II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 19 de noviembre de 1992

por la que se establecen los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de determinadas enfermedades de los peces

(92/532/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 91/67/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura [1] y, en particular, su artículo 15,

Considerando que, en virtud del artículo 15 de la Directiva 91/67/CEE, deben establecerse los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico que deban utilizarse para la detección de enfermedades de los animales de acuicultura;

Considerando que el Comité científico veterinario, establecido por la Decisión 81/651/CEE de la Comisión [2] ha sido consultado;

Considerando que las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Los planes de muestreo y los métodos de diagnóstico para la detección y confirmación de la necrosis hematopoyética infecciosa (NHI) y la septicemia hemorrágica viral (SHV) serán los que figuran en el Anexo.

Artículo 2

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 19 de noviembre de 1992.

Por la Comisión

Ray MAC SHARRY

Miembro de la Comisión

---

[1] DO nº L 46 de 19. 2. 1991, p. 1.
[2] DO nº L 233 de 19. 8. 1981, p. 32.

ANEXO

PRIMERA PARTE

PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO Y DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE LA SHV Y LA NHI

I. Muestreo

1. *Calendario de muestreo*

Las explotaciones se someterán a inspecciones clínicas al menos dos veces al año durante el período comprendido entre octubre y junio o siempre que la temperatura del agua sea inferior a 14 °C. Los intervalos entre inspecciones deberán ser de cuatro meses como mínimo. Se inspeccionarán todas las unidades de producción (estanques, tanques, acuarios, jaulas de red, etc.) para comprobar si hay peces muertos, de poco peso o que actúen de manera anormal. Deberá prestarse especial atención a la zona de desagüe (si es posible), donde los peces de poco peso tienden a acumularse debido a la corriente de agua.

2. *Selección y recogida de muestras*

Para realizar los análisis que requieran las inspecciones, se recogerán entre 30 y 150 peces y/o muestras de fluido ovárico, tal como figura en el cuadro 1 A. Si hubiere truchas arco iris, toda la muestra estará compuesta de peces de esa especie ; en caso contrario, la muestra deberá incluir peces de todas las especies presentes siempre que sean propensas a la SHV o la NHI, de conformidad con el Anexo A de la Directiva 91/67/CEE relativa a las condiciones de policía sanitaria aplicables a la puesta en el mercado de animales y de productos de la acuicultura. Las especies estarán representadas en la muestra por igual. Durante los cuatro años de control inicial previos a la obtención de la autorización, la muestra debe componerse de 150 ejemplares para garantizar que la detección de los portadores del virus se realiza con un margen de aproximación del 95 %, estando afectados un 2 % de los animales. En años posteriores (mantenimiento de la autorización), el tamaño de la muestra puede reducirse a 30 a fin de asegurar la detección de los virus con un margen de aproximación del 95 %, estando afectados un 10 % de los animales (cuadro 1 B).

Tratándose de explotaciones que puedan probar documentalmente que siempre han estado libres de SHV y de NHI (gracias a la aplicación regular de un programa oficial de inspección sanitaria), la muestra reducida también podrá utilizarse durante el período de control inicial.

Si se emplea más de una fuente de agua para la producción de peces, la muestra compuesta de 150 o 30 ejemplares podrá incluir peces que representen todos los tipos de fuentes. Los peces de poco peso, que actúen de manera anormal o muertos recientemente (sin descomponer), serán los primeros que se incluyan en la muestra. En caso de que no los haya, ésta deberá estar compuesta de peces sanos de apariencia normal, que hayan sido recogidos de tal modo que estén representadas todas las partes de la explotación y clases de edad.

3. *Preparación y envío de muestras de peces*

Antes de su envío o traslado al laboratorio, se extraerán de los peces partes de los órganos que deban examinarse, con tijeras y pinzas estériles, y se introducirán en tubos de plástico que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10 % de suero de ternera y antibióticos. Puede recomendarse la combinación de 200 UI de penicilina, 200 µg de estreptomicina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque podrán utilizarse asimismo otros antibióticos de eficacia probada. Los tejidos que se examinarán serán el bazo, la parte anterior del riñón, el encéfalo y en algunas ocasiones fluido ovárico (cuadro 1 A y 1 B).

Podrán recogerse en un solo tubo y constituir una muestra conjunta partes de órganos de 5 a 10 peces (cuadro 1 A y 1 B). El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 1 g como mínimo, y será tal que la dilución final sea de 1 : 10.

Los tubos se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo, cajas de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de « bloques congelados » para garantizar la refrigeración de las muestras a una temperatura comprendida entre 0 y 5 °C durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación.

El examen virológico se iniciará lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido 48 horas desde la recogida de las muestras. Si la longitud de los peces que deban examinarse fuere inferior a 6 cm, podrán enviarse peces enteros al laboratorio en bolsas de plástico refrigeradas como se ha indicado anteriormente.

4. *Recogida de material suplementario para diagnóstico*

De acuerdo con el laboratorio de diagnóstico correspondiente, también se podrán recoger otros tejidos de peces, que se prepararán para efectuar exámenes suplementarios.

II. Preparación de las muestras para el examen virológico

1. *Homogeneización de los órganos*

Una vez en el laboratorio, se homogeneizará completamente el tejido de los tubos (con un triturador, mezclador o mortero) y a continuación se suspenderá el homogeneizado en el medio de transporte original. Si la muestra está formada por peces enteros, es decir, peces de menos de 6 cm de longitud, éstos se desmenuzarán con tijeras estériles tras haber eliminado la parte del cuerpo posterior a la cloaca, se homogeneizarán según el procedimiento descrito y se suspenderán en el medio de transporte en la proporción 1 : 10.

2. *Centrifugación del homogeneizado*

El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2 000 y 4 000 x g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 °C, y el sobrenadante se recogerá para su examen.

Si la muestra ha sido enviada en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos), no será necesario aplicar otro tratamiento de antibióticos al sobrenadante.

Si la muestra estaba formada por peces enteros, después de la centrifugación el homogeneizado será expuesto a los antibióticos en el medio de transporte utilizado para la resuspensión, bien durante cuatro horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C.

El tratamiento con antibióticos tiene por fin controlar la contaminación bacteriana de las muestras y hace innecesaria la filtración con filtros de membrana.

Inmediatamente después de la centrifugación un volumen del sobrenadante se mezclará a partes iguales con un antisuero divalente anti-virus de NPI (cepas de referencia Sp y Ab), diluido en la proporción adecuada, y se incubará conjuntamente durante una hora como mínimo a una temperatura de 15 °C y 18 horas como máximo a una temperatura de 4 °C. El título del antisuero deberá ser como mínimo 1 : 2 000 en una prueba de neutralización en placa del 50 %.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero anti-virus de NPI (virus que en algunas partes de Europa está presente en el 50 % de las muestras de peces) tiene por objeto evitar el desarrollo en los cultivos celulares inoculados de efectos citopatogénicos (ECP) debidos al virus de NPI. Con ello se logra reducir la duración de los exámenes virológicos, así como el número de casos en que la presencia de ECP debe considerarse como un indicador potencial de SHV o NHI.

Cuando las muestras procedan de unidades de producción consideradas exentas de NPI, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero anti-virus de NPI.

III. Exámenes virológicos

1. *Cultivos y medios celulares*

Se cultivarán las células BF-2 y o bien EPC o bien FHM a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C en el medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle (o sus modificaciones) con adición de un 10 % de suero vacuno fetal y antibióticos en concentraciones normales.

Si las células se cultivan en frascos cerrados, el medio se amortiguará con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas deberá amortiguarse con Tris-HCl (23 mM) y bicarbonato sódico (6 mM) con un pH lo más próximo posible a 7,6, el más idóneo para la multiplicación de virus.

Para la inoculación con tejidos se emplearán cultivos celulares jóvenes (de entre 4 y 48 horas) y en crecimiento activo (no confluente) en el momento de la inoculación.

2. *Inoculación de los cultivos celulares*

La suspensión del órgano tratada con antibióticos se inoculará en cultivos celulares en dos diluciones, es decir, la dilución original y, además, una dilución 1 : 100 de ésta (a fin de evitar interferencias homólogas). Deberán inocularse, como mínimo, dos líneas celulares (véase el punto III.1). La relación entre el tamaño del inóculo y el volumen del medio de cultivo celular será aproximadamente de 1 : 10.

Para cada dilución y cada línea celular se empleará al menos un área celular de 2 cm^2 aproximadamente, correspondiente a un pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda el uso de placas de cultivo celular, aunque también son aceptables otras unidades con áreas de cultivo similares o mayores.

3. *Incubación de los cultivos celulares*

Los cultivos celulares inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 °C. Si el color del medio de cultivo pasa de rojo a amarillo, lo que indica la acidificación del medio, se llevará a cabo el ajuste del pH con una solución estéril de bicarbonato, o con una sustancia equivalente, para garantizar la propensión celular a la infección viral.

Cada seis meses se efectuará la titulación del material congelado de virus de SHV y NHI para comprobar la propensión de los cultivos celulares a la infección.

4. *Microscopía*

Se observarán diariamente a unos 40 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si hay signos evidentes de ECP, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con el punto IV.

Al mismo tiempo, se adoptarán las medidas oportunas para suspender la autorización de la unidad de producción de donde proceda la muestra que haya dado resultados positivos, así como la de todas las unidades de producción que manejen material procedente de aquélla.

La suspensión de la autorización se mantendrá hasta que las pruebas de laboratorio hayan demostrado que el virus en cuestión no es el de la SHV ni el de la NHI. Se concederá un plazo máximo de cuatro semanas para la identificación del virus, incluido el tiempo necesario para la realización de análisis en los laboratorios de referencia.

5. *Subcultivos*

Si después de una incubación de siete días no se han desarrollado ECP, se realizarán subcultivos en nuevos cultivos celulares, utilizando áreas celulares similares a las del cultivo inicial.

Se reunirán alícuotas del medio de todos los cultivos/pocillos pertenecientes al cultivo inicial por líneas celulares a continuación de un ciclo de congelación y descongelación de cultivos, y se mezclarán 0,5 ml del medio con una parte igual del antisuero anti-NPI descrito en el punto II.2; la mezcla se incubará durante 60 minutos a una temperatura de 15 °C. A continuación, se inoculará en cultivos celulares homólogos en diluciones de 1 : 1 y 1 : 100, como se describe en el punto III.2. La inoculación podrá ir precedida de la preincubación de las diluciones con el antisuero divalente anti-NPI con una dilución adecuada.

Los cultivos inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 °C, según se indica en el punto III.4.

IV. Identificación del virus

1. *Neutralización*

Si se observare la existencia de ECP en un cultivo celular, se eliminarán las células mediante centrifugación a baja velocidad o por filtración con membrana (0,45 µm) y se diluirá el medio a 1 : 100 y 1 : 10 000 en un medio de cultivo celular.

Se mezclarán alícuotas de las diluciones con partes iguales de los siguientes reactivos, por separado, y se incubarán durante 60 minutos a una temperatura de 15 °C:

— anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la SHV (virus Egtved)	1 : 50 *
— anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (virus de NHI)	1 : 50 *
— antisuero divalente específico anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa (virus de NPI) (cepas de referencia Sp y Ab)	1 : 50 *
— medio	1 : 1

* o del modo indicado por el laboratorio de referencia en lo que respecta a la posible citotoxicidad de los antisueros.

Los reactivos utilizados serán de calidad de referencia en lo que respecta al título y a la especificidad.

De cada mezcla de suero y virus, se inocularán al menos dos cultivos celulares con 50 µl cada uno, y se incubarán a 15 °C. Se comprobará la aparición de ECP, según se indica en el punto III.4.

Si la prueba no ha permitido identificar con certeza el virus en el plazo de una semana, deberá adoptarse una de las siguientes medidas:

a) trasladar el virus a un laboratorio nacional de referencia para virus de peces para su identificación inmediata;

b) aplicar la prueba de adsorción por inmunofluorescencia (IFAT) (punto IV.2), la prueba ELISA (punto IV.3) u otras técnicas de identificación de virus, utilizando reactivos de calidad de referencia.

2. *Imnunofluorescencia (IFAT)*

Para cada aislado vírico que se desee identificar, se sembrarán con células EPC al menos ocho cubres o sus equivalentes a una densidad que permita alcanzar una confluencia del 60 al 90 % aproximadamente después de 24 horas de cultivo. Se preferirán las células EPC por su fuerte adherencia a las superficies de cristal.

Cuando las células hayan sedimentado en la superficie del cristal (aproximadamente una hora después de la siembra) o cuando los cultivos hayan sido incubados durante un máximo de 24 horas, se inoculará el virus que se desee identificar. Se inocularán cuatro cultivos en la proporción de 1 : 10 en volumen y otros cuatro en la proporción de 1 : 100.

Cuando hayan transcurrido entre 20 y 30 horas después de la inoculación, los cultivos se aclararán dos veces en medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle sin suero, se fijarán con acetona y se teñirán con ayuda de la inmunofluorescencia de doble capa. La primera capa de reactivo está formada por un antisuero aprobado (como se indica en el punto IV.1). La segunda capa de reactivo está formada por un antisuero conjugado con isotiocianato de fluoresceína con afinidad por la inmunoglobulina utilizada en la primera capa. Para cada uno de los antisueros analizados, se efectuará como mínimo la tinción de un cultivo inoculado con una dosis elevada y de otro inoculado con una dosis baja. La prueba incluirá controles positivos y negativos apropiados.

Los cultivos teñidos se prepararán utilizando solución salina de glicerol y se examinarán con luz ultravioleta incidente, utilizando oculares de 10 × o 12 × y objetivos de 25 × o 40 × con aperturas numéricas > 0,7 y > 1,3, respectivamente. Las diluciones del antisuero inicial y de la inmunoglobulina conjugada con isotiocianato de fluoresceína dependerán de la disposición del microscopio escogido o disponible.

Algunas cepas del virus Egtved presentan una fuerte reacción con el antisuero anti-cepa de referencia F1 en la prueba de inmunofluorescencia, aunque no presenten reacción alguna en las pruebas de neutralización.

3. *Ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA)*

Los pocillos de las placas de microtitulación (por ejemplo, inmunoplacas-Nunc, Maxisorp, Nunc, Dinamarca) se recubrirán durante una noche con las diluciones recomendadas de fracciones inmunoglobulínicas purificadas de proteína A de los antisueros mencionados en el punto IV.1.

Tras aclarar los pocillos con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se incorporará a los pocillos el virus que se desee identificar en fases de dilución dobles o cuádruples y se dejará reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento durante 60 minutos a 37 °C. Tras el aclarado con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se añadirán anticuerpos con biotinil de la especificidad correspondiente a la de los anticuerpos de recubrimiento y se dejará reaccionar durante 60 minutos a 20 °C. Después de efectuar otro aclarado como el anterior, se añadirá estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y se dejará reaccionar durante una hora a 20 °C. Tras efectuar un último aclarado, se visualizará la enzima ligada utilizando sustratos ELISA adecuados (OPD, TMB u otros).

Esta versión de ELISA basada en el empleo de biotina y avidina se ofrece a modo de ejemplo. En su lugar podrán utilizarse otras versiones de eficacia probada.

Cuadro 1 A

Obtención de la autorización

	Número de pecciones clínicas anuales	Número de peces utilizados para el análisis de órganos	Número de peces utilizados para el análisis de fluido ovárico
Zonas continentales			
a) Explotaciones con reproductores	2	120 (1ª serie) 150 (2ª serie)	30 (1ª serie) 0
b) Explotaciones con reproductores únicamente	2	0	150 (1ª o 2ª serie)
c) Explotaciones sin reproductores	2	150 (1ª y 2ª serie)	0
Zonas costeras			
a) Explotaciones sin reproductores	2	30 (1ª y 2ª serie)	0
b) Explotaciones con reproductores	2	120 (1ª serie) 150 (2ª serie)	30 (1ª serie) 0

Número máximo de peces por muestra conjunta: 5.

Cuadro 1 B

Mantenimiento de la autorización

	Número de pecciones clínicas anuales	Número de peces utilizados para el análisis de órganos	Númro de peces utilizados para el análisis de fluido ovárico
Zonas continentales			
a) Explotaciones con reproductores	2	15 (1ª o 2ª serie)	15 (1ª o 2ª serie)
b) Explotaciones con reproductores únicamente	2	0	30 (1ª o 2ª serie)
c) Explotaciones sin reproductores	2	30 (1ª o 2ª serie)	0
Zonas costeras			
a) Explotaciones sin reproductores	1	30 (1) (1ª o 2ª serie)	0
b) Explotaciones con reproductores	2	0	30 (1ª o 2ª serie)

Número máximo de peces por muestra conjunta : 10

(1) Las muestras deberán haberse recogido entre dos y seis meses después de haber trasladado los peces de agua dulce a agua salada.

SEGUNDA PARTE

PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA NHI Y DE LA SHV EN CASO DE BROTES SOSPECHOSOS

El diagnóstico de la NHI y de la SHV se podrá realizar mediante alguna de las siguientes técnicas:

— A. Aislamiento convencional del virus y posterior identificación serológica del mismo,

— B. Aislamiento e identificación serológica simultánea del virus,

— C. Técnicas rápidas de diagnóstico (IFAT, ELISA).

En las explotaciones de las zonas autorizadas, el primer diagnóstico de la NHI y de la SHV no deberá basarse sólo en la técnica C. Deberá utilizarse también el método A o el B.

Es posible que en algunos casos los tejidos destinados al examen virológico tengan que ir acompañados de material suplementario para exámenes bacteriológicos, parasitológicos, histológicos o de otro tipo que permitan un diagnóstico diferencial. Este material se recogerá de acuerdo con los procedimientos establecidos por la OIE.

A. Aislamiento convencional del virus y posterior identificación serológica del mismo

A.I.1. *Selección de muestras*

Para el análisis se seleccionarán como mínimo diez peces que muestren los síntomas típicos de la NHI o de la SHV.

A.I.2. *Preparación y envío de muestras de peces*

Antes de su envío o traslado al laboratorio, se extraerán de los peces partes de los órganos que deban examinarse, con tijeras y pinzas estériles, y se introducirán en tubos de plástico que contengan medio de transporte, es decir, medio de cultivo celular con un 10 % de suero de ternera y antibióticos. Puede recomendarse la combinación de 200 UI de penicilina, 200 µg de estreptomicina y 200 µg de kanamicina por ml, aunque podrán utilizarse asimismo otros antibióticos de eficacia probada. Los órganos que deberán examinarse son el bazo, la parte anterior del riñón y el encéfalo.

Podrán recogerse en un solo tubo y constituir una muestra conjunta partes de órganos de 5 a 10 peces. El peso del tejido de cada muestra deberá ser de 1 g como mínimo, y será tal que la dilución final esté alrededor de 1 : 10.

Los tubos se colocarán en recipientes aislados (por ejemplo, cajas de poliestireno de paredes gruesas) con una cantidad suficiente de hielo o de « bloques congelados » para garantizar la refrigeración de las muestras a una temperatura comprendida entre 0 y 5 °C durante su traslado al laboratorio. Se evitará la congelación.

El examen virológico se iniciará lo antes posible y nunca después de que hayan transcurrido 48 horas desde la recogida de las muestras. Si la longitud de los peces que deban examinarse fuere inferior a 6 cm, podrán enviarse peces enteros al laboratorio en bolsas de plástico refrigeradas como se ha indicado anteriormente.

A.I.3. *Recogida de material suplementario para diagnóstico*

De acuerdo con el laboratorio de diagnóstico correspondiente, también se podrán recoger otros tejidos de peces, que se prepararán para efectuar exámenes suplementarios.

A.II.1. *Homogeneización de los órganos*

Una vez en el laboratorio, se homogeneizará completamente el tejido de los tubos (con un triturador, mezclador o mortero) y a continuación se suspenderá el homogeneizado en el medio de transporte original. Si la muestra está formada por peces enteros, es decir, peces de menos de 6 cm de longitud, se desmenuzarán con tijeras estériles tras haber eliminado la parte del cuerpo posterior a la cloaca, se homogeneizarán según el procedimiento descrito y se suspenderán en el medio de transporte en la proporción 1 : 10.

A.II.2. *Centrifugación del homogeneizado*

El homogeneizado se centrifugará a una aceleración de entre 2 000 y 4 000 × g durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada a una temperatura comprendida entre 2 y 5 °C, y el sobrenadante se recogerá para su examen.

Si la muestra ha sido enviada en un medio de transporte (es decir, con exposición a antibióticos), no es necesario aplicar otro tratamiento de antibióticos al sobrenadante.

Si la muestra estaba formada por peces enteros, después de la centrifugación el homogeneizado será expuesto a los antibióticos en el medio de transporte utilizado para la resuspensión, bien durante cuatro horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C.

El tratamiento con antibióticos tiene por fin controlar la contaminación bacteriana de las muestras y hace innecesaria la filtración con filtros de membrana. Inmediatamente después de la centrifugación, se mezclará un volumen del sobrenadante a partes iguales con un antisuero divalente anti-virus de NPI (cepas de referencia Sp y Ab), diluido en la proporción adecuada, y se incubará conjuntamente durante una hora como mínimo a una temperatura de 15 °C o 18 horas como máximo a una temperatura de 4 °C. El título del antisuero deberá ser como mínimo 1 : 2 000 en una prueba de neutralización en placa del 50 %.

El tratamiento de todos los inóculos con antisuero anti-virus de NPI (virus que en algunas partes de Europa está presente en el 50 % de las muestras de peces) tiene por objeto evitar el desarrollo en los cultivos celulares inoculados de efectos citopatogénicos (ECP) debidos al virus de NPI. Con ellos se logra reducir la duración de los exámenes virológicos, así como el número de casos en que la presencia de ECP debe considerarse como un indicador potencial de SHV o NHI.

Cuando las muestras procedan de unidades de producción consideradas exentas de NPI, podrá omitirse el tratamiento de los inóculos con antisuero anti-virus de NPI.

A.III.1. *Cultivos y medios celulares*

Se cultivarán las células BF-2 y o bien EPC o bien FHM a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C en el medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle (o sus modificaciones) con adición de un 10 % de suero vacuno fetal y antibióticos en concentraciones normales.

Si las células se cultivan en frascos cerrados, el medio se amortiguará con bicarbonato. El medio utilizado para el cultivo de células en unidades abiertas deberá amortiguarse con Tris-HCI (23 mM) y bicarbonato sódico (6 mM) con un pH lo más próximo posible a 7,6, el más idóneo para la multiplicación de virus.

Para la inoculación con tejidos se emplearán cultivos celulares jóvenes (de entre 4 y 48 horas) y en crecimiento activo (no confluente) en el momento de la inoculación.

A.III.2. *Inoculación de los cultivos celulares*

La suspensión del órgano tratada con antibióticos se inoculará en cultivos celulares en dos diluciones, es decir, la dilución original y, además, una dilución 1 : 100 de ésta (a fin de evitar interferencias homólogas). Deberán inocularse, como mínimo, dos líneas celulares (véase punto A.III.1).

La relación entre el tamaño del inóculo y el volumen del medio de cultivo celular será aproximadamente de 1 : 10.

Para cada dilución y cada línea celular se empleará al menos un área celular de 2 cm^2 aproximadamente, correspondiente a un pocillo de una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Se recomienda el uso de placas de cultivo celular, aunque también son aceptables otras unidades con áreas de cultivo similares o mayores.

A.III.3. *Incubación de los cultivos celulares*

Los cultivos celulares inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 °C. Si el color del medio de cultivo celular pasa de rojo a amarillo, lo que indica la acidificación del medio, se llevará a cabo el ajuste del pH con una solución estéril de bicarbonato, o con una sustancia equivalente, para garantizar la propensión celular a la infección viral.

Cada seis meses se efectuará la titulación de material congelado de virus de SHV y NHI para comprobar la propensión de los cultivos celulares a la infección.

A.III.4. *Microscopía*

Se observarán diariamente a unos 40 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si hay signos evidentes de ECP, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con el punto A.IV.

Al mismo tiempo, se adoptarán las medidas necesarias para suspender la autorización de la unidad de producción de donde proceda la muestra que haya dado resultados positivos, así como la de todas las unidades de producción que manejen material procedente de aquélla.

La suspensión de la autorización se mantendrá hasta que las pruebas de laboratorio hayan demostrado que el virus en cuestión no es el de la SHV ni el de la NHI. Se concederá un plazo máximo de cuatro semanas para la identificación del virus, incluido el tiempo necesario para la realización de análisis en los laboratorios de referencia.

A.III.5. *Subcultivos*

Si después de una incubación de siete días no se han desarrollado ECP, se realizarán subcultivos en nuevos cultivos celulares, utilizando áreas celulares similares a las del cultivo inicial.

Se reunirán según la línea celular alícuotas del medio de todos los cultivos/pocillos pertenecientes al cultivo inicial a continuación de un ciclo de congelación y descongelación de cultivos, y se mezclarán 0,5 ml de medio a partes iguales con el antisuero anti-NPI descrito en el punto A.II.2; la mezcla se incubará durante 60 minutos a una temperatura de 15 °C. A continuación, se inoculará en cultivos celulares en diluciones de 1 : 1 y 1 : 100, como se describe en el punto A.III.2. La inoculación podrá ir precedida de la preincubación de las diluciones con el antisuero divalente anti-virus de NPI con una dilución adecuada.

Los cultivos inoculados se incubarán durante siete días a una temperatura de 15 °C, según se indica en el punto A.III.4.

A.IV.1. *Neutralización*

Si se observare la existencia de ECP en un cultivo celular, se eliminarán las células mediante centrifugación a baja velocidad o por filtración con membrana (0,45 µm) y se diluirá el medio a 1 : 100 y 1 : 10 000 en un medio de cultivo celular.

Se mezclarán alícuotas de las diluciones con partes iguales de los siguientes reactivos, por separado, y se incubarán durante 60 minutos a una temperatura de 15 °C:

— anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de SHV (virus Egtved)	1 : 50 *
— anticuerpo con especificidad de grupo frente al virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (virus de NHI)	1 : 50 *
— antisuero divalente específico anti-virus de la necrosis pancreática infecciosa (virus de NPI) (cepas de referencia SP y Ab)	1 : 50 *
— medio	1 : 1

* o del modo indicado por el laboratorio de referencia en lo que respecta a la posible citotoxicidad de los antisueros.

De cada mezcla de suero y virus, se inocularán al menos dos cultivos celulares con 50 µl cada uno, y se incubarán a 15 °C. Se comprobará la aparición de ECP, según se indica en el punto A.III.4.

Si la prueba no ha permitido identificar con certeza el virus en el plazo de una semana, deberá adoptarse una de las siguientes medidas:

a) trasladar el virus a un laboratorio nacional de referencia para virus de peces para su identificación inmediata;

b) aplicar la prueba de adsorsión por inmunofluorescencia (IFAT) (punto A.IV.2), la prueba ELISA (punto A.IV.3) u otras técnicas de identificación de virus, utilizando reactivos de calidad de referencia.

A.IV.2. *Inmunofluorescencia (IFAT)*

Para cada aislado vírico que se desee identificar, se sembrarán con células EPC al menos 8 cubres o sus equivalentes a una densidad que permita alcanzar una confluencia del 60 al 90 % aproximadamente después de 24 horas de cultivo. Se preferirán las células EPC por su fuerte adherencia a las superficies de cristal.

Cuando las células hayan sedimentado en la superficie del cristal (aproximadamente una hora después de la siembra) o cuando los cultivos hayan sido incubados durante un máximo de 24 horas, se inoculará el virus que se desee identificar. Se inocularán cuatro cultivos en la proporción de 1 : 10 en volumen y otros cuatro en la proporción de 1 : 100.

Cuando hayan transcurrido entre 20 y 30 horas después de la inoculación, los cultivos se aclararán dos veces en medio mínimo fundamental (MEM) de Eagle sin suero, se fijarán con acetona y se teñirán con ayuda de la inmunofluorescencia de doble capa. La primera capa de reactivo está formada por un antisuero aprobado (como se indica en el punto IV.1). La segunda capa de reactivo está formada por un antisuero conjugado con isotiocianato de fluoresceína con afinidad por la inmunoglobulina utilizada en la primera capa. Para cada uno de los antisueros analizados, se efectuará como mínimo la tinción de un cultivo inoculado con una dosis elevada y de otro inoculado con una dosis baja. La prueba incluirá controles positivos y negativos apropiados.

Los cultivos teñidos se prepararán utilizando solución salina de glicerol y se examinarán con luz ultravioleta incidente, utilizando oculares de 10× o 12× y objetivos de 25× o 40× con aperturas numéricas >0,7 y >1,3 respectivamente. Las diluciones del antisuero inicial y de la inmunoglobulina conjugada con isotiacianato de fluoresceína dependerán de la disposición del microscopio escogido o disponible.

Algunas cepas del virus Egtved presentan una fuerte reacción con el antisuero anti-cepa de referencia F1 en la prueba de inmunofluorescencia, aunque no presenten reacción alguna en las pruebas de neutralización.

A.IV.3. *Ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA)*

Los pocillos de las placas de microtitulación (por ejemplo, inmunoplacas-Nunc, Maxisorp, Nunc, Dinamarca) se recubrirán durante una noche con las diluciones recomendadas de fracciones inmunoglobulínicas purificadas de proteína A de los antisueros mencionados en el punto A.IV.1.

Tras aclarar los pocillos con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se incorporará a los pocillos el virus que se desee identificar en fases de dilución dobles o cuádruples y se dejará reaccionar con el anticuerpo de recubrimiento durante 60 minutos a 37 °C. Tras el aclarado con solución amortiguadora PBS-Tween-20, se añadirán anticuerpos con biotinil de la especificidad correspondiente a la de los anticuerpos de recubrimiento y se dejará reaccionar durante 60 minutos a 20 °C. Después de efectuar otro aclarado como el anterior, se añadirá estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) y se dejará reaccionar durante una hora a 20 °C. Tras efectuar un último aclarado, se visualizará la enzima ligada utilizando sustratos ELISA adecuados (OPD, TMB u otros).

Esta versión de ELISA basada en el empleo de biotina y avidina se ofrece a modo de ejemplo. En su lugar podrán utilizarse otras versiones de eficacia probada.

B. Aislamiento e identificación serológica simultánea del virus

B.I.1. *Selección de muestras*

Procédase del modo indicado en el punto A.I.1.

B.I.2. *Preparación y envío de muestras de peces*

Procédase del modo indicado en el punto A.I.2.

B.II.1. *Homogeneización de los órganos*

Procédase del modo indicado en el punto A.II.1.

B.II.2. *Centrifugación del homogeneizado*

Procédase del modo indicado en el punto A.II.2.

B.II.3. *Tratamiento del sobrenadante con antisueros para diagnóstico*

La suspensión del órgano tratada con antibióticos y antisuero anti-virus de NPI se diluirá a 1 : 10 y 1 : 10 000 en un medio de cultivo celular; las alícuotas se mezclarán a partes iguales con los reactivos enumerados en el punto A.IV.1 y se incubarán durante 60 minutos a 15 °C.

B.III.1. *Cultivos y medios celulares*

Procédase del modo indicado en el punto A.III.1.

B.III.2. *Inoculación de los cultivos celulares*

De cada mezcla de suero y virus (preparada del modo indicado en el punto B.II.3), se inocularán al menos dos cultivos celulares por línea celular con 50 µl cada uno.

B.III.3. *Incubación de los cultivos celulares*

Procédase del modo indicado en el punto A.III.3.

B.III.4. *Microscopía*

Se observarán diariamente a unos 40 aumentos los cultivos celulares inoculados para comprobar si se han producido ECP. Si se ha logrado evitar la aparición de ECP gracias a alguno de los antisueros utilizados, el virus podrá considerarse identificado. En caso contrario, se iniciarán inmediatamente los procedimientos de identificación del virus de conformidad con el punto A.IV.

B.III.5. *Subcultivos*

Si no se han observado ECP después de siete días, se realizarán subcultivos a partir de los cultivos inoculados con sobrenadante y medio (B.II.3).

C. Técnicas rápidas de diagnóstico (IFAT, ELISA)

Las técnicas IFAT o ELISA descritas en los puntos A.IV.2 y A.IV.3, respectivamente, se aplicarán al sobrenadante, que se habrá preparado del modo indicado en el punto A.II.2. Estas técnicas rápidas se completarán con un examen virológico con arreglo a los puntos A o B antes de que hayan transcurrido 48 horas desde la toma de la muestra, si

a) se obtuviere una reacción negativa, o

b) se obtuviere una reacción positiva con material que constituya el primer caso de NHI o SHV en una zona autorizada.