

32003D0466

L 156/61

ОФИЦИАЛЕН ВЕСТНИК НА ЕВРОПЕЙСКИЯ СЪЮЗ

25.6.2003

РЕШЕНИЕ НА КОМИСИЯТА**от 13 юни 2003 година****за установяване на критериите за зонирание и мерките, които трябва да се предприемат за официално наблюдение при съмнение или потвърждение на присъствието на инфекциозна анемия по сьомгите (ISA)**

(нотифицирано под номер C(2003) 1831)

(текст от значение за ЕИП)

(2003/466/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 при пускането на пазара на аквакултури и продукти от тях ⁽¹⁾, последно изменена с Регламент (ЕО) № 806/2003 ⁽²⁾, и по-специално член 15 от нея,

като взе предвид Директива 93/53/ЕИО на Съвета от 24 юни 1993 г. относно въвеждането на минималните мерки на Общността за борба с определени болести по рибите ⁽³⁾, последно изменена с Решение 2001/288/ЕО на Комисията ⁽⁴⁾, и по-специално член 5, параграф 2 и член 6 от нея,

като има предвид, че:

(1) Директива 93/53/ЕИО установява, че вземането на проби и лабораторното изследване за откриване присъствието на болести от списъци I и II (които са посочени в приложение А към Директива 91/67/ЕИО), следва да се извършват съгласно методите, установени в съответствие с член 15 от Директива 91/67/ЕИО.

(2) Плановите за вземане на проби и методите за диагностициране за откриване и потвърждение на болестите по рибите, които фигурират в списък II, вирусната хеморагична септицемия (VHS) и инфекциозната хематопоетична некроза (IHN), са установени с Решение 2001/183/ЕО на Комисията ⁽⁵⁾.

(3) Съгласно член 5, параграф 2 и член 6 от Директива 93/53/ЕИО всички ферми, разположени в същия

водосборен басейн или същата крайбрежна зона, където се намира фермата за която има съмнение, че е заразена с инфекциозна анемия по сьомгите (ISA), или за което инфекцията е потвърдена, се поставят под официално наблюдение. Следва да бъдат установени критериите за зонирание и официално наблюдение.

(4) С цел да бъдат определени плановете за вземане на проби и методите за диагностициране за откриване и потвърждение на ISA и с цел да се установят критериите за зонирание и официално наблюдение при съмнение или потвърждение на ISA, са били консултирани експерти по здравословното състояние на рибите и лабораторни експерти. Освен това трябва да се вземат под внимание насоките за диагностициране на ISA, установени в последното издание на Ръководството за диагностициране на болестите по водните животни на Международното бюро по епизоотии (МБЕ).

(5) Следва да бъде предвиден достатъчно дълъг период за приложението на тези нови изисквания.

(6) Мерките, предвидени в настоящото решение, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по хранителната верига и здравето на животните,

ПРИЕ НАСТОЯЩОТО РЕШЕНИЕ:

Член 1

Плановите за вземане на проби и методите за диагностициране за откриване и потвърждение на инфекциозната анемия по сьомгите (ISA), както и критериите за зонирание и официално наблюдение, които следват след наличието на съмнение или потвърждение на ISA, са установени в приложението към настоящото решение.

Член 2

Настоящото решение се прилага от 23 октомври 2003 г.

⁽¹⁾ ОВ L 46, 19.2.1991 г., стр. 1.⁽²⁾ ОВ L 122, 16.5.2003 г., стр. 1.⁽³⁾ ОВ L 175, 19.7.1993 г., стр. 23.⁽⁴⁾ ОВ L 99, 10.4.2001 г., стр. 11.⁽⁵⁾ ОВ L 67, 9.3.2001 г., стр. 65.

Член 3

Адресати на настоящото решение са държавите-членки.

Съставено в Брюксел на 13 юни 2003 година.

За Комисията

David BYRNE

Член на Комисията

ПРИЛОЖЕНИЕ

План за вземане на проби и методи за диагностициране за откриване и потвърждение на инфекциозната анемия по съомгите (ISA) и критерии за зонирание и официални мерки за наблюдение, които следват след наличието на съмнение или потвърждение на ISA

УВОД И ДЕФИНИЦИИ

Настоящото приложение:

- а) определя насоките и минималните изисквания относно плановете за вземане на проби и методите за диагностициране за откриване и потвърждение наличието на ISA;
- б) включва разпоредбите и дефинициите, установени в Директива 91/67/ЕИО и Директива 93/53/ЕИО;
- в) посочва разпоредбите, които целят диагностицирането, контрола и наблюдението на ISA в случай на съмнение или потвърждение на ISA;
- г) е насочено както към органите, които отговарят за контрола на ISA, така и за лабораторния персонал, който извършва тестовете за тази болест. То поставя акцент върху процедурите за вземане на проби, принципите и приложението на лабораторните тестове и оценката на техните резултати, както и върху детайлизираните лабораторни техники. При това, ако е необходимо, лабораториите могат да променят тестовете, описани в настоящото приложение, или да прибегнат до използването на различни тестове, при условие че могат да докажат, че те са със същата или по-голяма чувствителност и специфичност. Освен това са установени критерии за определяне на зони и мерките за официално наблюдение последващи съмнение или потвърждение на ISA.

За целите на настоящото приложение следва да бъдат приложени следните допълнителни дефиниции:

„Водосборен басейн“: всеки водосборен басейн от извора на водните течения до устието или част от водосборен басейн от извора на водното течение до естествена или изкуствена преграда, която възпрепятства миграцията на рибите отвъд тази преградата;

„Крайбрежна зона“: част от брега или морската вода или широко устие, което отговаря на точно географско определение, което се състои от хомогенна хидродинамична система или серия от такива системи.

Част I установява общите принципи и критерии за диагностика и потвърждаване на ISA, както и критериите за зонирание и официално наблюдение, които трябва да се предприемат след съмнение или потвърждение на ISA.

Част II установява инспекциите и вземането на проби, с цел да се открие наличието на ISA.

Част III установява методите, които се прилагат за вирусологично изследване.

Част IV описва процедурата за изследване на пробите с RT-PCR за откриване на ISA.

Част V описва протокола, който трябва да се използва за изследване на бъбречните проби с IFAT (индиректен флуоресцентен тест за антитела) по отношение на ISA.

Част VI описва хистологичната методология.

Част VII съдържа списък с използваните акроними и съкращения.

I. Критерии за диагностициране на ISA и за установяването на зони, определени контролни мерки и официално наблюдение**I.1. Общи принципи за диагностициране на ISA**

Част I.2 от настоящото приложение посочва основателни причини за съмнение, че риби са били заразени с вируса на ISA. Държавите-членки гарантират, че когато за рибите от рибовъдна ферма има съмнение, че са заразени с вируса на ISA, се провежда колкото е възможно по-бързо официално разследване, което да потвърди или изключи наличието на болестта, базирано върху проверките и клиничните изследвания, както и на събирането и подбора на проби и методите за лабораторно изследване, предвидени в части III—VI от настоящото приложение. С цел официалното потвърждение на наличието на ISA се изпълнява всяка от трите групи от критерии, установени в част I.3 от настоящото приложение.

I.2. Съмнение за заразяване с ISA

I.2.1. Има съмнение за наличието на ISA, ако най-малко един от следните критерии е изпълнен:

- а) наличието на постмортални констатации, съвместими с ISA, със или без клинични признаци на болестта. Постморталните констатации и клиничните признаци на болестта са в съответствие с тези, установени с последното издание на Ръководство за диагностика на болестите по водните животни на Международното бюро по эпизоотии (МБЕ);
- б) изолиране и идентифициране на вируса на ISA в клетъчна култура от единствен образец взет от всяка риба във фермата, както е описано в част III;

- в) разумно доказателство за наличието на вируса на ISA от два независими лабораторни теста, каквито са тестовете RT-PCR (част IV) и тестът IFAT (част V);
- г) прехвърляне на живи риби във ферма, за която има основателни причини за съмнение за наличието на ISA по време на прехвърлянето;
- д) когато разследване разкрие други важни епидемиологични връзки с ферми, за които има съмнение или за които е потвърдено, че са заразени с ISA.

I.2.2. Съмнението за ISA може да се изключи, когато продължителните разследвания, които включват най-малко една клинична проверка на месец за период от шест месеца, не разкриват никакво друго значително доказателство за наличието на ISA.

I.3. Потвърждаване на ISA

Наличието на ISA се счита за потвърдено, ако критериите, описани в букви а), б) или в) са изпълнени:

- а) наблюдават се клинични признаци и постмортални констатации, които са съвместими с ISA съгласно последното издание на Ръководството за диагностициране на болестите по водните животни от МБЕ, включително мъртви, слабоподвижни риби или такива, които имат аномално поведение, признаци на анемия, други постмортални констатации и патологични промени, а откриването на вируса на ISA се осъществява чрез един или няколко от следните методи:
 - i) изолиране и идентифициране на вируса на ISA в клетъчна култура от най-малко една проба, взета от която и да е риба във фермата, както е описано в част III,
 - ii) откриване на вируса на ISA с тест RT-PCR чрез методите, описани в част IV,
 - iii) откриване на вируса на ISA в тъканите или препарати от тъкани с помощта на специфични антитела срещу вируса на ISA (например тест IFAT върху бъбречни проби, както е описано в част V);
- б) изолиране и идентифициране на вируса на ISA от две проби, взети от една или няколко риби от фермата, тествани по различни поводи, съгласно метода, описан в част III;
- в) изолиране и идентифициране на вируса на ISA от най-малко една проба, взета от риба от фермата съгласно метода, описан в част III, с потвърждение на доказателството за ISA в препарати от тъкани, взети от която и да е риба във фермата, като се използва RT-PCR (част IV) или IFAT (част V).

I.4. Критерии за установяване и за премахване на контролни и зони за официално наблюдение след сътнение и потвърждение на ISA

I.4.1. За целите на официална програма за наблюдение, основана върху риска, държавите-членки пристъпват към установяване на подходящи зони за контрол и наблюдение в близост до фермата, за която официално има съмнение, че е заразена с ISA, или това е потвърдено.

I.4.2. Зоните, които трябва да се установят, се определят на основата на анализ на опасността за по-нататъшно разпространение на болестта. В съответствие с разглежданата епизоотологичната ситуация, водосборният басейн или крайбрежна зона:

- се определя като контролна зона, или
- ако става въпрос за водосборен басейн или за обширна крайбрежна зона, може да се раздели на една контролна зона и една зона за наблюдение, ако предотвратяването на разпространение на ISA не е поставено на риск.

Освен това, ако е необходимо, могат да се установят допълнителни зони за наблюдение извън водосборния басейн или крайбрежната зона.

I.4.3. Главните фактори, които трябва да се вземат под внимание при установяване на горепосочените зони, са тези, които оказват влияние върху рисковете от разпространение на болестта сред риби, отглеждани във ферми, или свободно обитаващи риби, а именно: брой, ниво и разпределение на смъртността на рибите във фермата, за която има съмнение или е потвърдено заразяването с вируса на ISA; причината за смъртните случаи в разглежданата ферма; разстоянието до съседните ферми и тяхната гъстота; контактни ферми; видове, които са във фермата; управлението, което се прилага в заразените и в съседните ферми; хидродинамичните условия и други идентифицирани фактори от епидемиологично значение в рамките на епизоотичното разследване, което се извършва в съответствие с член 5, параграф 2 и с член 8 от Директива 93/53/ЕИО.

- I.4.4. За установяването на зоните се прилагат следните минимални критерии:
- I.4.4.1. Установява се „контролна зона“ от държавата-членка в непосредствена близост до ферма, в която заразяването от вируса на ISA е потвърдено, както следва:
- в крайбрежните зони: зоната, включена в кръг с радиус, най-малко равен на терена, който се залива от приливите и отливите, или най-малко 5 km с център рибовъдния обект, в който заразяването с вируса на ISA е потвърдено, или еквивалентна зона, определена според подходящите хидродинамични и епидемиологични данни, или
 - във вътрешните райони: целият водосборен район от рибовъдната ферма, за която заразяването с вируса на ISA е потвърдено, в обширните водосборни райони; държавата-членка може да разграничи разширението на зоната на части от водосборния басейн, при условие че предпазването от разпространение на ISA не е поставено на риск.
- I.4.4.2. Установява се „временна контролна зона“ в случай на съмнение за наличие на ISA, основано на същите критерии, както за контролната зона.
- I.4.4.3. Установява се „зона за наблюдение“, ако е необходимо, от държавата-членка извън контролната зона в секторите, където по-слабо наблюдение се счита за достатъчно и съответства на:
- в крайбрежни зони: зоната, която обгражда контролната зона, която се застъпва със зоните на приливите и отливите, повърхността около контролната зона и зоната, включена в кръг с радиус 10 km от центъра на за контролната зона, или на еквивалентна зона, определена според подходящите хидродинамични и епидемиологични данни, или
 - във вътрешните райони: ако е необходимо, като обширна зона, разположена извън определената контролна зона.
- I.5. *Закриване и премахване на установени зони*
- I.5.1. Компетентният орган на държавата-членка гарантира, че всички ферми, които са разположени в контролната зона са предмет на закриване за подходящ период след като рибите от тях са били извадени и те са били дезинфекцирани. Продължителността на периода на закриване на фермите, за които е потвърдено, че са заразени с вируса на ISA, е най-малко шест месеца. Продължителността на периода на закриване за другите ферми, разположени в контролната зона, се определя от компетентния орган на основата на оценката на рисковете за всеки отделен случай. Когато всички ферми, които са разположени в контролната зона, са празни, се установява синхронизирано закриване с времетраене най-малко шест седмици.
- Освен това компетентният орган може да реши да закрие на ферми, разположени в установените зони за наблюдение.
- I.5.2. Установените контролни зони не могат да се премахват и да се преместват на друго място преди всички ферми, разположени в тези зони, да бъдат изпразнени от рибите и дезинфекцирани в съответствие с част I.5.1 През периода на тяхното преместване контролните зони се превръщат в зони за наблюдение в съответствие с част I.4.4.3.
- I.5.3. Установените временни контролни зони не могат да бъдат премахнати преди съмнението за заразяване с вируса на ISA да бъде отхвърлено в съответствие с част I.2.2. В случай на потвърждение на ISA в съответствие с част I.3 временната контролна зона се превръща в контролна зона.
- I.5.4. Установените зони за наблюдение не могат да се премахват най-малко две години след премахването на контролната зона.
- I.6. *Официално наблюдение след съмнение или потвърждение на ISA*
- I.6.1. Като се позовава на член 5, параграф 2 и на член 6 от Директива 93/53/ЕИО и с цел да се определи разпределението и развитието на болестта след съмнение или потвърждение на ISA във ферма, официалната програма за наблюдение, основаваща се на риска, трябва да се проведе от компетентния орган или от специализираните служби за здравеопазване на рибите в консултация с компетентната власт и под нейния контрол във всички рибовъдни обекти, разположени в установените зони.
- I.6.2. Във връзка с приложението на такава официална програма за наблюдение, компетентният орган трябва, ако е необходимо, чрез проверка на място, да идентифицира всички ферми, разположени в установените зони, и да направи официално преброяване на видовете, категориите и броя на рибите, развъждани във фермите, включително и на нивото на смъртност.

- I.6.3. След първоначалното официално преброяване фермите, разположени в установените временни контролни зони, които развъждат атлантическа сьомга (*Salmo salar*), или всякакъв друг вид риба, посочен в последното издание на Международния санитарен код за водните животни на МБЕ, като чувствителен за ISA или потенциален носител на ISA, са задължени да съобщават официално на компетентния орган за смъртните случаи на всеки четиринадесет дни. Увеличението на смъртността трябва да се съобщава официално ежедневно и за всяка клетка. Компетентният орган проверява всяко значително увеличение на смъртността в дадена ферма.

Ако съмнението за заразяване се потвърди, всички ферми в установената контролна зона официално докладват на компетентния орган за смъртните случаи всяка седмица за всяка клетка и за всеки ден.

Фермите, които са разположени в зоните за наблюдение, докладват официално на компетентния орган за смъртните случаи на всеки четиринадесет дни.

Освен това проверките се извършват на редовни интервали в установените зони през цялата година според честотата, предвидена в таблица 1. Когато климатичните условия правят невъзможни тези проверки през част от годината, държавите-членки могат да определят други честоти на проверки в плана за спешност.

Таблица 1

Програма за официално наблюдение

Място на фермата	Минимален брой на проверки за година	Минимален брой на проверки след премахване на контролната зона
Контролна зона	12	
Зона за наблюдение	6	6
Временна контролна зона	6	

Програмата за наблюдение се прилага до премахването на зоните.

- I.6.4. Проверките, както и подбора, събирането, подготовката и изпращането на пробите, се извършват, както е предвидено в части от II.1 до II.4. Изследването на пробите се извършва в съответствие с части III—VI.

II. Проверки и вземане на проби

II.1. Проверка, подбор и вземане на проби във ферма, за която има съмнение за наличие на ISA

II.1.1. По време на редовните проверки, извършвани в рамките на официалната програма за наблюдение, описана в част I.6, и във фермите, за които има съмнение, че са заразени с ISA, цялото оборудване на стопанствата (клетки, ведрата, и корита) се проверява за наличието на мъртви, слабо подвижни, или риби които имат аномално поведение. Когато е възможно, скоро умрелите риби (неразложени), слабо подвижните или които имат аномално поведение се изследват за откриване клиничните признаци на ISA или за постмортални констатации на болестта, както е описано в последното издание на Ръководство по диагностика на болестите по водните животни на МБЕ.

II.1.2. Ако се наблюдават неотдавнашни клинични признаци съвместими с ISA или ако инспектор или ветеринарен лекар има всякаква друга причина да се усъмни, че риба може да бъде заразена, се вземат проби от най-малко десет риби. Ако е възможно, пробите се вземат от риби, които са умрели наскоро, слабо подвижни или имат аномално поведение. Ако няма достатъчен брой риби, които показват клинични признаци, тогава пробата се допълва с проби от здрави риби, взети от клетките, ведрата или коритата, където са констатирани най-високите нива на смъртност или където има най-голям брой риби, които показват клинични признаци на болестта.

II.1.3. Ако наскоро умрелите риби, слабо подвижните или които имат аномално поведение бъдат забелязани, но клиничните признаци и постморталните констатации не са съвместими с ISA, вземането на проби не е задължително, но такива проби, които са необходими за провеждането на диференциална диагностика, могат да бъдат взети по искане на инспектора или на ветеринарния лекар.

II.1.4. Когато за свободно обитаващи риби има съмнение, че са заразени с ISA, държавите-членки гарантират, че са взети подходящи проби и са изследвани поред подходящите клинични и лабораторни методи, установени в части II—VI, за да установи дали наличието на ISA представлява значителна заплаха за рибите, които се отглеждат във фермата.

II.2. Подготовка на пробите от риби

II.2.1. Пробите за хистологично изследване се вземат само от прясно умъртвени риби, които показват клинични признаци или постмортални констатации, съвместими с наличието на болестта. Вземат се проби от всички външни или вътрешни увреждания, и при всички случаи проби от черния дроб, от средния бъбрек, сърцето и далака се вземат от всяка риба с помощта на скалпел и се поставят в буферен солеви разтвор с 8—10 % (o/o) формол. Съотношението между фиксатива и тъканта трябва да бъде най-малко 20:1, за да се гарантира задоволително съхраняване на тъканите.

II.2.2. Тъкани за вирусологично изследване се вземат от всички риби, от които се вземат проби. Дубликати от образци се вземат за целите на потвърждението. Парченца от черен дроб, от преден бъбрек, от сърцето и от далака се вземат от рибите с помощта на стерилен инструмент и се поставят в пластмасови тубички, които съдържат 9 ml транупортен разтвор т.е. среда от клетъчна култура с антибиотици. Комбинация от 12,5 µg на ml⁻¹ фунгизон, 200 UI полимиксин В на ml⁻¹ и 200 µg канамицин на ml⁻¹ е подходяща, но други комбинации, чиято ефикасност е доказана, могат също да се използват. Тъкани, взети максимум от пет риби могат да се поберат в една тубичка, която съдържа транупортен разтвор: те представляват обща проба. Теглото на тъканта на един образец е 1,0 ± 0,5 g.

II.2.3. Бъбречните проби, предназначени за теста IFAT, трябва да се вземат от наскоро умъртвени риби в срок от два часа след смъртта. Парче от среден бъбрек се взема с помощта на стерилни инструменти. Тъканта се попива върху абсорбираща хартия, за да се отнеме излишната кръв, после се притиска няколко пъти върху стъклена пластинка, намазана с поли-L-лизин. Различните отпечатъци се поставят един до друг, но без да се застъпват, така че да образуват единен непрекъснат пласт от клетки. Кръвта и тъканната течност не са подходящи за този тест. Избягва се оставянето на образеца от бъбрека „да се оттежда“ върху абсорбиращата хартия, защото това може да доведе до съсирване на кръвта и отлагане на големи количества от серумни протеини върху пластината. Бъбречните проби се изсушават на въздух, после се съхраняват на хладно и сухо място, ако не трябва да се фиксират незабавно. Те се фиксират в срок от 72 часа, след като се вземат. Те могат също да се замразят след изсушаване на въздух, после да се складират за не повече от един месец при – 20 °C преди фиксиране.

II.2.4. Рибите, които показват признаци на анемия, могат да бъдат зашеметени и от тях да се вземат незабавно хепаринизирани кръвни проби за хематологично изследване и за измерване на хематокрита.

II.2.5. Тъкан от всички риби се взема за проби за изследване RT-PCR. Взема се парче от предния или средния бъбрек на рибите с помощта на стерилен инструмент и се поставя в микротубичка, която съдържа 1 ml разтвор за консервация -РНК с доказана ефикасност. Тъканта от максимум пет риби може да се побере в тубичка с консервационен разтвор и това да представлява обща проба. Теглото на тъканта на една проба е приблизително 0,5 g. Когато рибите са много малки, за да се получи проба с желаното тегло, могат да се вземат парченца от бъбрека, сърцето, далака, черния дроб или пилорите на сляпото черво, в този порякък, за да се получат 0,5 g.

II.3. Изпращане на пробите от риби

II.3.1. Кръвните проби и тубичките, които съдържат рибните тъкани, предназначени за вирусологичното изследване или за анализ RT-ПСТ, се поставят в изолирани съдове (например кутии от полистирол с дебели стени) с достатъчно количество лед или охлаждащи блокове, за да се гарантира изстудяването на пробите по време на транупортирането им към лабораторията. Пълното замразяване трябва да се избягва и съдът за транспортиране съдържа още лед или един или няколко от тези охлаждащи блокове трябва да са все още частично или изцяло замразени при приемането. При изключителни обстоятелства образците, предназначени за анализ RT-PCR, или тези, предназначени за вирусологичното изследване, могат да бъдат дълбоко замразени и транспортирани към лабораторията при – 20 °C или още по-ниска температура.

II.3.2. Пластинките за теста IFAT се пренасят в поставки за пластинки с достатъчно количество изсушавашо вещество, което да съхранява пробите сухи и охладени, както е посочено по-горе.

II.3.3. Ако рибните тъкани се транспортират във фиксатив за хистологично изследване, те се изпращат в непроницаеми тубички, поставени в съдове, които издържат на удар, такива като полистиренови кутии с дебели стени.

- II.3.4. Освен ако образците не са били замразени, вирусологичното изследване започва възможно най-бързо и не по-късно от седемдесет и два часа след взимането на пробите. Пробата, която е предназначена за анализ за потвърждение се съхранява при температура -20°C или по-ниска при пристигането и в лабораторията.
- II.3.5. Цяла риба може да бъде транспортирана до лабораторията, ако могат да бъдат осигурени температурните условия по време на транспортирането, както е описано в част II.3.1. Цялата риба се обвива в абсорбираща хартия и се изпраща в полиетиленова торбичка, охладена, както е посочено по-горе.
- II.3.6. Жива риба също може да бъде пренесена, но единствено под наблюдение на официалната служба.
- II.3.7. За анализа RT-PCR на тъкани, съхранени в RNAlater, екстракцията на РНК трябва да бъде проведена в рамките на определени срокове за пробите, съхранявани при различна температура. Сроковете са посочени по-долу:
- | | |
|-------------------------|--------------------|
| — 37°C | 1 ден; |
| — 25°C | 1 седмица; |
| — 4°C | 1 месец; |
| — -20°C | неопределено време |
- II.3.8. Опаковането и етикетирването трябва да се извършват в съответствие с действащите национални и международни разпоредби относно транпортирането.
- II.4. *Събиране на допълнителен материал за диагностициране*
- Със съгласието на лабораторията по диагностика други тъкани от риби могат да бъдат събрани и подготвени за целите на допълнително изследване.

III. ВИРУСОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ

III.1. Подготовка на пробите

III.1.1. Когато възникнат практически затруднения, които възпрепятстват окулирането на клетките в рамките на 72 часа след събирането на тъканите проби, приемливо е тези проби да бъдат замразени при -80°C за максимум двадесет и осем дни. Тъканите трябва да бъдат замразени и размразени само един път преди тяхното изследване.

III.1.2. Всяка проба (смес от тъкани в транспортен разтвор) се хомогенизира напълно с помощта на дробилка, миксер или система с чук за стриване и се центрофугира при 2000 до 4000 g за 15 минути при температура от 0 до 6°C , след което плаващите на повърхността частици се филтрират ($0,45\ \mu\text{m}$) и се инкубира с обем равен на избрана смес, разредена с антисеруми срещу местни серотипове на вируса на ИHN. Титърът на антисерума трябва да бъде най-малко 1:2000 в 50 % неутрализационния тест за утайка. Сместа се инкубира 1 час при 15°C . Това представлява инокулумът.

Обработката на всички инокулуми с антисерум за ИHN вирус (вирус, който в някои части на Европа се среща в 50 % от пробите от риби) има за цел да възпрепятства развитието в инокулираните клетъчни култури на ЦПЕ, който се дължи на ИHN. Това намалява продължителността на вирусологичните изследвания, както и броя на случаите, в които появяването на ЦПЕ би трябвало да се счита като потенциално указание за вируса на ISA.

Когато пробите са с произход от производствени единици, които се считат за свободни от ИHN, обработката на инокулумите с антисерум за вируса на ИHN може да бъде премахната.

III.2. Инокулация на клетъчните култури

III.2.1. Клетки SHK-1 (проход 80 или по-малко) или клетки TO се култивират в среда L-15, която съдържа 5 % серум от говежди фетус, 2 % (o/o) 200 mM на L-глутамин и 0,08 % (o/o) 50 mM 2-меркаптотанол с 50 mM върху пластинки за култура с дванадесет или двадесет и четири клетъчни гнезда. Други клетъчни поколения с доказани ефикасност и чувствителност за изолиране на вируса на ISA могат да бъдат използвани, като се има предвид изменчивостта на шама и способността на различните шамове да се възпроизвеждат в различни клетъчни поколения. Да се инокулира суспензия от органи, обработени с антисерум в млади клетъчни култури във фаза на активен растеж, за да се получи крайно разреждане на тъканния материал в среда от култура с 1:1000. За всяка суспензия от органи се прибавя 40 μL инокулум за клетъчно гнездо, което съдържа 2 mL среда от култура. За да се намали риска от кръстосано заразяване, се препоръчва да се използват отделни пластинки с дванадесет или двадесет и четири клетъчни гнезда за образците с произход от различни рибовъдни стопанства.

III.2.2. Една инокулирана пластинка се запазва, за да служи за отрицателен контрол. Отделна пластинка се инокулира с изолат за сравнение от вируса на ISA, за да служи за положителен контрол, както следва. Инокулира се 100 µL от основния препарат от вируса на ISA (с минимален титър 10^7 TCID₅₀ на mL⁻¹) в първото клетъчно гнездо и се смесва добре. Количество от този материал се пренася от първото гнездо във второто, за да се получи разреждане 1:10, и се смесва добре. Това се повтаря по цялата пластинка, за да се получат шест разреждания 1:10, като се смесва добре. Препаратът майка от вируса на ISA може да бъде съхраняван при температура – 80 °C за най-малко две години, но веднъж размразен трябва да се използва в рамките на три дни. Забележка: трябва да се възпрепятства кръстосаното заразяване на пластинките за теста с положителния контролен материал. За да се избегне тази опасност, пластинките за положителен контрол се установяват и обработват отделно от пластинките за теста.

III.2.3. Пробите се инкубират при температура 14 ± 2 °C за максимум петнадесет дни.

III.3. Микроскопия

Клетъчните култури се изследват два пъти под микроскоп за ЦПЕ между петия и седмия ден и между дванадесетия и четиринадесетия ден след инокулацията. Ако дадена обща проба показва СРЦПЕ, незабавно се пристъпва към идентификационни процедури (III.6). Ако ЦПЕ не се наблюдава до четиринадесетия ден, се прави хемадсорбционен тест (III.4).

III.4. Хемадсорпция

Размножаването на вируса на ISA в клетъчните култури не дава винаги резултат за ЦПЕ. Следователно всяко клетъчно гнездо се подлага на хемадсорбционен тест, както е описано по-долу, или всяко клетъчно гнездо се подлага на тест IF (както е описано в III.6.1).

III.4.1. Проба от средата на клетъчната култура се отнема от всяко клетъчно гнездо, включително от онези за положителна и отрицателна контрола, и се поставя в стерилни етикетирани тубички. Към всяко клетъчно гнездо се прибавя 500 µL от суспензия 0,2 % (o/o) от размити червени кръвни телца от заек или кон или от суспензия с 0,05 % (o/o) с размити червени кръвни тела от дъгова пъстърва или атлантическа съомга и се оставят да инкубират на околна температура в продължение на 45 минути. Червените кръвни телца се премахват и всяко клетъчно гнездо се промива два пъти със среда L-15. Всяко клетъчно гнездо се изследва с микроскоп.

III.4.2. Наличието на сраствания от червени кръвни телца прикрепени към повърхността на клетките SHK-1 или TO е признак на вероятно заразяване с ортомиксовирус. Ако хемадсорбционният тест от е положителен незабавно се пристъпва към теста за идентифициране на вируса (III.6).

III.5. Субкултивиране или пасаж

III.5.1. Субкултивиране се извършва между тринадесетия и петнадесетия ден. 225 µl от повърхностния слой на културата се прибавя към клетъчните гнезда, които съдържат клетки SHK-1 в активна фаза на нарастване върху пластинките с дванадесет клетъчни гнезда, след това се оставят да инкубират при температура 14 ± 2 °C за максимум осемнадесет дни. Посредством микроскоп клетъчните култури се изследват два пъти, за да се открие ЦПЕ, отначало между петия и седмия ден, после между четиринадесетия и осемнадесетия ден след инокулацията. Ако някоя проба от клетки показва ЦПЕ, незабавно се пристъпва към процедурите за идентификация на вируса (III.6). Ако не се наблюдава никакъв ЦПЕ между четиринадесетия и осемнадесетия ден, се прави хемадсорбционен тест (III.4).

III.5.2. Ако се наблюдава цитотоксикация седем дни след инкубацията, се извършва субкултивация на това ниво и клетките инкубират за четиринадесет до осемнадесет дни, след което се подготвя нова субкултивация, която да съответства на нов инкубационен период от четиринадесет до осемнадесет дни. Ако се наблюдава цитотоксикация след седем дни, се пристъпва към субкултивация и клетките се оставят да инкубират, така че да се достигне общ брой от двадесет и осем до тридесет и шест дена инкубация от деня на първичната инокулация.

III.5.3. В случай на бактериално заразяване в първичната култура, тестът се възобновява, като се използват тъкани от хомогенати, съхранени при температура – 80 °C. Преди инокулация тъканният хомогенат се центрофугира при 4000 g за 30 минути при температура от 0 до 6 °C и супернатантата се филтрира при 0,22 µm, инокулира върху пресни клетки и инкубира през период от още четиринадесет до осемнадесет дни.

III.6. Тестове за идентификация на вируса

Ако в независимо кой стадий се наблюдава доказателство за ЦПЕ или хемадсорбционният тест е положителен, се провежда идентификация на вируса. Методите, които могат да бъдат избрани за идентификация на вируса на ISA, са имунофлуоресценция (IF) (III.6.1) и RT-PCR (част IV). Ако се счита, че е възможно наличието на други вируси, се препоръчва да се проведат допълнителни идентификационни тестове. Ако тези тестове не са позволили окончателната идентификация на вируса в рамките на една седмица, повърхностният слой трябва да бъде изпратен на националната референтна лаборатория или в референтната лаборатория на ЕС за болестите по рибите за незабавна идентификация на вируса.

III.6.1. Имунофлуоресценция

III.6.1.1. SHK-1 клетки (проход 80 или по-нисък) или клетки ТО се култивират в среда L-15, която съдържа 5 % серум от говежди фетус, 2 % (o/o) 200 mM L-глутамин и 0,08 % (o/o) 50 mM 2-меркаптетанол в пластинки с двадесет и четири или деветдесет и шест гнезда и използвани при сливане над 50 %. Други клетъчни поколения или среда на култура с доказана ефикасност могат също да се използват. Прибавят се 225 µl от повърхността на предполагаемата заразена от вируса култура във всяко от двете клетъчни гнезда, смесват се и 225 µl се прехвърлят в други две клетъчни гнезда с разреждане 1:5. Две други неинкулирани клетъчни гнезда се оставят да служат като контролни. Пробите от различните ферми се обработват върху отделни пластинки, както се извършва вирусния контрол. Вирусен контрол се осъществява върху изолат за сравнение с вируса на ISA.

III.6.1.2. Пластинките се инкубират при температура 14 ± 2 °C и се изследват под микроскоп за максимум седем дни. Ако се наблюдава преждевременен ЦПЕ или ЦПЕ не се забелязва в рамките на седем дни, следващият етап е фиксацията. За тази цел клетъчните гнезда се промиват с PBS и се фиксират чрез инкубация с 80 % ацетон в продължение на 20 минути при стайна температура. Пластинките се оставят да изсушат на въздух и се оцветят незабавно или се съхраняват при температура от 0 до 6 °C за не повече от 24 часа преди оцветяването.

III.6.1.3. Дублираните клетъчните гнезда се оцветяват с антивирусни моноклонални антитела ISA 3H6F8 или с друго моноклонално анти тяло с доказани ефикасност и специфичност, разреждат се в PBS и се оставят да инкубират при температура 37 ± 4 °C в продължение на 30 минути. Моноклоналното анти тяло се отстранява и пластинките се промиват три пъти с разтвор 0,05 % в 20 Tween в PBS. Добавя се антимиши IgG-FITC конюгат, маркиран FITC, разреден в PBS, във всяко клетъчно гнездо и се инкубира при температура 37 ± 4 °C в продължение на 30 минути. Забележка: разтворите от различни партии моноклонални антитела и свързаният FITC се оптимизират във всяка лаборатория. Анти тялото се отстранява и пластинките се промиват три пъти с 0,05 % разтвор Tween 20 в PBS.

III.6.1.4. Клетъчните гнезда се изследват незабавно под инвертен микроскоп, оборудван за флуоресценция с адаптиран филтър, който да предизвиква FITC. Даден тест се счита за положителен, ако се наблюдават флуоресцентни клетки. За да е валиден тестът, положителните контролни пластинки трябва да дадат положителен резултат и отрицателните контролни пластинки — отрицателен.

IV. Изследване на образците с тест RT-PCR

IV.1. Настоящият раздел описва необходимите процедури за увеличаване чрез PCR на част от сегмент 8 на генома на вируса на ISA, който може да се проведе върху тъкани от риби или в други култури от вируса.

IV.1.1. Екстракция на РНК

- RNAlater се отстранява от всяка проба. Прибавя се 1 ml дестилирана вода, обработена с DEPC във всяка тубичка, и се центрофугира при 13 000 оборота в минута в продължение на 5 минути при температура от 0 до 6 °C.
- Премахва се супернатантата от всяка проба, след което се добавя 800 µl TRIzol (инвитроген) или друг реактив, за който е доказано, че е с равна или по-висока ефикасност, към всяка проба и контролна тубичка, която съдържа подходящ контролен материал (400 µl dH₂O, или бъбречен хомогенат, взет от риби, свободни от патогенни организми). Ако е необходимо, тъканите се разчепят чрез последователно пипетиране. Тубичките се инкубират на стайна температура в продължение на 5 минути. Прибавят се 160 µl хлороформ във всяка тубичка и тубичките се разклащат енергично в продължение на 3 минути, след което се центрофугират при 13 000 оборота в минута в продължение на 15 минути при температура от 0 до 6 °C.
- Горният воднист слой се отстранява и се прехвърля в етикетирани микротубичка от 1,5 ml, която съдържа 500 µl изопропанол и тубичките се оставят да инкубират в продължение на 10 минути на стайна температура, след това се центрофугира при 6500 оборота в минута в продължение на 15 минути при температура от 0 до 6 °C.

- г) Повърхностният слой се отстранява и се прибавя 1 ml етанол с 75 % в гъстата утайка след центрофугирането на РНК. Тубичките се центрофугират при 6500 оборота в минута в продължение на 5 минути при температура от 0 до 6 °С.
- д) Повърхностният слой се отстранява и тубичките се оставят отворени в продължение на около 3 минути, за да се изпари останалият етанол. Прибавя се 15 µl dH₂O, обработена с DEPC в утайката преминала суспензия, след което се преминава бързо във вихрово движение с образуване на кухина, ако е необходимо.
- е) Използва се спектрофотометър, за да се пресметне концентрацията на РНК и чистотата на пробите. Оптичните плътности се измерват при 260 и 280 nm.
- ж) РНК, която трябва да се използва веднага (същият ден), може да бъде временно съхранена при 0—6 °С. РНК, която не се използва веднага, се съхранява при температура – 80 °С.

IV.1.2. Обратна транскрипция (RT)

- а) Разреждат се 2 µg РНК в дестилирана вода, обработена с DEPC в микротубички от 1,5 ml. Когато концентрацията на пробата в РНК е много ниска, за да могат да се използват 2 µg в реакцията RT, използва се възможно най-голямо количество РНК. Оставя се РНК разреждана да инкубира при температура 55—60 °С в продължение на 10 минути.
- б) Тубичките, които съдържат РНК, се поставят в лед и се добавят реактивите за RT, за да се получат крайните буферни концентрации 1×, 1 mM от dNTP, 100 ng случайни хексамери, 20 единици инхибитор на RNazата и двеста единици MMLV-RT в общ обем 20 µl.
- в) Тубичките инкубират при температура 37 °С в продължение на един час.
- г) кДНК се съхранява при температура от 0 до 6 °С, колкото е необходимо, и се пристъпва към PCR, колкото е възможно по-бързо.

IV.1.3. PCR

- а) Към 45 µl смес PCR се прибавя 5 µl кДНК, за да се получат крайни буферни концентрации 1×, 1,5 mM от MgCl₂, 0,2 mM от всеки dNTP, 25 pmol за всяка капсула и една единица от Taq полимераза. Капсулите са ISA+ (5'-GGC-TAT-CTA-CCA-TGA-ACG-AAT-3') (капсула за чувствителност) и ISA – (5'-GCC-AAG-TGT-AAG-TAG-CAC-TCC-3') (капсула за античувствителност). Включват се отрицателни проверки за екстракция на RT и на PCR.
- б) Тубичките се поставят в термоциклер, програмиран на 94 °С в продължение на 5 минути, последвани от тридесет и пет цикъла при 94 °С в продължение на 1 минута, при 55 °С в продължение на 1 минута и при 72 °С в продължение на 1 минута с крайна инкубация при 72 °С в продължение на 5 минути.
- в) Резултатите от PCR се отчитат след електрофореза с помощта на 2 % агарозен гел, оцветен с етидиев бромид, и който съдържа маркери за големина успоредно с образците и отрицателните контроли за етапите RT и PCR. Само един PCR продукт от 155 bp се счита показателен за наличието на РНК на вируса на ISA. Пробите, които съдържат допълнителен продукт с 310 bp, се считат също така, че съдържат РНК на вируса на ISA. Пробите, които дават многобройни PCR продукти, включително най-малко един продукт с приблизително 155 bp, могат да съдържат ARN на вируса на ISA. Те могат да бъдат подложени при допълнително изследване, което се извършва със сонди ДНК или нуклеотидна последователност.

IV.1.4. Потвърждение с PCR на изолирането на вируса на ISA в тъканна култура

Ако се е проявил пълен цитопатичен ефект (ЦПЕ) по време на вирусологичното изследване на тъканните образци в клетките SHK-1, 400 µl от супернатантата на клетъчното гнездо се премахват и се поставят в стерилна тубичка от 1,5 ml. РНК от тази проба се изважда, както е описано в част III.1, и се провежда тест RT-PCR. В случай на използване на култури, в които ЦПЕ не е пълен, се премахва супернатантата, и клетките се събират чрез остъргване на повърхността на клетъчното гнездо или на флакона и се поставят в стерилна тубичка от 1,5 ml, за да се извади от нея РНК и се провежда тест RT-PCR.

IV.1.5. Потвърждение на продуктите от PCR със сонда ДНК

- а) Специфичността на продукт PCR от 155 bp може да се определи чрез сондиране с олигонуклеотид, който се хибридира в област на продукта PCR, външна на тази на капсулите. Продуктите PCR се подлагат на електрофореза в 1 % агарозен гел успоредно с маркери за големина и на положителна контрола и на отрицателна контрола за етапите RT и PCR.

- б) ДНК се подлага на реакция със Southern-blot върху мембрана и се оставя да инкубира маркирания олигонуклеотид (5'-CGGGAGTTGATCAGACTGA AGGTG-3') с мембраната след подходящите етапи на предварителната хибридизация.
- в) Нефиксираните и неспецифично фиксирани сонди се отстраняват чрез отмиване от мембраната и се онагледяват фиксирани сонди.
- г) Фиксирани сонди към фрагмент от 155 pb (и от 310 pbQ ако тя присъства) е доказателство за специфичността на PCR и показва, че РНК на вируса на ISA е присъствала в образеца.

IV.1.6. Нуклеотидна последователност при продуктите от PCR

Специфичността на продукта PCR може да се установи чрез изследване на нуклеотидна последователност на фрагменти от 155 pb PCR продукт.

- а) PCR продуктът се пречиства, като се започне от агарозния гел или разтвор.
- б) Последователността на фрагмента се определя със същите капсули като тези, използвани за реакцията PCR, или специфичните векторни капсули, ако фрагментът е бил клониран върху вектор, предхождащ определянето на последователността.
- в) Нуклеотидната последователност се сравнява с тези на сегмент 8 от вируса на ISA, който е на разположение в базата данни на нуклеотидната последователност (номера за достъп Y10404, AJ012285, AJ242016).
- г) Наличието на последователност, която съответства на тази на сегмент 8 от вируса на ISA, е доказателство, че пробата съдържа РНК от вируса на ISA.

V. Изследване на бъбречни проби с тест IFAT

V.1. Следният протокол е бил установен за изследване на бъбречните проби с тест IFAT

V.2. Подготовка и оцветяване на пробите

V.2.1. Пластинките се фиксират в ацетон или в смес от метанол/ацетон (1:1) в продължение на 3 минути и се изсушават на въздух. Преди да се оцвети всяка, пластинката се изследва и подходящите зони се обграждат с помощта на молив ImmEdge™ или подобен и пластинката се изсушава на въздух. След това пластинките се поставят в разтвор за блокиране (6 % обезмаслено мляко в PBS, който съдържа 0,2 % Tween 20) и се инкубират при леко разклащане в продължение на 30 минути на стайна температура. Всяка пластинка се изцежда и се поставя хоризонтално в кутия за пластинки, която съдържа влажна хартия за бърсане, за да поддържа влажна атмосфера.

V.2.2. Всяка проба се покрива с разтвор от моноклонално анти тяло 3H6F8 от вируса на ISA (или друго анти тяло с доказани специфичност и ефикасност) и кутията се затваря и се оставя да инкубира, като се разклаща в продължение на 60 минути на стайна температура. Нормално анти тялото се разрежда между 1:10 и 1:100 в обезмаслено мляко с 1 % масленост, но реалното разреждане трябва да се определи за всяка партида. Пластинките се промиват три пъти в продължение на 2 минути в PBS, който съдържа 0,1 % Tween 20. Всяка проба се покрива с разтвор, който съдържа съединение от антимиши кози FITC конюгат, разреден 1:1000 в обезмаслено мляко 1 %, и се оставя да инкубира във влажна атмосфера в продължение на 60 минути на стайна температура. Пластинките се промиват три пъти в продължение на 2 минути в PBS, който съдържа 0,1 % Tween 20. Всяка пластинка се покрива с разтвор от Citifluor™ (500 µl от Citifluor™, смесен с 1,5 ml от Tween 20 с 0,1 % (o/o) в PBS) или друга подходяща за целта среда, в продължение на 10 минути. Пластинките се промиват три пъти с PBS, който съдържа 0,1 % Tween 20. Ако е необходимо контраоцветяване, всяка проба се покрива с пропилдиев йодид (0,01 mg/ml) в PBS, който съдържа 0,1 % Tween 20 и инкубира 3 минути на стайна температура. Пластинките се промиват три пъти в продължение 2 минути в PBS, който съдържа 0,1 % Tween 20. Пластинките се отцеждат и се поставят в Citifluor™ или друга подходяща среда. Пластинките се съхраняват на тъмно при температура 4 °C, преди изследването под микроскоп.

V.3. Изследване с флуоресцентен микроскоп

Всяка пластинка се изследва с микроскоп приспособен за епифлуоресценция, като се използва подходящ филтър, който ще предизвика FITC, като го кара да излъчва характерна зелена флуоресценция. Всички полета разположени в зоните, очертани с молива ImmEdge™, с обективи × 10 и × 20 се изследват и се пристъпва към ново изследване в подозрителните зони (тези, които показват зелена флуоресценция) под обектив × 40 и фазово/флуоресцентно осветяване, което гарантира, че флуоресценцията е локализирана добре в клетката. Координатите на подозрителните зони се записват за следващо потвърждение на естеството на флуоресценцията от втори лаборант, който провежда изследването. След изследването с първия измервателен уред, пластинките, които са положителни или подозрителни, се изследват отново от втори измервателен уред и резултатите се потвърждават.

V.4. Контролни проверки

V.4.1. Трябва да се предвидят три типа контрол за всяка партида от оцветени пластинки за теста IFAT:

- от бъбречна проба от незаразена атлантическа съомга (отрицателна контрола),
- незаразена SHK-1 клетъчна култура или друга чувствителна клетъчна култура (отрицателна контрола),
- клетъчна култура SHK-1, заразена с вируса на ISA или друга чувствителна клетъчна култура (положителна контрола).

V.4.2. Ако е на разположение, бъбречната проба от атлантическа съомга, заразена с вируса на ISA, се препоръчва като допълнителна положителна контрола.

V.4.3. Ако отрицателните контроли дадат положителен резултат, тестът се счита за невалиден за всички пластинки от партидата. Ако всички пластинки от партида, включително положителните контроли са отрицателни, тестът се счита за невалиден за всички пластинки от тази партида. Когато неуспехът от контролните проверки прави невалидна партида от пластинки, те се унищожават и се провежда нов тест от дубликатите на пробите.

V.5. Изследване на други тъкани

Тази техника може да се прилага за други тъкани от риби, като например черен дроб, далак и сърце, при условие че достатъчно количество от ендотелиални клетки, левкоцити и лимфоцити могат да бъдат депозирани върху пластинката. Процедурата по маркиране е същата за всички тъкани, въпреки че за някои тъкани е за предпочитане да се премахне оцветяването с пропидиев йодид, като се разчита на осветяването във фаза, за да идентифицират типовете клетки, които присъстват в пробата.

VI. ХИСТОЛОГИЯ

Пробите, поставени в парафин, се изрязват на 5 µm и се оцветяват с хематоксилин и еозин. Хистологичните промени, свързани с ISA, са описани в настоящото издание на Ръководство за диагностика на болестите по водните животни на МБЕ.

VII. Акроними и съкращения

кДНК	допълнителна дезоксирибонуклеинова киселина
CPE	цитопатичен ефект
DEPC	диетилпиروкарбонат
dNTP	дезоксинуклеотидов трифосфат
FITC	флуоресцинов изотиоцианат
IF	имунофлуоресценция
IFAT	индиректен тест за имунофлуоресценция
OIE	международно бюро по эпизооитите;
NPI(V)	инфекциозна хематопоеична некроза (вирус);
AIS(V)	инфекциозна анемия по съомгите (вирус);
PBS	фосфатно-буферен солеви разтвор
ARN	рибонуклеинова киселина
RT-(PCR)	обратна транскриптаза (полимеразно-верижна реакция)
SHK-1	клетки от предния бъбрек на съомгата
TCID ₅₀	доза, която заразява 50 % от тъканните култури