind in den Tabellen 1A, 1B und 1C zusammengefasst. Einzelheiten sind in den Teilen I.I.2 bis I.I.4 festgelegt. Die Tabellen 1A und 1B gelten nicht für neue Betriebe oder Betriebe, die ihre Tätigkeit mit Fischen, Eiern oder Gameten aus einem zugelassenen Gebiet oder von einem zugelassenen Betrieb in einem nicht zugelassenen Gebiet wieder aufnehmen, vorausgesetzt, dass sie den in Anhang C Teil I.A.6 Buchstabe a) oder I.A.6 Buchstabe b) oder II.A.3 Buchstabe a) oder II.A.3 Buchstabe b) der Richtlinie 91/67/EWG festgelegten Anforderungen genügen.

Die klinischen Untersuchungen sind zwischen Oktober und Juni durchzuführen bzw. immer dann, wenn die Wassertemperatur unter 14 °C liegt. Bei Betrieben, die zweimal jährlich klinisch untersucht werden, müssen die Abstände zwischen den Untersuchungen mindestens vier Monate betragen. Alle Produktionsanlagen (Teiche, Tanks, Netzkäfige usw.) müssen auf verendete, geschwächte oder verhaltensgestörte Fische kontrolliert werden. Besondere Beachtung ist dem Wasserabflussbereich zu widmen, in dem sich geschwächte Fische strömungsbedingt besonders häufig aufhalten.

Fische für die Probenahme werden wie folgt ausgewählt:

- Sind Regenbogenforellen vorhanden, so sollten nur Fische dieser Art für die Probenahme gewählt werden. Sind keine Regenbogenforellen vorhanden, so muss die Probe Fische aller für VHSV und/oder IHNV empfänglichen Arten des Betriebs umfassen (vgl. dazu Anhang A der Richtlinie 91/67/EWG). Jede Fischart muss in der Probe proportional vertreten sein.
- Wird für die Fischproduktion mehr als eine Wasserquelle verwendet, so müssen bei der Probenahme alle Wasserquellen berücksichtigt werden.
- Sind geschwächte, verhaltensgestörte oder soeben verendete Fische (ohne Anzeichen der Zersetzung) vorhanden, so sind hauptsächlich solche Fische auszuwählen. Sind solche Fische nicht vorhanden, so sind die Fische so auszuwählen, dass sich die Probe proportional aus normal erscheinenden, gesunden Fischen aller Produktionseinheiten des Betriebs sowie aller Jahresklassen zusammensetzt.

2. *Sonderbestimmungen, einschließlich Probenahme, für die Überwachung von Gebieten oder Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten im Hinblick auf die Erstzulassung oder die Aufrechterhaltung der Zulassung als VHS- und/oder IHN-frei*

1. Gebiete oder Betriebe in einem nicht zugelassenen Gebiet, die unter behördliche Überwachung gestellt werden, können nach einem der beiden folgenden Verfahren als VHS- und/oder IHN-frei zugelassen werden:

a) Modell A — zweijähriges Überwachungsprogramm

Nachdem mindestens zwei Jahre keine klinischen oder sonstigen Zeichen für VHS und/oder IHN aufgetreten sind, müssen alle Betriebe in dem Gebiet oder Betriebe in einem nicht zugelassenen Gebiet, die zugelassen werden sollen, zwei Jahre lang zweimal jährlich untersucht werden. Während dieses zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erstzulassung dürfen weiterhin keine klinischen oder sonstigen Zeichen für VHS und/oder IHN auftreten und es müssen gemäß Tabelle 1A Proben für Untersuchungen genommen werden. Die Proben müssen gemäß den Teilen I.I bis I.IV ausgewählt, aufbereitet und untersucht werden, und die Laboruntersuchungen müssen Negativbefunde für VHS bzw. IHN ergeben;

oder

b) Modell B — zweijähriges Überwachungsprogramm mit verringerter Probengröße

Nach einem amtlichen Untersuchungsprogramm, mit dem nachgewiesen wird, dass seit mindestens vier Jahren weder VHS noch IHN aufgetreten sind, müssen alle Betriebe in dem Gebiet oder Betriebe in einem nicht zugelassenen Gebiet, die zugelassen werden sollen, zwei Jahre lang zweimal jährlich untersucht werden. Während dieses zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erstzulassung dürfen weiterhin keine klinischen oder sonstigen Zeichen für VHS und/oder IHN auftreten und es müssen gemäß der Tabelle 1B Proben für Untersuchungen genommen werden. Die Proben müssen gemäß den Teilen I.I bis I.IV ausgewählt, aufbereitet und untersucht werden, und die Laboruntersuchungen müssen Negativbefunde für VHS bzw. IHN ergeben. Ein Untersuchungsprogramm wird von den zuständigen Behörden nur dann als Nachweis der VHS- und/oder IHN-Freiheit anerkannt, wenn es den in Teil III festgelegten Kriterien und Leitlinien entspricht.

2. Sonderbestimmungen für die Zulassung von neuen Betrieben oder Betrieben, die ihre Tätigkeit mit Fischen, Eiern oder Gameten aus einem zugelassenen Gebiet oder von einem zugelassenen Betrieb in einem nicht zugelassenen Gebiet wieder aufnehmen

Neue Betriebe oder Betriebe, die ihre Tätigkeit mit Fischen, Eiern oder Gameten aus einem zugelassenen Gebiet oder von einem zugelassenen Betrieb in einem nicht zugelassenen Gebiet wieder aufnehmen, können die Zulassung gemäß den Anforderungen der Richtlinie 91/67/EWG, Anhang C, I.A.6a/b oder I.A.3.a/b erhalten. Die für die Modelle A und B (Teile I.I.2.1.a und I.I.2.1.b) festgelegten Probenahmenvorschriften gelten daher für diese Betriebe nicht.

3. Überwachungsprogramm für die Aufrechterhaltung der Zulassung als VHS- und/oder IHN-frei

Zur Aufrechterhaltung der Zulassung eines Gebiets oder eines Betriebs in einem nicht zugelassenen Gebiet als VHS- und/oder IHN-frei müssen gemäß Tabelle 1C Untersuchungen und Probenahmen für Untersuchungen durchgeführt werden. Die Proben sind wie in den Teilen I.I. bis I.IV auszuwählen, aufzubereiten und zu untersuchen, und die Befunde der Laboruntersuchungen müssen VHS- und/oder IHN-negativ sein.

3. *Aufbereitung und Einsendung der Fischproben*

Vor dem Versand oder der Überführung zum Untersuchungslabor müssen dem Fisch mit sterilen Sektionsinstrumenten die zu untersuchenden Organe entnommen und in sterile Kunststoffröhrchen gefüllt werden, die ein Transportmedium (Nährmedium mit 10 % Kälberserum und Antibiotika) enthalten. Empfehlenswert ist ein Gemisch aus 200 IE Penicillin, 200 µg Streptomycin und 200 µg Kanamycin je ml; es können aber auch andere erprobte Antibiotika verwendet werden. Untersucht werden Milz, Vordermiere, sowie entweder Herz oder Gehirn. In einigen Fällen muss auch Ovarienflüssigkeit untersucht werden (Tabellen 1A-C).

Ovarienflüssigkeit oder Organteile von höchstens zehn Fischen (Tabellen 1A-C) können als Sammelprobe in ein steriles Röhrchen gefüllt werden, das mindestens 4 ml Transportmedium enthält. Jede Gewebeprobe sollte mindestens 0,5 g wiegen.

Die Röhrchen sollten in Isolationsbehälter (z. B. dickwandige Styroporkästen) gepackt werden, die genügend Eis oder Kühlelemente enthalten, um zu gewährleisten, dass die Proben beim Transport zum Labor gekühlt gehalten werden. Ein Anfriern ist zu vermeiden. Während des Transports sollte die Temperatur einer Probe zu keiner Zeit mehr als 10 °C betragen, und bei der Ankunft sollte im Transportbehälter noch Eis vorhanden sein oder mindestens ein Kühlelement muss noch teilweise oder vollständig gefroren sein.

Mit der virologischen Untersuchung ist baldmöglichst zu beginnen, spätestens jedoch 48 Stunden nach der Probenahme. In Ausnahmefällen⁽¹⁾ kann die virologische Untersuchung innerhalb von 72 Stunden nach der Materialentnahme begonnen werden, sofern das Untersuchungsmaterial durch das Transportmedium geschützt war und die Temperaturanforderungen während des Transports erfüllt wurden (Teil I.I.3 Absatz 3).

Fische können unzerteilt (ganz) zum Labor gesandt werden, sofern die Temperaturanforderungen während des Transports erfüllt werden können. Ganzer Fisch muss, unter Umständen mit Saugpapier umhüllt und wie vorstehend beschrieben gekühlt, in einem Plastikbeutel versandt werden. Fische können auch lebend eingesandt werden.

Die Sendungen sind gegebenenfalls nach den geltenden nationalen und internationalen Transportbestimmungen zu verpacken und zu etikettieren.

4. Entnahme von zusätzlichem Probenmaterial

Nach Vereinbarung mit dem betreffenden Diagnoselaboratorium kann weiteres Gewebematerial entnommen und für Zusatzuntersuchungen aufbereitet werden.

II. Aufbereitung der Proben für die virologische Untersuchung

1. Einfrieren in Ausnahmefällen

Sollten praktische Schwierigkeiten auftreten (z. B. schlechtes Wetter, Feiertage, Laborprobleme usw.), die eine Beimpfung der Zellen innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme verhindern, so können die Gewebeproben in Zellkulturmedium bei mindestens -20 °C eingefroren und die virologische Untersuchung innerhalb der nächsten 14 Tage vorgenommen werden. Das Gewebe darf jedoch nur einmal eingefroren und vor der Untersuchung aufgetaut werden. Über die Gründe für das Einfrieren von Gewebeproben (z. B. Sturm, abgestorbene Zelllinien usw.) ist ausführlich Buch zu führen.

2. Homogenisieren der Organe

Im Labor wird die Gewebeprobe (mit einem Stomacher, Mixer oder Mörser und Pistill mit sterilem Sand) vollständig homogenisiert. Das Homogenat wird anschließend im ursprünglichen Transportmedium suspendiert.

Besteht die Probe aus ganzem Fisch von weniger als 4 cm Länge, so sollte dieser mit Hilfe einer sterilen Schere oder einem sterilen Skalpell nach Entfernen des hinter der Darmöffnung liegenden Körperteils zerlegt werden. Besteht die Probe aus ganzem Fisch von 4 bis 6 cm Länge, so sollten die Innereien einschließlich der Nieren entnommen werden. Besteht die Probe aus ganzem Fisch von mehr als 6 cm Länge, so sollten die Gewebeproben wie in Teil I.I.3 beschrieben entnommen werden. Die Gewebeproben sollten mit Hilfe einer sterilen Schere oder eines sterilen Skalpells zerlegt, wie vorstehend beschrieben homogenisiert und im Transportmedium suspendiert werden.

Das Volumenverhältnis zwischen Gewebematerial und Transportmedium ist im Labor auf 1:10 einzustellen.

3. Zentrifugieren des Homogenats

Das Homogenat wird in einer auf 2 bis 5 °C gekühlten Zentrifuge bei 2 000 bis 4 000 × g 15 Minuten lang abgeschleudert. Der Überstand wird aufgefangen und entweder vier Stunden bei 15 °C oder über Nacht bei 4 °C antibiotisch behandelt (in diesem Stadium empfiehlt sich beispielsweise 1 mg/ml Gentamycin).

Wurde die Probe in einem antibiotikahaltigen Transportmedium versandt, so ist eine antibiotische Behandlung des Überstands nicht nötig.

Da die Antibiotika-Behandlung eine Bakterieninfektion der Proben verhindert, erübrigt sich eine Membranfiltrierung.

Sofern der aufgefangene Überstand innerhalb von 48 Stunden nach der Probenentnahme bei -80 °C gelagert wird, kann er noch ein weiteres Mal zur virologischen Untersuchung verwendet werden.

⁽¹⁾ In Ausnahmefällen, d. h. wenn die Fische aus sehr abgelegenen Gebieten stammen, in denen kein täglicher Versand möglich ist.

Sollten praktische Schwierigkeiten auftreten (z. B. Inkubatorausfall, Probleme mit Zellkulturen usw.), die eine Beimpfung der Zellen innerhalb von 48 Stunden nach der Entnahme der Gewebeprobe verhindern, so können der Überstand bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und die virologische Untersuchung innerhalb der nächsten 14 Tage vorgenommen werden.

Vor der Zellbeimpfung wird der Überstand zu gleichen Teilen mit einem angemessen verdünnten Pool von Antiseren, die Antikörper gegen die einheimischen IPNV-Serotypen enthalten, gemischt und mindestens eine Stunde bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder höchstens 18 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Bei einem 50 %igen Plaquetest muss der Antiserumtiter mindestens 1:2 000 betragen.

Die Behandlung aller Inokula mit IPNV-Antiserum (in einigen Teilen Europas sind 50 % der Fischproben mit dem IPN-Virus kontaminiert) dient der Vorbeugung gegen einen IPNV-induzierten zytopathischen Effekt (CPE) bei beimpften Zellkulturen. Dadurch werden die Dauer der virologischen Untersuchungen und die Zahl der Fälle reduziert, bei denen ein zytopathischer Effekt als Indiz für VHSV oder IHNV gewertet werden müsste.

Stammen die Proben aus Produktionseinheiten, die als IPN-frei gelten, so kann auf die Behandlung der Inokula mit IPNV-Antiserum verzichtet werden.

III. Virologische Untersuchung

1. Zellkulturen und Nährböden

BF-2- oder RTG-2- und entweder EPC- oder FHM-Zellen werden bei 20 bis $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem geeigneten Medium, z. B. Eagle's MEM (oder entsprechende Modifikationen), versetzt mit 10 % Rinderfötenserum und Antibiotika in Standardkonzentrationen, angezüchtet.

Sofern die Zellen in verschlossenen Phiole kultiviert werden, wird empfohlen, das Medium mit Bikarbonat zu puffern. Werden die Zellkulturen in offenen Phiole angesetzt, so kann das Medium mit Tris-HCl (23 mM) und Natriumbikarbonat (6 mM) gepuffert werden; der pH-Wert muss $7,6 \pm 0,2$ betragen.

Die mit Gewebematerial zu beimpfenden Zellkulturen sollten zum Zeitpunkt der Beimpfung frisch sein (vier bis 48 Stunden alt) und sich aktiv vermehren (also nicht zusammenwachsen).

2. Beimpfen der Zellkulturen

Die Zellkulturen werden in zwei Verdünnungsstufen mit der antibiotikabehandelten Organsuspension beimpft: mit der Ausgangsverdünnung und mit einer 1:10-Verdünnung davon, wodurch Endverdünnungen des Gewebematerials im Zellkulturmedium von 1:100 bzw. 1:1 000 erreicht werden (um homologe Interferenz zu vermeiden). Es sind mindestens zwei Zelllinien zu beimpfen (vgl. Teil I. III.1). Das Volumenverhältnis zwischen Inokulum und Zellkulturmedium sollte ungefähr 1:10 betragen.

Für jede Verdünnung und jede Zelllinie ist eine Zellkulturfläche von mindestens 2 cm^2 zu verwenden; dies entspricht einer Mulde einer 24-Mulden-Kulturplatte. Die Verwendung von Kulturplatten wird zwar empfohlen, es können jedoch auch andere ähnlich oder größer dimensionierte Geräte verwendet werden.

3. Bebrüten der Zellkulturen

Die beimpften Zellkulturen werden sieben bis zehn Tage bei $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ bebrütet. Bei einem Farbumschlag des Zellkulturmediums von Rot nach Gelb als Indiz für eine Übersäuerung ist der pH-Wert mit steriler Bikarbonatlösung oder anderen Stoffen mit gleichwertiger Wirkung so einzustellen, dass eine Virusinfektion der Zellen möglich ist.

Zur Überprüfung der Infektionsanfälligkeit der Zellkulturen ist tiefgefrorene VHSV- und IHNV-Vorratslösung mindestens alle sechs Monate oder bei Verdacht auf verringerte Anfälligkeit zu titrieren. Ein empfohlenes Verfahren wird in Teil IV beschrieben.

4. Mikroskopische Untersuchung

Die beimpften Zellkulturen sind regelmäßig (mindestens dreimal wöchentlich) unter dem Mikroskop mit 40- bis 150facher Vergrößerung auf das Auftreten eines zytopathischen Effekts (CPE) zu überprüfen. Bei offenkundigem CPE ist sofort ein Virusnachweis gemäß Teil I.IV durchzuführen.

5. Anlegen einer Subkultur

Tritt nach sieben- bis zehntägiger Erstbebrütung kein zytopathischer Effekt auf, so ist eine Subkultur mit frischen Zellkulturen anzulegen, wobei eine ähnliche Zellfläche zu verwenden ist wie bei der Stammkultur.

Aliquote Mengen Nährmedium (Überstand) von sämtlichen Kulturen/Mulden der Stammkultur werden je nach Zelllinie sieben bis zehn Tage nach der Beimpfung zu einer Sammelprobe vereint. Die Sammelproben werden, wie in Teil I.III.2 beschrieben, unverdünnt und 1:10 verdünnt (wodurch Endverdünnungen des Überstands von 1:10 bzw. 1:100 erreicht werden) in homologe Zellkulturen verimpft. Alternativ können aliquote Mengen von 10 % des Nährmediums der Stammkultur direkt in eine Mulde mit einer frischen Zellkultur verimpft werden (Anlegen einer Subkultur von Mulde zu Mulde). Vor dem Beimpfen können die Lösungen mit dem IPNV-Antiserum in einer angemessenen Verdünnungsstufe gemäß Teil I.II.3 bebrütet werden.

Die beimpften Kulturen werden dann sieben bis zehn Tage bei 15 °C bebrütet und gemäß Teil I.III.4 überprüft.

Tritt innerhalb der ersten drei Tage der Bebrütung ein toxischer CPE auf, so kann in dieser Phase eine Subkultur angelegt werden. Die Zellen müssen dann jedoch sieben Tage bebrütet werden, und es ist eine weitere Subkultur anzulegen, die nochmals sieben Tage zu inkubieren ist. Entwickelt sich der toxische CPE nach drei Tagen, so sind die Zellen nur einmal zu übertragen und zu inkubieren, um eine Gesamtzeit von 14 Tagen ab der Erstbeimpfung zu erreichen. In den letzten sieben Tagen der Inkubation sollte keine Toxizität auftreten.

Kommt es trotz Antibiotikabehandlung zu Bakterienkontamination, so ist der Überstand vor dem Anlegen einer Subkultur bei 2 000 bis 4 000 x g und 2-5 °C 15-30 Minuten zu zentrifugieren und/oder durch ein 0,45-µm-Filter (Membran mit geringer Proteinbindung) zu filtrieren. Die Verfahren für das Anlegen einer Subkultur sind die gleichen wie bei toxischem CPE.

IV. Virusnachweis

1. Virusnachweisverfahren

Bei offenkundigem Auftreten eines zytopathischen Effekts in einer Zellkultur wird Nährmedium (Überstand) aufgefangen und nach einem oder mehreren der folgenden Verfahren untersucht: Neutralisation, IF, ELISA. Haben diese Tests innerhalb einer Woche keinen eindeutigen Virusnachweis erbracht, so ist der Überstand zum sofortigen Nachweis an ein nationales Referenzlaboratorium oder an das EU-Referenzlaboratorium für Fischseuchen weiterzuleiten.

2. Neutralisation

Aus dem aufgefangenen Überstand werden durch Zentrifugierung (2 000-4 000 x g) oder Membranfiltrierung (0,45 µm) mittels einer Membran mit geringer Proteinbindung Zellen entnommen, und der Überstand wird 1:100 und 1:10 000 im Zellkulturmedium verdünnt.

Aliquote Mengen der zwei Verdünnungen des Überstands werden jeweils mit gleichen Teilen der folgenden Reagenzien versetzt und einzeln 60 Minuten bei 15 °C bebrütet:

- Serum mit gruppenspezifischen VHSV-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- Serum mit gruppenspezifischen IHNV-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- Antiseren (gepoolt) gegen die einheimischen IPNV-Serotypen in einer Verdünnung von 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- Nur Nährmedium (Positivkontrolle)

Mindestens zwei Zellkulturen werden mit je 50 µl jeder Virus-Serum-Mischung beimpft und bei 15 °C bebrütet. Die Untersuchung auf CPE erfolgt wie in Teil I.III.4 beschrieben.

Einige VHSV-Stämme reagieren nicht in Neutralisationstests. Diese Isolate müssen durch IF oder ELISA identifiziert werden.

Alternativ können andere erprobte Neutralisationstests durchgeführt werden.

3. IF

Für jedes zu bestimmende Virusisolat sind mindestens acht Deckglas-Objektträger o. ä. mit Zellen zu überschichten, und zwar in einer Dichte, die nach 24stündiger Kultivierung eine 60 bis 90 %ige Konfluenz gewährleistet. Wegen des festen Anhaftens an Glasflächen werden zu diesem Zweck EPC-Zellen empfohlen, aber es können auch andere Zelllinien wie z. B. BF-2, RTG-2 oder FHM verwendet werden.

Sobald sich auf der Glasfläche ein Zellsediment gebildet hat (etwa eine Stunde nach dem Beschicken) oder nach 24stündigem Bebrüten der Kulturen wird das zu bestimmende Virus verimpft. Es werden vier Kulturen in einem Volumenverhältnis von 1:10 und vier weitere Kulturen in einem Volumenverhältnis von 1:1 000 verimpft. Diese werden dann 20-30 Stunden bei 15 °C bebrütet.

Nach der Bebrütung werden die Kulturen zweimal mit Eagle's MEM ohne Serum gespült, mit 80 % eiskaltem Aceton fixiert und im Wege eines Zweischichten-IFAT angefärbt. Die erste Reagenzschicht besteht aus poly- oder monoklonalen Antikörpern einer Bezugsqualität. Die zweite Reagenzschicht ist ein Fluorochromkonjugiertes Antiserum für das in der ersten Schicht verwendete Immunglobulin. Für jedes der getesteten Antiseren ist mindestens eine hochdosierte und eine niedrigdosierte Impfkultur anzufärben. Bei der Untersuchung sind auch geeignete Negativ- und Positivkontrollen durchzuführen. Dazu werden Fluorochrome wie FITC oder TRITC empfohlen.

Angefärbte Kulturen werden mit Glycerin-Kochsalzlösung angesetzt und unter UV-Bestrahlung betrachtet. Dazu sind Okulare mit 10- oder 12facher Vergrößerung und Objektivlinsen mit 25- bis 40facher Vergrößerung und numerischer Apertur von > 0,7 bzw. > 1,3 zu verwenden.

Die vorstehend beschriebene IF-Technik ist als Beispiel angegeben. Alternativ können (in Bezug auf Zellkultur, Fixierung und Bezugsantikörper) andere erprobte IF-Techniken angewandt werden.

⁽¹⁾ Oder gemäß den Angaben des Referenzlaboratoriums im Hinblick auf die mögliche Zytotoxizität der Antiseren.

4. ELISA

Die einzelnen Mulden der Mikrotiterplatten werden am Vortag der Untersuchung mit den gereinigten Immunglobulin-Fractionen der Bezugsantikörper in empfohlener Verdünnung beschichtet.

Nach dem Spülen mit PBS-Tween-20-Pufferlösung werden die Mulden mit dem zu bestimmenden Virus in zwei- oder vierfacher Verdünnung beschickt und 60 Minuten bei 37 °C zur Reaktion mit der Antikörperbeschichtung gebracht. Nach dem Spülen mit PBS-Tween-20-Pufferlösung werden biotinierte Antikörper einer der Antikörperbeschichtung entsprechenden Spezifität zugegeben und 60 Minuten bei 20 °C zur Reaktion gebracht. Nach nochmaligem Spülen wie vorstehend beschrieben wird HRP-konjugiertes Streptavidin zugegeben und eine Stunde bei 20 °C zur Reaktion gebracht. Nach dem letzten Spülen wird das gebundene Enzym mit Hilfe geeigneter ELISA-Substrate (OPD oder andere) sichtbar gemacht.

Das vorstehend beschriebene ELISA-Verfahren auf Biotin-Avidin-Basis ist nur ein Beispiel. Stattdessen können auch andere erprobte Varianten des ELISA-Tests verwendet werden.

TABELLE 1A

Untersuchungs- und Probenahmeregulung für Gebiete und Betriebe in nicht zugelassenen Gebieten während des zweijährigen Kontrollzeitraums vor der Erstzulassung als VHS- und/oder IHN-frei

(gemäß den Anhängen B und C der Richtlinie 91/67/EWG und den Bestimmungen in Teil I des vorliegenden Anhangs)

	Klinische Untersuchungen/Jahr (zwei Jahre)	Laboruntersuchungen/Jahr (zwei Jahre)	Laboruntersuchung auf Virus ⁽¹⁾	
			Zahl der Jungfische (Organmaterial)	Zahl der Brutfische (Ovarienflüssigkeit)
Binnenwassergebiete und -betriebe				
a) Zuchtbetriebe mit Brutanlagen	2	2	120 (1. Untersuchung) ⁽²⁾ 150 (2. Untersuchung)	30 (1. Untersuchung) ⁽³⁾ 0 (2. Untersuchung)
b) reine Brutanlagen	2	1	0	150 (1. oder 2. Untersuchung) ⁽³⁾
c) Zuchtbetriebe ohne Brutanlagen	2	2	150 (1. und 2. Untersuchung)	0
Küstengebiete und -betriebe				
a) Zuchtbetrieb mit Brutanlagen	2	2	120 (1. Untersuchung) 150 (2. Untersuchung)	30 (1. Untersuchung) ⁽³⁾ 0 (2. Untersuchung)
b) Salmonidenzuchtbetriebe ohne Brutanlagen	2	2	30 (1. und 2. Untersuchung) ⁽⁴⁾	0
c) Zuchtbetriebe (keine Salmoniden) ohne Brutanlagen	2	2	150 (1. und 2. Untersuchung)	0

Höchstzahl Fische je Becken: 10

⁽¹⁾ Wenn die in den Teilen I.I.1, I.I.2.1.b und III genannten Anforderungen erfüllt sind, kann alternativ mit dem kleineren Probenumfang gemäß Tabelle 1B gearbeitet werden.

⁽²⁾ Klinische Untersuchungen.

⁽³⁾ Wenn keine Ovarienflüssigkeit entnommen werden kann, dürfen im Ausnahmefall Organproben genommen werden.

⁽⁴⁾ Die Proben sind frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu nehmen.

TABELLE 1B

Untersuchungs- und Probenahmeregulung für den zweijährigen Kontrollzeitraum vor der Erstzulassung als VHS- und/oder IHN-frei in Gebieten und Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten mit amtlich anerkannter Freiheit von diesen Seuchen

(gemäß den Anhängen B und C der Richtlinie 91/67/EWG und den Bestimmungen der Teile I und III des vorliegenden Anhangs)

	Klinische Untersuchungen/Jahr (zwei Jahre)	Laboruntersuchungen/Jahr (zwei Jahre)	Laboruntersuchung auf Virus	
			Zahl der Jungfische (Organmaterial)	Zahl der Brutfische (Ovarienflüssigkeit)
Binnenwassergebiete und -betriebe				
a) Zuchtbetriebe mit Brutanlagen	2	2	0 (1. Untersuchung) ⁽¹⁾ 30 (2. Untersuchung)	30 (1. Untersuchung) ⁽²⁾ 0 (2. Untersuchung)
b) reine Brutanlagen	2	1	0	30 (1. oder 2. Untersuchung) ⁽²⁾
c) Zuchtbetriebe ohne Brutanlagen	2	2	30 (1. und 2. Untersuchung)	0
Küstengebiete und -betriebe				
a) Zuchtbetrieb mit Brutanlagen	2	2	0 (1. Untersuchung) 30 (2. Untersuchung)	30 (1. Untersuchung) ⁽²⁾ 0 (2. Untersuchung)
b) Salmonidenzuchtbetriebe ohne Brutanlagen	2	2	30 (1. und 2. Untersuchung) ⁽³⁾	0
c) Zuchtbetriebe (keine Salmoniden) ohne Brutanlagen	2	2	30 (1. und 2. Untersuchung)	0

Höchstzahl Fische je Becken: 10

⁽¹⁾ Klinische Untersuchungen.

⁽²⁾ Wenn keine Ovarienflüssigkeit entnommen werden kann, dürfen im Ausnahmefall Organproben genommen werden.

⁽³⁾ Die Proben sind frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu nehmen.

TABELLE 1C

Untersuchungs- und Probenahmeregulung für Gebiete und Betriebe in nicht zugelassenen Gebieten zur Aufrechterhaltung der Zulassung als VHS- und/oder IHN-frei

(gemäß den Anhängen B und C der Richtlinie 91/67/EWG und den Bestimmungen in Teil I des vorliegenden Anhangs)

	Klinische Untersuchungen/Jahr	Zahl der Fische in der Probe für Laboruntersuchung ⁽¹⁾	
		Zahl der Jungfische (Organmaterial)	Zahl der Brutfische (Ovarienflüssigkeit)
Binnenwassergebiete und -betriebe			
a) Zuchtbetriebe mit Brutanlagen	2	20 (1. oder 2. Untersuchung)	10 (1. oder 2. Untersuchung) ⁽²⁾

	Klinische Untersuchungen/Jahr	Zahl der Fische in der Probe für Laboruntersuchung ⁽¹⁾	
		Zahl der Jungfische (Organmaterial)	Zahl der Brutfische (Ovarienflüssigkeit)
b) reine Brutanlagen	2	0	30 (1. oder 2. Untersuchung) ⁽²⁾
c) Zuchtbetriebe ohne Brutanlagen	2	30	0
Küstengebiete und -betriebe			
a) Zuchtbetrieb mit Brutanlagen	2	20 (1. oder 2. Untersuchung)	10 (1. oder 2. Untersuchung) ⁽²⁾
b) Zuchtbetrieb ohne Brutanlagen	2	30 ⁽³⁾	0

Höchstzahl Fische je Becken: 10

⁽¹⁾ In zugelassenen Gebieten brauchen jedes Jahr nur in 50 % der Fischzuchtbetriebe nach dem Rotationsverfahren Proben genommen zu werden. In zugelassenen Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten müssen jedes Jahr Proben genommen werden.

⁽²⁾ Wenn keine Ovarienflüssigkeit entnommen werden kann, dürfen im Ausnahmefall Organproben genommen werden.

⁽³⁾ Die Proben sind frühestens drei Wochen nach der Umsetzung der Fische von Süß- in Salzwasser zu nehmen.

TEIL II

Diagnoseverfahren zur Bestätigung von VHS und IHN bei Seuchenverdacht

Zur IHN- und VHS-Diagnose ist eines oder mehrere der folgenden Verfahren durchzuführen:

- A. Herkömmliche Virusisolierung mit anschließendem serologischen Virusnachweis,
- B. Virusisolierung mit gleichzeitigem serologischen Virusnachweis,
- C. andere Diagnoseverfahren (IFAT, ELISA).

Die Bestätigung des ersten VHS- und/oder IHN-Ausbruchs in Betrieben in zugelassenen Gebieten darf sich nicht nur auf Verfahren C stützen. Die Verfahren A oder B sind ebenfalls anzuwenden.

Dem zur virologischen Untersuchung bestimmten Gewebematerial ist in einigen Fällen unter Umständen auch zusätzliches Material für die bakteriologische, parasitologische, histologische oder sonstige Untersuchung beizufügen, damit eine Differentialdiagnose durchgeführt werden kann.

A. Herkömmliche Virusisolierung mit anschließendem serologischen Virusnachweis

I.1. Probenahme

Zur Untersuchung sind mindestens zehn Fische mit typischen IHN- bzw. VHS-Symptomen zu wählen.

I.2. Aufbereitung und Einsendung der Fischproben

Siehe Teil I.I.3

I.3. Entnahme von zusätzlichem Probenmaterial

Siehe Teil I.I.4

II. Aufbereitung der Proben für die virologische Untersuchung

Siehe Teil I.II

III. Virologische Untersuchung

Siehe Teil I.III

IV. Virusnachweis

Siehe Teil I.IV

B. Virusisolierung mit gleichzeitigem serologischen Virusnachweis

I.1. Probenahme

Siehe Teil II.A.1.1

I.2. Aufbereitung und Einsendung der Fischproben

Siehe Teil I.I.3

I.3. Entnahme von zusätzlichem Probenmaterial

Siehe Teil I.I.4

II.1. Homogenisieren der Organe

Siehe Teil I.II.2

II.2. Zentrifugieren des Homogenats

Das Homogenat wird in einer auf 2 bis 5 °C gekühlten Zentrifuge bei 2 000 bis 4 000 × g 15 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wird aufgefangen und vier Stunden bei 15 °C mit Antibiotika (z. B. Gentamycin 1 mg/ml) behandelt oder durch eine Membran mit geringer Proteinbindung membranfiltriert (0,45 µm).

II.3. Behandlung des Überstands mit Diagnoseantisera

Die mit Antibiotika behandelte oder membranfiltrierte Organsuspension wird 1:10 und 1:1 000 in Zellkulturmedium verdünnt; aliquote Mengen werden mit gleichen Teilen der in Teil I.IV.2 genannten Reagenzien gemischt und 60 Minuten bei 15 °C bebrütet.

III.1. Zellkulturen und Nährböden

Siehe Teil I.III.1

III.2. Beimpfen der Zellkulturen

Mindestens zwei Zellkulturen je Zelllinie werden mit je 50 µl jeder (gemäß Teil II.B.II.3 aufbereiteten) Virus-Serum-Mischung beimpft.

III.3. Bebrüten der Zellkulturen

Siehe Teil I.III.3

III.4. Mikroskopische Untersuchung

Die beimpften Zellkulturen werden täglich unter dem Mikroskop bei 40- bis 150facher Vergrößerung auf das Auftreten eines zytopathischen Effekts (CPE) überprüft. Verhindert eines der verwendeten Antisera das Auftreten eines zytopathischen Effekts, so gilt das Virus als nachgewiesen.

Verhindert keines der verwendeten Antisera das Auftreten eines zytopathischen Effekts, so ist das Nachweisverfahren gemäß Teil I.IV anzuwenden.

III.5. Subkultivierung

Tritt nach sieben bis zehn Tagen kein CPE auf, so ist von den mit Überstand und Medium (vgl. Teil II.B.II.3) beimpften Kulturen gemäß Teil I.III.5 eine Subkultur anzulegen.

C. Andere Diagnoseverfahren

Gemäß Teil I.II.2 aufbereiteter Überstand kann gemäß Teil I.IV.3 bzw. Teil I.IV.4 einem IFAT- bzw. ELISA-Test unterzogen werden. Diese Schnellverfahren müssen durch eine virologische Untersuchung gemäß Punkt A oder B innerhalb von 48 Stunden nach der Probenahme ergänzt werden, wenn

- a) ein Negativbefund vorliegt,
oder
- b) bei Probematerial, das bei einem ersten Ausbruch von IHN oder VHS in einem zugelassenen Gebiet entnommen wurde, ein Positivbefund vorliegt.

Gewebematerial kann nach anderen Diagnoseverfahren (z. B. RT-PCR, IF bei Gefrierschnitten oder immunhistochemische Analysen bei formalin-fixiertem Material) untersucht werden. Diese Verfahrenstechniken müssen stets durch Verimpfung von nicht fixiertem Material auf Zellkulturen ergänzt werden.

TEIL III

Nachweis der VHS- und/oder IHN-Freiheit in Gebieten oder Betrieben in nicht zugelassenen Gebieten

Leitlinien und Kriterien für ein amtliches Untersuchungsprogramm

1. Ein Untersuchungsprogramm kann nur eingeleitet werden
 - entweder nach einem amtlich anerkannten Seuchenbekämpfungsprogramm gegen VHSV und/oder IHNV mit Entfernung sämtlicher Fische aus dem Betrieb, Reinigung, Desinfektion und Stilllegung vor der Wiederbelegung mit Fischen von zugelassenen Betrieben
oder
 - in Fischzuchtbetrieben, in denen noch keine Infektion mit VHSV oder IHNV aufgetreten ist.
2. Das Untersuchungsprogramm muss sich auf klinische und Laboruntersuchungen stützen.
3. Das Programm muss zwei Untersuchungen jährlich gemäß den Leitlinien in Teil I umfassen.

4. Bei mindestens einer der jährlich durchzuführenden Untersuchungen sind in jedem Betrieb 30 Proben von Fischgewebe und/oder Ovarienflüssigkeit zu entnehmen. Die Proben sind gemäß den Teilen I, II und IV auszuwählen, aufzubereiten und der Laboruntersuchung zu unterziehen.
5. Das Untersuchungsprogramm ist über mindestens vier Jahre in allen Betrieben des zuzulassenden Gebiets oder (in einem nicht zugelassenen Gebiet) in dem zuzulassenden Betrieb durchzuführen.
6. Das Programm wird nur dann amtlich anerkannt, wenn keine Fälle von VHS oder IHN aufgetreten sind oder nachgewiesen wurden (weder klinische Infektionen noch Virusisolierungen).

TEIL IV

Titrimationsverfahren zur Überprüfung der Infektionsanfälligkeit der Zellkulturen

Empfohlene Verfahren für die Titration gemäß Teil I.III.3:

Es sind mindestens zwei VHSV-Isolate und ein IHN-Isolat zu verwenden. Die Isolate sollten repräsentativ für die wichtigsten Virusgruppen in der EU sein. Im Fall von VHSV ist z. B. ein pathogenes Isolat von Regenbogenforelle in Süßwasser und ein für Steinbutt pathogenes Salzwasserisolat zu wählen, im Fall von IHN ist ein für Regenbogenforelle pathogener europäischer Stamm zu wählen. Es sollten definierte Isolate aus den Mitgliedstaaten verwendet werden. Das Gemeinschaftliche Referenzlaboratorium kann Referenzisolate zur Verfügung stellen.

Viruschargen werden im Fall von VHSV auf BF-2- oder RTG-2-Zellen und im Fall von IHN auf EPC- oder FHM-Zellen in wenigen Zellkulturpassagen in Kulturkolben gewonnen. Es sollte ein Zellkulturmedium mit mindestens 10 % Serum verwendet werden. Für die Beimpfung ist eine niedrige MOI zu verwenden (< 1).

Bei vollständigem CPE wird das Virus durch 15-minütiges Zentrifugieren des Zellkulturüberstands bei $2\,000 \times g$ gewonnen, steril membranfiltriert ($0,45 \mu\text{m}$) und in etikettierte Kryoröhrchen verteilt. Das Virus wird bei -80°C aufbewahrt.

Eine Woche nach dem Einfrieren werden drei Röhrchen mit jedem Virus unter kaltem Wasser aufgetaut und auf ihren jeweiligen Zelllinien titriert. Jedes Virusisolat wird mindestens alle sechs Monate oder bei Verdacht auf verringerte Anfälligkeit der Zelllinien aufgetaut und titriert.

Die Titrimationsverfahren sind ausführlich zu beschreiben und jedes Mal auf die gleiche Weise durchzuführen.

Titration mit Verdünnung bis zum Endpunkt sollte mindestens sechs Wiederholungen jedes Verdünnungsschritts umfassen. Die Titer werden mit zuvor ermittelten Titern verglichen. Fällt der Titer einer der drei Virusisolate um einen Faktor von 2 log oder mehr unter den ursprünglichen Titer, so sollte die Zelllinie nicht mehr für Untersuchungszwecke verwendet werden.

Wenn im Labor unterschiedliche Zelllinien vorhanden sind, sollte jede Zelllinie getrennt überprüft werden.

Aufzeichnungen sind mindestens zehn Jahre aufzubewahren.

TEIL V

Akronyme und Abkürzungen

BF-2	Bluegill fry — 2 (Zelllinie)
CPE	Zytopathischer Effekt
CRL	Gemeinschaftliches Referenzlaboratorium für Fischseuchen
ELISA	Enzymgebundener Immunoassay
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (Zelllinie)
FHM	Fathead minnow (Zelllinie)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulphonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IFAT	Indirekter Fluoreszenz-Antikörpertest
IHN(V)	Infektiöse Hämatopoetische Nekrose (Virus)
IPN(V)	Infektiöse Pankreasnekrose (Virus)
MEM	Minimalmedium

MOI	Multiplizität der Infektion (Verhältnis der Zahl zugegebener infektiöser Viruspartikel zu einer bekannten Zahl von Zellen in einer Kultur)
OPD	Ortho-Phenylendiamin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RTG-2	Rainbow trout gonad (Zelllinie)
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
VHS(V)	Virale hämorrhagische Septikämie (Virus)
