

II

(Actos cuja publicação não é uma condição da sua aplicabilidade)

COMISSÃO

DECISÃO DA COMISSÃO

de 22 de Fevereiro de 2001

que estabelece os planos de amostragem e os métodos de diagnóstico para detecção e confirmação de certas doenças dos peixes e revoga a Decisão 92/532/CEE

[notificada com o número C(2001) 426]

(Texto relevante para efeitos do EEE)

(2001/183/CE)

A COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS,

Tendo em conta o Tratado que institui a Comunidade Europeia,

Tendo em conta a Directiva 91/67/CEE do Conselho, de 28 de Janeiro de 1991, relativa às condições de polícia sanitária que regem a introdução no mercado de animais e produtos da aquicultura ⁽¹⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Directiva 98/45/CE ⁽²⁾, e, nomeadamente, o seu artigo 15.º,

Considerando o seguinte:

- (1) Os planos de amostragem e os métodos de diagnóstico a aplicar na detecção e confirmação de doenças dos animais da aquicultura foram definidos na Decisão 92/532/CEE da Comissão ⁽³⁾, com a última redacção que lhe foi dada pela Decisão 96/240/CE ⁽⁴⁾.
- (2) Desde a adopção da Decisão 92/532/CEE, registou-se uma evolução dos conhecimentos técnicos e científicos. A Directiva 91/67/CE foi alterada. É, pois, necessário actualizar os planos de amostragem e os métodos de diagnóstico.
- (3) As alterações a introduzir dizem respeito à análise e identificação dos vírus responsáveis pela septicémia hemorrágica viral (VHS) e pela necrose hematopoiética infecciosa (IHN), bem como as alterações em conformidade com a Directiva 91/67/CEE.
- (4) Foi consultado o laboratório comunitário de referência para as doenças de peixes, instituído pela Directiva 93/53/CEE do Conselho ⁽⁵⁾.
- (5) Por motivos de clareza, devem revogar-se os planos de amostragem e os métodos de diagnóstico para a

detecção e confirmação de determinadas doenças de peixes estabelecidos pela Decisão 92/532/CEE.

- (6) As medidas previstas na presente decisão estão em conformidade com o parecer do Comité Veterinário Permanente,

ADOPTOU A PRESENTE DECISÃO:

Artigo 1.º

Os planos de amostragem e os métodos de diagnóstico a aplicar na detecção e confirmação da septicémia hemorrágica viral (VHS) e da necrose hematopoiética infecciosa (IHN) são estabelecidos em anexo.

Artigo 2.º

É revogada a Decisão 92/532/CEE.

Artigo 3.º

Os Estados-Membros são os destinatários da presente decisão.

Feito em Bruxelas, em 22 de Fevereiro de 2001.

Pela Comissão

David BYRNE

Membro da Comissão

⁽¹⁾ JO L 46 de 19.2.1991, p. 1.

⁽²⁾ JO L 189 de 3.7.1998, p. 12.

⁽³⁾ JO L 337 de 21.11.1992, p. 18.

⁽⁴⁾ JO L 79 de 29.3.1996, p. 19.

⁽⁵⁾ JO L 175 de 19.7.1993, p. 23.

ANEXO

PLANOS DE AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA SEPTICÉMIA HEMORRÁGICA VIRAL (VHS) E DA NECROSE HEMATOPOIÉTICA INFECCIOSA (IHN)

INTRODUÇÃO

O presente anexo:

- a) Estabelece directrizes e exigências mínimas aplicáveis aos planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a detecção e confirmação da presença de septicémia hemorrágica viral (VHS) e de necrose hematopoiética infecciosa (IHN);
- b) Inclui as disposições dos anexos B e C da Directiva 91/67/CEE referentes à obtenção e à manutenção do estatuto das zonas e das explorações em zonas não aprovadas;
- c) Estabelece disposições tendo em vista o diagnóstico correcto da VHS e da IHN, bem como o reconhecimento oficial do estatuto das zonas e das explorações em zonas não aprovadas, em conformidade com os artigos 5.º e 6.º da Directiva 91/67/CEE;
- d) É dirigido às autoridades responsáveis pelo controlo da VHS e da IHN, bem como ao pessoal de laboratório que executa os exames respeitantes às doenças em causa. Neste contexto, confere-se especial destaque aos procedimentos de amostragem, aos princípios e aplicações dos ensaios laboratoriais e à avaliação dos respectivos resultados, bem como às técnicas laboratoriais específicas. Todavia, sempre que tal se revele adequado, os laboratórios podem introduzir alterações nos ensaios descritos no presente anexo ou utilizar ensaios diversos, na condição de poder demonstrar-se que apresentam a mesma sensibilidade e especificidade.

A parte I inclui os planos de amostragem e métodos de diagnóstico para a vigilância da VHS e da IHN, tendo em vista a obtenção e manutenção do estatuto de aprovada de uma zona ou de uma exploração em zona não aprovada.

A parte II descreve os procedimentos de diagnóstico para a confirmação da VHS e da IHN em caso de suspeita de focos.

A parte III estabelece os critérios e as directrizes aplicáveis a um programa oficial de inspecção sanitária para comprovação de um historial de indemnidade à VHS e/ou à IHN.

A parte IV apresenta recomendações sobre o procedimento de titulação dos vírus VHS e IHN, de modo a verificar a susceptibilidade das culturas celulares à infecção.

A parte V é constituída por uma lista de acrónimos e abreviaturas.

PARTE I

Planos de amostragem e métodos de diagnóstico aplicáveis à vigilância da VHS e da IHN numa zona ou numa exploração em zona não aprovada com o objectivo de obter ou manter o estatuto de aprovada**I. Inspeções e amostragem**

1. *Disposições gerais aplicáveis às inspeções clínicas, à colheita e à selecção de amostras para a vigilância de zonas ou explorações em zonas não aprovadas com o objectivo de obter ou manter o estatuto de aprovadas no que respeita à VHS e/ou à IHN*

As inspeções clínicas e a colheita de amostras de tecidos de peixes e/ou de fluido ovariano a efectuar em zonas ou em explorações de zonas não aprovadas com o objectivo de obter ou manter o estatuto de aprovadas no que respeita à VHS e/ou à IHN, em conformidade com os anexos B e C da Directiva 91/67/CEE, encontram-se resumidas nos quadros 1A, 1B e 1C. Os pontos I.I.2-I.I.4 incluem disposições suplementares. Os quadros 1A e 1B não são aplicáveis às novas explorações nem às explorações que retomam as suas actividades com peixes, ovos ou gâmetas provenientes de uma zona aprovada ou de uma exploração aprovada de uma zona não aprovada, desde que sejam conformes às exigências estabelecidas no anexo C, pontos I.A.6, alínea a) ou I.A.6, alínea b), ou II.A.3, alínea a) ou II.A.3, alínea b), da Directiva 91/67/CEE.

As inspeções clínicas devem ser efectuadas no período compreendido entre Outubro e Junho ou quando a temperatura da água for inferior a 14 °C. Se as explorações forem inspeccionadas clinicamente duas vezes por ano, os intervalos entre as inspeções devem ser de, pelo menos, quatro meses. Todas as unidades de produção (lagos, tanques, aquários, gaiolas de rede, etc.) devem ser inspeccionadas para a pesquisa de peixes mortos, fracos ou com um comportamento anormal. Se possível, deve ser dada especial atenção à zona de escoamento da água, onde os peixes fracos têm tendência a acumular-se, devido ao fluxo de água.

As amostras de peixes devem ser seleccionadas do seguinte modo:

- se estiver presente a truta arco-íris, a totalidade da amostra deve ser constituída por peixes desta espécie. Se a truta arco-íris não estiver presente, a amostra deve conter peixes de todas as outras espécies presentes que sejam sensíveis à VHS e/ou IHN (em conformidade com a lista do anexo A da Directiva 91/67/CEE do Conselho). A amostra deve constituir uma representação proporcional das espécies,
- se for utilizada mais do que uma fonte hídrica na produção de peixe, devem estar presentes na amostra peixes representativos de todas as fontes hídricas,
- no caso de estarem presentes peixes fracos, mortos recentemente (mas não em decomposição) ou com um comportamento anormal, é necessária a sua inclusão na amostra. Se esses peixes não se encontrarem presentes, a amostra deve ser constituída por peixes de aspecto normal e saudável, recolhidos de modo a fornecer uma representação proporcional de todas as partes da exploração, bem como de todas as classes anuais.

2. Disposições específicas, nomeadamente no que respeita à colheita de amostras, aplicáveis à vigilância de zonas ou explorações em zonas não aprovadas com o objectivo de obter ou manter o estatuto de aprovadas no que respeita à VHS e/ou à IHN

1. Uma zona ou uma exploração em zona não aprovada colocada sob vigilância oficial pode obter o estatuto de aprovada no que respeita à VHS e/ou à IHN de um dos seguintes modos:

a) Modelo A — programa de vigilância bienal:

Após pelo menos dois anos de ausência de sinais clínicos, ou outro tipo de sinais, de VHS e/ou IHN, todas as explorações da zona, e quaisquer explorações em zonas não aprovadas, a aprovar, devem ser objecto de uma inspecção sanitária bianual por um período de dois anos. No período bienal de controlo que precede a obtenção do estatuto de aprovação, deve continuar a verificar-se a ausência de sinais clínicos, ou outro tipo de sinais, de VHS e/ou IHN, prosseguindo a colheita de amostras para exame em conformidade com o quadro 1A. Além disso, as amostras devem ser seleccionadas, preparadas e examinadas do modo descrito nos pontos I.I.-I.IV, devendo os exames laboratoriais produzir resultados negativos no que respeita à VHS e/ou à IHN;

ou

b) Modelo B — programa de vigilância bienal com amostras de dimensão reduzida:

Na sequência de um programa oficial de inspecção sanitária comprovativo de um historial de indemnidade à VHS e/ou à IHN por um mínimo de quatro anos, todas as explorações da zona, e quaisquer explorações em zonas não aprovadas, a aprovar, devem ser objecto de uma inspecção sanitária bianual por um período de dois anos. No período bienal de controlo que precede a obtenção do estatuto de aprovação, deve continuar a verificar-se a ausência de sinais clínicos, ou outro tipo de sinais, de VHS e/ou IHN, prosseguindo a colheita de amostras para exame em conformidade com o quadro 1B. Além disso, as amostras devem ser seleccionadas, preparadas e examinadas do modo descrito nos pontos I.I.-I.IV, devendo os exames laboratoriais produzir resultados negativos no que respeita à VHS e/ou à IHN. Para que um programa de inspecção sanitária seja reconhecida pelos serviços oficiais no que respeita à comprovação da indemnidade à VHS e/ou à IHN, deverá satisfazer os critérios e directrizes estabelecidos na parte III.

2. Disposições específicas aplicáveis à aprovação de novas explorações e de explorações que retomam actividades com peixes, ovos ou gâmetas provenientes de zonas aprovadas ou de uma exploração aprovada numa zona não aprovada.

As novas explorações e as explorações que retomam as suas actividades com peixes, ovos ou gâmetas provenientes de zonas aprovadas ou de uma exploração aprovada numa zona não aprovada podem obter o estatuto de aprovadas em conformidade com as exigências estabelecidas no anexo C, pontos I.A.6a/b ou II.A.3.a/b, da Directiva 91/67/CEE. As disposições em matéria de colheita de amostras estabelecidas nos modelos A e B *supra* (pontos I.I.2.1. a e I.I.2.1.b) não são aplicáveis às explorações em causa.

3. Programa de vigilância para a manutenção do estatuto de aprovação no que respeita à VHS e/ou à IHN.

De modo a que uma zona, ou uma exploração numa zona não aprovada, mantenha o estatuto de aprovada no que respeita à VHS e/ou à IHN, as inspecções e a colheita de amostras para exame devem efectuar-se em conformidade com o quadro 1C. As amostras devem ser seleccionadas, preparadas e examinadas do modo descrito nos pontos I.I.-I.IV e os exames laboratoriais devem produzir resultados negativos no que respeita à VHS e/ou à IHN.

3. Preparação e envio das amostras de peixes

Antes do envio ou da transferência para o laboratório, devem extrair-se dos peixes, com o auxílio de instrumentos de dissecação, partes dos órgãos a examinar, transferidas para tubos de plástico esterilizados contendo meio de transporte, isto é, meio de cultura celular com 10 % de soro de vitelo e antibióticos. Recomenda-se uma mistura de 200 u.i. de penicilina, 200 µg de estreptomina e 200 µg de canamicina por mililitro, mas podem igualmente ser utilizados outros antibióticos de eficácia comprovada. O material tecidual a examinar é constituído pelo baço, o rim anterior e ainda o coração ou o encéfalo. Em alguns casos, deve examinar-se o fluido ovariano (quadro 1A-C).

Podem recolher-se fluido ovariano ou pedaços de órgãos de, no máximo, 10 peixes (quadro 1A-C) para um tubo esterilizado contendo pelo menos 4 ml de meio de transporte, constituindo uma amostra composta. O tecido de cada amostra deve pesar, no mínimo, 0,5 g.

Os tubos devem ser colocados em recipientes isolados (por exemplo, caixas de poliestireno de parede espessa), com uma quantidade de gelo suficiente ou blocos de congelação, de modo a assegurar a refrigeração das amostras durante o transporte para o laboratório. Deve evitar-se a congelação. A temperatura da amostra durante o transporte não deve, em caso algum, exceder 10 °C, devendo a caixa conter ainda gelo à chegada ou um ou mais blocos encontrar-se ainda parcial ou totalmente congelados.

O exame virológico deve ser iniciado logo que possível e antes de decorridas 48 horas da colheita de amostras. Em casos excepcionais (¹), o exame virológico pode ter início, o mais tardar, 72 horas após a colheita, na condição de o material a examinar estar protegido por meio de transporte e de terem sido respeitadas as condições de temperatura exigidas durante o transporte (ponto I.I.3, 3.º parágrafo).

Podem também ser enviados para o laboratório peixes inteiros, se puderem ser respeitadas as condições de temperatura exigidas durante o transporte. Os peixes inteiros podem ser embrulhados em papel absorvente, devendo depois ser expeditos em sacos de plástico, refrigerados conforme descrito. Podem também ser enviados peixes vivos.

A embalagem e a rotulagem devem ser efectuadas em conformidade com a regulamentação nacional e internacional adequada em vigor.

4. Colheita de material suplementar de diagnóstico

Com o acordo do laboratório de diagnóstico em questão, podem também ser colhidos e preparados para exames suplementares outros tecidos de peixes.

II. Preparação de amostras para exame virológico

1. Congelação em casos excepcionais

Sempre que surjam dificuldades de ordem prática (por exemplo, condições meteorológicas adversas, dias de descanso, problemas laboratoriais, etc.) que impossibilitem a inoculação das células nas 48 horas subsequentes à colheita das amostras de tecidos, podem congelar-se estas últimas num meio de cultura celular efectuando-se o exame virológico no prazo de 14 dias. Todavia, o tecido deve se congelado e descongelado uma única vez antes do exame. Devem manter-se registos que especifiquem os motivos de cada congelamento de amostras de tecido; (nomeadamente intempéries, morte de linhas celulares, etc.).

2. Homogeneização dos órgãos

No laboratório, os tecidos dos tubos devem ser completamente homogeneizados (num misturador ou almofariz e pilão com areia esterilizada) e em seguida suspensos no meio de transporte original.

Caso a amostra seja constituída por peixes inteiros com menos de 4 cm de comprimento, a amostra deve ser picada com uma tesoura ou um bisturi esterilizados após remoção da parte do corpo posterior à cloaca. Caso a amostra seja constituída por peixes inteiros de comprimento compreendido entre 4 e 6 cm, devem retirar-se as vísceras, incluindo os rins. Se a amostra for constituída por peixes inteiros com mais de 6 cm de comprimento, as amostras de tecidos são colhidas em conformidade com o ponto I.I.3. As amostras são picadas com tesouras ou bisturis esterilizados, homogeneizadas do modo descrito *supra* e suspensas num meio de transporte.

A proporção final entre o material tecidular e o meio de transporte deve ser ajustada a 1:10.

3. Centrifugação do material homogeneizado

O material homogeneizado é centrifugado a 2 000-4 000 × g durante 15 minutos, numa centrifugadora refrigerada a 2-5 °C; o sobrenadante é recolhido e tratado com antibióticos, durante quatro horas a 15 °C ou até ao dia seguinte a 4 °C, podendo para tal utilizar-se, por exemplo, 1 mg/ml de gentamicina.

Se a expedição da amostra tiver sido efectuada no meio de transporte (isto é, em presença de antibióticos), pode dispensar-se o tratamento do sobrenadante com antibióticos.

O tratamento com antibiótico tem por objectivo evitar a contaminação bacteriana das amostras e tornar desnecessária a filtração com filtros de membrana.

Se o sobrenadante for armazenado a -80 °C no prazo de 48 horas após a colheita da amostra, pode ser descongelado e reutilizado uma única vez para exame virológico.

(¹) Isto é, caso os peixes sejam capturados em zonas bastante remotas sem possibilidade de expedição diária.

Caso surjam problemas práticos (avaria da estufa, problemas de culturas celulares, etc.) que impossibilitem a inoculação de células nas 48 horas seguintes à colheita das amostras, pode proceder-se à congelação do sobrenadante a -80°C , devendo o exame virológico ser realizado nos 14 dias que se seguem.

Antes da inoculação das células, o sobrenadante é misturado em partes iguais com uma mistura devidamente diluída de anti-soros dos serótipos indígenas do vírus da necrose pancreática infecciosa e incubado assim durante, no mínimo, uma hora a 15°C ou, no máximo, 18 horas a 4°C . O título do anti-soro deve ser de, pelo menos, 1: 2000 num teste de neutralização com placas a 50 %.

O tratamento de todos os inóculos com anti-soro do vírus da necrose pancreática infecciosa (um vírus que, nalgumas regiões da Europa, ocorre em 50 % das amostras de peixe) destina-se a evitar o desenvolvimento do efeito citopatogénico devido ao vírus da necrose infecciosa nas culturas celulares inoculadas. Tal reduzirá a duração dos exames virológicos e o número de casos em que a ocorrência de efeito citopatogénico poderia ser considerada potencialmente indicativa da VHS ou da IHN.

Caso as amostras provenham de unidades de produção consideradas indemnes à necrose pancreática infecciosa, pode omitir-se o tratamento dos inóculos com anti-soro de vírus dessa doença.

III. Exame virológico

1. Culturas celulares e meios

As células BF-2 ou RTG-2 e EPC ou FHM são cultivadas num meio adequado, por exemplo MEM de Eagle ou suas variantes, entre 20°C e 30°C , com um suplemento de soro de bovino fetal a 10 % e antibiótico em concentrações-padrão.

Se as células forem cultivadas em tubos fechados, recomenda-se que o meio seja tamponado com bicarbonato. O meio utilizado para a cultura celular em unidade abertas pode ser tamponado com tris-HCl (23 mM) e bicarbonato de sódio (6 mM). O pH deve ser de $7,6 \pm 0,2$.

As culturas celulares a utilizar na inoculação de material tecidular devem ser jovens (entre quatro e 48 horas de idade) e registar um crescimento activo (não confluyente aquando da inoculação).

2. Inoculação das culturas celulares

A suspensão de tecidos orgânicos tratados com antibióticos é inoculada em culturas celulares com duas concentrações, isto é, a concentração original e a diluição desta a 1: 10, com diluições finais de material tecidular em meio de cultura celular de 1:100 e de 1:1 000, respectivamente (de modo a evitar a interferência de homólogos). Têm de ser inoculadas pelos menos duas linhas de células (ver ponto III.1 da parte I). A relação entre o volume de inóculo e o volume de meio de cultura celular deve ser próxima de 1:10.

Para cada diluição e linha de células, deve utilizar-se uma área celular mínima de cerca de 2 cm^2 , correspondente a uma cavidade num tabuleiro de cultura celular com 24 cavidades. Recomenda-se a utilização de tabuleiros de cultura celular, mas são também aceites outras unidades com áreas de crescimento similares ou superiores.

3. Incubação das culturas celulares

As culturas celulares inoculadas são incubadas a 15°C durante sete a 10 dias. Se a cor do meio da cultura celular mudar de vermelho para amarelo, indicando uma acidificação do meio, deve proceder-se a um ajustamento do pH com uma solução estéril de bicarbonato ou uma substância equivalente, de modo a assegurar a sensibilidade das células à infecção do vírus.

Com uma frequência mínima semestral, ou no caso de se suspeitar um decréscimo da susceptibilidade celular, é efectuada uma titulação das quantidades congeladas de VVHS e VIHN, de modo a verificar a sensibilidade das culturas celulares à infecção. A parte IV inclui um procedimento recomendado para tal.

4. Microscopia

As culturas celulares inoculadas devem ser inspeccionadas regularmente (pelo menos três vezes por semana), com uma ampliação de 40-150x, para a pesquisa de eventuais efeitos citopatogénicos. Caso seja observado um efeito citopatogénico evidente, devem iniciar-se de imediato os procedimentos de identificação do vírus, em conformidade com o ponto I.IV.

5. Subcultura

Caso não tenham ocorrido efeitos citopatogénicos após a primeira incubação de sete a 10 dias, procede-se à subcultura para culturas celulares recentes, utilizando uma área celular similar à da cultura primária.

Sete a 10 dias após a inoculação reúnem-se, de acordo com a linha de células, alíquotas do meio (sobrenadante) de todas as culturas/cavidades que constituem a cultura primária. A mistura é então inoculada em culturas de células homólogas, sem diluição e na diluição de 1:10 (diluições finais do sobrenadante de 1:10 e de 1:100, respectivamente), como descrito no ponto I.III.2. Como alternativa, podem inocular-se directamente numa cavidade com culturas de células recentes alíquotas de 10 % do meio que constitui a cultura primária (subcultura cavidade a cavidade). A inoculação pode ser precedida de pré-incubação das diluições com anti-soro do vírus da necrose pancreática infecciosa a uma diluição adequada, conforme descrito no ponto I.II.3.

As culturas inoculadas são, em seguida, incubadas durante sete a 10 dias a 15 °C, sob observação, como descrito no ponto I.III.4.

Caso se verifique um efeito citopatogénico tóxico nos primeiros três dias de incubação, pode fazer-se a subcultura nesse momento, devendo, para tal, as células ser incubadas durante sete dias e subcultivadas de novo, com uma incubação adicional de sete dias. Caso o efeito citopatogénico tóxico surja depois de decorridos três dias, as células podem ser replicadas uma vez e incubadas até completar o período de 14 dias a contar da inoculação primária. Não deve observar-se qualquer sinal de toxicidade nos sete últimos dias de incubação.

Caso, apesar do tratamento com antibiótico, se observe contaminação bacteriana, a subcultura deve ser precedida de centrifugação a 2 000-4 000 × g, durante 15-30 minutos, a 2-5 °C, e/ou de filtração do sobrenadante com um filtro de 0,45 µm (com membrana de baixa afinidade proteica). As operações subsequentes são idênticas às efectuadas com CPE tóxicos.

IV. Identificação do vírus

1. Provas de identificação do vírus

Caso se tenha observado um efeito citopatogénico numa cultura celular, o meio (sobrenadante) é colhido e analisado, utilizando uma ou mais das seguintes técnicas: neutralização, imunofluorescência (IF) e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA). Se as provas não permitirem a identificação definitiva do vírus no prazo de uma semana, o sobrenadante deve ser enviado para um laboratório nacional de referência ou para o laboratório de referência da UE para as doenças de peixes, para identificação imediata.

2. Neutralização

As células são removidas do sobrenadante recolhido por centrifugação (2 000-4 000 × g) ou filtração com um filtro de membrana (0,45 µm) de baixa adesão proteica, diluindo em seguida o sobrenadante nas proporções de 1:100 e 1:10 000 em meio de cultura celular.

São misturadas alíquotas de ambas as diluições de sobrenadante e incubadas durante 60 minutos a 15 °C com partes iguais dos seguintes reagentes, separadamente:

- soro contendo anticorpos específicos do grupo do vírus VHSV, numa diluição de 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- soro contendo anticorpos específicos do grupo do vírus IHNV, numa diluição de 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- mistura de anti-soros dos serótipos indígenas do IPNV, numa diluição de 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾
- meio simples (controlo positivo)

A partir de cada mistura de soro e de sobrenadante com vírus são inoculadas pelo menos duas culturas celulares, com 50 µl cada uma, seguidamente incubadas a 15 °C. O surgimento do efeito citopatogénico é verificado do modo descrito no ponto I.III.4.

Algumas linhas de VHSV, que não reagem às provas de neutralização, devem ser identificadas por IF ou ELISA.

Podem utilizar-se outras provas de neutralização de eficiência comprovada.

3. Imunofluorescência (IF)

Para cada isolado de vírus a identificar, efectuam-se pelo menos oito esfregaços ou equivalente com células EPC numa densidade que resulte em cerca de 60 % a 90 % de confluência após 24 horas de cultura. As células EPC são recomendadas para o efeito com base na sua forte aderência à superfície de vidro; podem, contudo, utilizar-se outras linhas de células, tais como BF-2, RTG-2 e FHM.

Quando as células tiverem sedimentado na superfície de vidro (cerca de uma hora após o esfregaço), ou decorridas 24 horas da incubação das culturas, inocula-se o vírus a identificar. São inoculadas quatro culturas numa diluição volúmica de 1:10 e quatro culturas numa diluição de 1:1 000, seguidamente incubadas a 15 °C durante 20-30 horas.

Após a incubação, as culturas são lavadas duas vezes com MEM de Eagle sem soro, fixadas em mistura acetona-gelo a 80 % e, em seguida, coradas por IFAT em camada dupla. A primeira camada de reagente é constituída por anticorpos mono ou policlonais de qualidade de referência. A segunda camada de reagente é um anti-soro conjugado com fluorocromo da imunoglobulina utilizada na primeira camada. Para cada um dos anti-soros testados, devem ser coradas pelo menos uma cultura com dose inoculada elevada a uma cultura com dose inoculada baixa. Devem ser incluídas no teste testemunhas negativas e positivas adequadas. Recomenda-se a utilização de fluorocromos tais como FITC ou TRITC.

Preparar culturas coradas utilizando uma solução isotónica com glicerol. Examinar à luz ultravioleta. Utilizar oculares de 10 × ou 12 × e objectivas de 25 × ou 40 × com aberturas numéricas superiores a 0,7 e 1,3, respectivamente.

A técnica de IF acima descrita é indicada a título de exemplo. Podem ser utilizadas técnicas diferentes (no respeitante às culturas celulares, à fixação ou aos anticorpos de qualidade de referência), de eficiência comprovada.

⁽¹⁾ Ou de acordo com as especificações do laboratório de referência respeitantes à eventual citotoxicidade dos anti-soros.

4. ELISA

As cavidades em placas de microtitulação são revestidas, de um dia para o outro, com diluições recomendadas de fracções de imunoglobulina de proteína A purificadas de anticorpos de qualidade de referência.

Após lavagem das cavidades com o tampão PBS-Tween-20, adiciona-se o vírus a identificar às cavidades, em diluições sucessivas duas ou quatro vezes superiores, deixando-se reagir com o anticorpo de revestimento durante 60 minutos a 37 °C. Após lavagem com o tampão PBS-Tween-20, são adicionados os anticorpos biotinilados, cuja especificidade corresponde à dos anticorpos de revestimento, deixando-se reagir durante 60 minutos a 20 °C. Após outra lavagem em conformidade com a descrição *supra*, adiciona-se conjugado de estreptavidina com HRP e deixa-se reagir durante uma hora a 20 °C. Após uma última lavagem, a enzima ligada é visualizada utilizando substratos adequados ELISA (OPD ou outros).

A versão ELISA baseada na biotina-avidina é dada a título de exemplo. Podem ser utilizadas outras versões da prova ELISA, de eficiência comprovada.

QUADRO 1A

Programa de inspecção e amostragem aplicável às zonas e às explorações em zonas não aprovadas, no período de controlo de dois anos que precede a obtenção do estatuto de aprovadas

(em conformidade com os anexos B e C da Directiva 91/67/CEE e as disposições da parte I do presente anexo)

| | Número de inspecções clínicas por ano (dois anos) | Número de inspecções laboratoriais por ano (dois anos) | Pesquisa laboratorial de vírus ⁽¹⁾ | |
|---|---|--|--|--|
| | | | Peixes em crescimento (número de peixes submetidos a exames de órgãos) | Reprodutores (número de peixes submetidos a exames de fluido ovariano) |
| Zonas e explorações continentais | | | | |
| a) Explorações com reprodutores | 2 | 2 | 120 (1.ª inspecção) ⁽²⁾ 150 (2.ª inspecção) | 30 (1.ª inspecção) ⁽³⁾ 0 (2.ª inspecção) |
| b) Explorações só com reprodutores | 2 | 1 | 0 | 150 (1.ª e 2.ª inspecções) ⁽³⁾ |
| c) Explorações sem reprodutores | 2 | 2 | 150 (1.ª e 2.ª inspecções) | 0 |
| Zonas e explorações costeiras | | | | |
| a) Explorações com reprodutores | 2 | 2 | 120 (1.ª inspecção) 150 (2.ª inspecção) | 30 (1.ª inspecção) ⁽³⁾ 0 (2.ª inspecção) |
| b) Explorações de salmonídeos sem reprodutores | 2 | 2 | 30 (1.ª e 2.ª inspecções) ⁽⁴⁾ | 0 |
| c) Explorações, salvo as de salmonídeos, sem reprodutores | 2 | 2 | 150 (1.ª e 2.ª inspecções) | 0 |

Número máximo de peixes por grupo: 10

⁽¹⁾ Em alternativa, pode utilizar-se uma amostra de dimensões inferiores (ver quadro 1B), na condição de serem respeitadas as exigências estabelecidas nos pontos I.I.1 e I.I.2.1.b), bem como na parte III.

⁽²⁾ Inspeções clínicas

⁽³⁾ Em casos excepcionais em que não possa obter-se fluido ovariano, podem colher-se órgãos.

⁽⁴⁾ As amostras devem ser colhidas, no mínimo, três semanas após a transferência dos peixes da água doce para a água salgada.

QUADRO 1B

Programa de inspecção e amostragem aplicável às zonas e às explorações em zonas não aprovadas com um historial comprovado de indemnidade às doenças em causa oficialmente reconhecido, no período de controlo de dois anos que precede a obtenção do estatuto de aprovadas

(em conformidade com os anexos B e C da Directiva 91/67/CEE e as disposições da parte I do presente anexo)

| | Número de inspecções clínicas por ano (dois anos) | Número de inspecções laboratoriais por ano (dois anos) | Pesquisa laboratorial de vírus | |
|---|---|--|---|---|
| | | | Peixes em crescimento: número de peixes submetidos a exames de órgãos | Reprodutores: número de peixes submetidos a exames de fluido ovariano |
| Zonas e explorações continentais | | | | |
| a) Explorações com reprodutores | 2 | 2 | 0 (1.ª inspecção) ⁽¹⁾ 30 (2.ª inspecção) | 30 (1.ª inspecção) ⁽²⁾ 0 (2.ª inspecção) |
| b) Explorações só com reprodutores | 2 | 1 | 0 | 30 (1.ª e 2.ª inspecção) ⁽²⁾ |
| c) Explorações sem reprodutores | 2 | 2 | 30 (1.ª e 2.ª inspecção) | 0 |
| Zonas e explorações costeiras | | | | |
| a) Explorações com reprodutores | 2 | 2 | 0 (1.ª inspecção) 30 (2.ª inspecção) | 30 (1.ª inspecção) ⁽²⁾ 0 (2.ª inspecção) |
| b) Explorações de salmonídeos sem reprodutores | 2 | 2 | 30 (1.ª e 2.ª inspecção) ⁽³⁾ | 0 |
| c) Explorações, salvo as de salmonídeos, sem reprodutores | | 2 | 30 (1.ª e 2.ª inspecção) | 0 |

Número máximo de peixes por grupo: 10

⁽¹⁾ Inspeções clínicas.

⁽²⁾ Em casos excepcionais em que não possa obter-se fluido ovariano, podem colher-se órgãos.

⁽³⁾ As amostras devem ser colhidas, no mínimo, três semanas após a transferência dos peixes da água doce para a água salgada.

QUADRO 1C

Programa de inspecção e amostragem aplicável às zonas e às explorações em zonas não aprovadas, com o objectivo de manter o estatuto de aprovadas no que respeita à VHS e/ou à IHN

(em conformidade com os anexos B e C da Directiva 91/67/CEE e as disposições da parte I do presente anexo)

| | Número de inspecções clínicas por ano | Pesquisa laboratorial de vírus ⁽¹⁾ | |
|----------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| | | Peixes em crescimento: (número de peixes submetidos a exames de órgãos) | Reprodutores (número de peixes submetidos a exames de fluido ovariano) |
| Zonas e explorações continentais | | | |
| a) Explorações com reprodutores | 2 | 20 (1.ª e 2.ª inspecções) | 10 (1.ª e 2.ª inspecções) ⁽²⁾ |

| | Número de inspecções clínicas por ano | Pesquisa laboratorial de vírus (1) | |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| | | Peixes em crescimento: (número de peixes submetidos a exames de órgãos) | Reprodutores (número de peixes submetidos a exames de fluido ovariano) |
| b) Explorações só com reprodutores | 2 | 0 | 30 (1.ª e 2.ª inspecções) (2) |
| c) Explorações sem reprodutores | 1 | 30 | 0 |
| Zonas e explorações costeiras | | | |
| a) Explorações com reprodutores | 2 | 20 (1.ª e 2.ª inspecções) | 10 (1.ª e 2.ª inspecções) (2) |
| b) Explorações sem reprodutores | 1 | 30 (3) | 0 |

Número máximo de peixes por grupo: 10

(1) Nas zonas aprovadas, a colheita de amostras em cada ano só deve incidir em 50 % das explorações piscícolas da zona, por rotação. Nas explorações das zonas não aprovadas, devem recolher-se amostras anualmente.

(2) Em casos excepcionais em que não possa obter-se fluido ovariano, podem colher-se órgãos.

(3) As amostras devem ser colhidas, no mínimo, três semanas após a transferência dos peixes da água doce para a água salgada.

PARTE II

Processo de diagnóstico para confirmação de IHN e da VHS em caso de suspeita de focos

O diagnóstico da IHN e VHS deve ser efectuado através de uma das seguintes técnicas:

- A. Isolamento convencional do vírus, seguido de identificação serológica do vírus,
- B. Isolamento do vírus em simultâneo com a identificação serológica do vírus,
- C. Outras técnicas de diagnóstico (IFAT, ELISA).

A confirmação do primeiro caso de IHN e/ou de VHS nas explorações em zonas aprovadas não deve basear-se unicamente no método C, devendo também utilizar-se o método A ou o método B.

Nalguns casos, o material tecidual destinado ao exame virológico pode ser acompanhado de material suplementar para exame bacteriológico, parasitológico, histológico ou outros, de modo a permitir um diagnóstico diferencial.

A. Isolamento convencional do vírus com identificação serológica posterior do mesmo

I.1. Selecção das amostras

Devem ser seleccionadas para exame, pelo menos, 10 peixes que apresentem sinais típicos de IHN ou de VHS.

I.2. Preparação e envio das amostras de peixes

Como referido no ponto I.1.3

I.3. Colheita de material suplementar de diagnóstico

Como referido no ponto I.1.4

II. Preparação das amostras para exame virológico

Como referido no ponto I.1.1

III. Exame virológico

Como referido no ponto I.1.1

IV. Identificação do vírus

Como referido no ponto I.1.4

B. Isolamento do vírus com identificação serológica simultânea do mesmo

I.1. Selecção das amostras

Como referido no ponto II.A.1.1

I.2. Preparação e envio das amostras de peixes

Como referido no ponto I.1.3

I.3. Colheita de material suplementar de diagnóstico

Como referido no ponto I.I.4

II.1. Homogeneização dos órgãos

Como referido no ponto I.II.2

II.2. Centrifugação do homogeneizado

O homogeneizado é centrifugado durante 15 minutos a $2\,000\text{--}4\,000 \times g$ numa centrifugadora refrigerada, a uma temperatura compreendida entre 2 e 5 °C, sendo o sobrenadante recolhido e tratado durante 4 horas, a 15 °C, com um antibiótico nomeadamente uma solução de gentamicina a 1 mg/ml, ou filtrado num filtro de membrana (0,45 µm) de baixa afinidade proteica.

II.3. Tratamento do sobrenadante com anti-soros de diagnóstico

A suspensão de órgãos tratados com antibióticos ou filtrada num filtro de membrana é diluída a 1: 10 e 1: 10 000 em meio de cultura celular e as alíquotas misturadas e incubadas durante 60 minutos a 15 °C com partes iguais dos reagentes enumerados no ponto I.IV.2.

III.1. Culturas celulares e meios

Como referido no ponto I.III.1

III.2. Inoculação das culturas celulares

A partir de cada mistura de soro e de vírus (preparada do modo referido no ponto II.B.II.3), são inoculadas pelo menos duas culturas celulares por linha de células, com 50 µl cada.

III.3. Incubação das culturas celulares

Como referido no ponto I.III.3

III.4. Microscopia

As culturas celulares inoculadas são observadas diariamente, com uma ampliação de 40-150 ×, para a detecção de efeitos citopatogénicos. Se um dos anti-soros utilizados evitar o surgimento de efeitos citopatogénicos, pode considerar-se que o vírus foi identificado.

Se o efeito citopatogénico não for evitado por nenhum dos anti-soros, é necessário proceder aos métodos de identificação do vírus de acordo com o ponto I.IV.

III.5. Subcultura

Se não for observado efeito citopatogénico após sete dias, procede-se à subcultura das células inoculadas com sobrenadante e meio (ponto II.B.II.3), conforme descrito no ponto I.III.5.

C. Outras técnicas de diagnóstico

O sobrenadante preparado como descrito no ponto I.II.2 é sujeito aos testes IFAT ou ELISA de acordo com os pontos I.IV.3 ou I.IV.4, respectivamente. Estes métodos rápidos devem ser complementados por um exame virológico de acordo com A ou B até 48 horas depois da colheita de amostras, caso:

- a) Dêem origem a um resultado negativo; ou
- b) Dêem origem a um resultado positivo em amostras que representem o primeiro caso de IHN ou de VHS numa zona aprovada.

O material tecidual pode ser submetido a outras técnicas de diagnóstico, como RT-PCR, provas de IF em cortes congelados ou provas imuno-histoquímicas em tecidos fixados com formalina. Estas técnicas devem sempre ser acompanhadas da inoculação de material não fixado em culturas celulares.

PARTE III

Historial comprovado de indemnidade à VHS e/ou à IHN em zonas ou explorações de áreas não aprovadas Directrizes e critérios aplicáveis a um programa oficial de inspecção sanitária

1. O programa de inspecção sanitária apenas pode ter início:
 - na sequência de um programa de erradicação de VHSV e/ou IHNV aprovado oficialmente que inclua a remoção de todos os peixes das instalações, limpeza, desinfecção e vazio sanitário antes do repovoamento com peixes de explorações aprovadas, ou
 - em explorações piscícolas sem historial de infecção com VHSV ou IHNV.
2. O programa de inspecção sanitária deve basear-se tanto em inspecções clínicas como em exames laboratoriais.
3. O programa deve incluir duas inspecções clínicas anuais, em conformidade com as directrizes apresentadas na parte I.

4. Pelo menos numa das inspecções efectuadas anualmente devem colher-se, em cada exploração, 30 amostras de tecidos de peixes e/ou de fluido ovariano. As amostras devem ser escolhidas, preparadas e examinadas laboratorialmente em conformidade com as partes I, II e IV.
5. O programa de inspecção sanitária deve ser aplicado durante, pelo menos, quatro anos, em todas as explorações da zona, ou na exploração numa zona não aprovada, a aprovar.
6. Para o reconhecimento oficial do programa, não deverão ocorrer ou ser detectados quaisquer casos de VHS ou IHN (não deverão ocorrer nem infecções clínicas nem o isolamento do vírus).

PARTE IV

Procedimento de titulação para verificar a susceptibilidade das culturas celulares à infecção

Apresenta-se de seguida o procedimento de titulação recomendado, referido no ponto I.III.3.

Devem utilizar-se, pelo menos, dois isolados de VHSV e um isolado de IHNV. Os isolados devem representar o principal grupo de vírus de ocorrência na UE, ou seja, no caso do VHSV, um isolado patogénico da truta arco-íris em água doce e um isolado patogénico do pregado; no caso do IHNV, uma estirpe europeia patogénica da truta arco-íris. Devem utilizar-se isolados perfeitamente definidos dos Estados-Membros. Encontram-se disponíveis isolados de referência no laboratório de referência da UE para as doenças de peixes.

Procede-se à propagação em recipientes de cultura de lotes de vírus com um número reduzido de passagens em células BF-2 ou RTG-2, no caso do VHSV, e em células EPC ou FHM, no caso do IHNV. Deve utilizar-se um meio de cultura celular contendo, no mínimo, 10 % de soro. Utilizar uma MOI reduzida para inoculação (< 1).

Para CPE total, o vírus é colhido por centrifugação a $2\,000 \times g$, durante 15 minutos, do sobrenadante da cultura celular, sendo de seguida esterilizado por filtração através de um filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e distribuído por tubos criogénicos rotulados. A cultura de vírus é mantida a -80°C .

Uma semana após a congelação, o conteúdo de três recipientes contendo cada um dos vírus é descongelado com água fria e titulado quanto às respectivas linhas celulares. Cada isolado de vírus deverá ser descongelado e titulado com uma frequência pelo menos semestral ou no caso de se suspeitar uma redução da susceptibilidade de uma linha celular.

Os procedimentos de titulação devem ser descritos em pormenor, devendo seguir-se sempre o mesmo procedimento.

A titulação por diluição final deverá incluir, no mínimo, seis réplicas em cada diluição. Os títulos são comparados com títulos anteriormente obtidos. Caso o título de algum dos três isolados de vírus desça duas unidades ou mais, numa escala logarítmica, abaixo do título inicial a linha celular em causa deverá deixar de ser utilizada para efeitos de vigilância.

Caso coexistam no laboratório diversas linhas celulares, cada linha deve ser examinada separadamente.

Devem manter-se registos por um mínimo de 10 anos.

PARTE V

Acrónimos e Abreviaturas

| | |
|--------|---|
| BF-2 | «Bluegill fry -2» (linha celular) |
| CPE | Efeito citopatogénico |
| CRL | Laboratório de Referência da Comunidade para as doenças de peixes |
| ELISA | Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| EPC | <i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (linha celular) |
| FHM | «Fathead minnow» (<i>Pimephales promelas</i>) (linha celular) |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| Hepes | Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico |
| HRP | Peroxidase de rábano |
| IF | Imunofluorescência |
| IFAT | Teste indirecto de anticorpos fluorescentes |
| IHN(V) | Vírus da necrose hematopoiética infecciosa |
| IPN(V) | Vírus da necrose pancreática infecciosa |
| MEM | Meio mínimo essencial |

| | |
|----------|---|
| MOI | Multiplicidade da infecção (Proporção de partículas virais infecciosas adicionadas a um determinado número de células numa cultura) |
| OPD | Ortofenilenodiamina |
| PBS | Solução-tampão de fosfatos |
| RTG-2 | Gónada de truta arco-íris (linha celular) |
| RT-PCR | Reacção de polimerização em cadeia catalisada pela transcriptase inversa |
| Tris-HCl | Tris(hidroximetil)aminometano — HCl |
| TRITC | Isotiocianato de tetrametil-rodamina |
| VHS(V) | Vírus da septicémia hemorrágica viral |
