

32001D0183

9.3.2001

EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA

L 67/65

KOMISJONI OTSUS,

22. veebruar 2001,

milles sätestatakse proovivõtuplaanid ja diagnostikameetodid teatavate kalahaiguste avastamiseks ja nende esinemise kinnitamiseks ning millega tunnistatakse kehtetuks komisjoni otsus 92/532/EMÜ

(teatavaks tehtud numbri K(2001) 426 all)

(EMPs kohaldatav tekst)

(2001/183/EÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 28. jaanuari 1991. aasta direktiivi 91/67/EMÜ akvakultuurloomade ja -toodete turuleviimist reguleerivate loomatervishoiunõuete kohta, ⁽¹⁾ viimati muudetud direktiiviga 98/45/EÜ, ⁽²⁾ eriti selle artiklit 15,

ning arvestades järgmist:

- (1) Proovivõtuplaanid ja diagnostikameetodid teatavate kalahaiguste avastamiseks ja nende esinemise kinnitamiseks on sätestatud komisjoni otsuses 92/532/EMÜ, ⁽³⁾ muudetud komisjoni otsusega 96/240/EÜ. ⁽⁴⁾
- (2) Pärast otsuse 92/532/EMÜ vastuvõtmist on ilmnenud uusi praktilisi ja teaduslikke suundumusi ning direktiivi 91/67/EMÜ on muudetud. Seetõttu on vaja proovivõtuplaane ja diagnostikameetodeid ajakohastada.
- (3) Kõnealune ajakohastamine hõlmab viiruslikku hemorraagilist septitseemiat (VHS) ja nakkuslikku vereloomekroosi (IHN) tekitavate viiruste uurimist ja samastamist ning kooskõlas direktiivi 91/67/EMÜ viimaste muudatustega tehtavaid muudatusi.
- (4) On konsulteeritud ühenduse kalahaiguste tugilaboriga, mis asutati nõukogu direktiiviga 93/53/EMÜ. ⁽⁵⁾
- (5) Komisjoni otsusega 92/532/EMÜ kehtestatud proovivõtuplaanid ja diagnostikameetodid teatavate kalahaiguste avastamiseks ja nende esinemise kinnitamiseks tuleb selguse huvides kehtetuks tunnistada.

- (6) Käesoleva otsusega ettenähtud meetmed on kooskõlas alalise veterinaarkomitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA OTSUSE:

Artikkel 1

Proovivõtuplaanid ja diagnostikameetodid viirusliku hemorraagilise septitseemia (VHS) ja nakkusliku vereloomekroosi (IHN) avastamiseks ja nende esinemise kinnitamiseks on sätestatud lisas.

Artikkel 2

Käesoleva otsusega tunnistatakse kehtetuks otsus 92/532/EMÜ.

Artikkel 3

Käesolev otsus on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 22. veebruar 2001

Komisjoni nimel
komisjoni liige
David BYRNE

⁽¹⁾ EÜT L 46, 19.2.1991, lk 1.

⁽²⁾ EÜT L 189, 3.7.1998, lk 12.

⁽³⁾ EÜT L 337, 21.11.1992, lk 18.

⁽⁴⁾ EÜT L 79, 29.3.1996, lk 19.

⁽⁵⁾ EÜT L 175, 19.7.1993, lk 23.

LISA

PROOVIVÕTUPLAANID JA DIAGNOSTIKAMEETODID VIIRUSLIKU HEMORRAAGILISE SEPTITSEEMIA (VHS) JA NAKKUSLIKU VERELOOMENEKROOSI (IHN) AVASTAMISEKS JA NENDE ESINEMISE KINNITAMISEKS

SISSEJUHATUS

Käesolev lisa:

- a) sisaldab proovivõtuplaanide ja diagnostikameetodite suuniseid ja miinimumnõudeid viirusliku hemorraagilise septitseemia (VHS) ja nakkusliku vereloomenekroosi (IHN) avastamiseks ja esinemise kinnitamiseks;
- b) koondab direktiivi 91/67/EMÜ B ja C lisa sätteid heakskiidetud võõndi ja heakskiitmata võõndis asuva heakskiidetud kasvanduse staatuse andmise ja säilitamise kohta;
- c) sisaldab sätteid, mis käsitlevad VHSi ja IHNi õiget diagnoosimist ning võõndide ja heakskiitmata võõndites asuvate kasvanduste staatuse ametlikku tunnustamist vastavalt direktiivi 91/67/EMÜ artiklitele 5 ja 6;
- d) on suunatud VHSi ja IHNi tõrje eest vastutavatele ametiasutustele ning nende haiguste suhtes analüüse tegevatele laboritöötajatele, seepärast on rõhk proovivõtumeetoditel, laborikatsete põhimõtetel ja otstarvetel ning tulemuste hindamisel, samuti üksikasjalikel analüüsimeetoditel. Vajaduse korral võivad laborid siiski kasutada käesolevas lisas kirjeldatud katsete teisendeid või muid katseid, tingimusel, et saab tõendada samaväärset tundlikkust ja spetsiifilisust.

I osa sisaldab VHSi ja IHNi järelevalve proovivõtuplaane ja diagnostikameetodeid heakskiidetud võõndi ja heakskiitmata võõndis asuva heakskiidetud kalakasvanduse staatuse saamiseks ja säilitamiseks.

II osas kirjeldatakse diagnostikameetodeid VHSi ja IHNi kahtluse kinnitamiseks.

III osas sätestatakse kriteeriumid ja suunised ametliku veterinaarkontrolliprogrammi jaoks, mille andmetega tõendatakse VHSi ja/või IHNi varasem puudumine.

IV osas esitatakse soovitusel VHS- ja IHN-viiruste tiitrimismeetodi kohta, mille abil kontrollitakse rakukultuuride vastuvõtlikkust nakkusele.

V osas on loetletud akronüümid ja lühendid.

I OSA

VHSi ja IHNi järelevalve proovivõtuplaanid ja diagnostikameetodid heakskiidetud võõndi ja heakskiitmata võõndis asuva heakskiidetud kalakasvanduse staatuse saamiseks ja säilitamiseks**I. Kontroll ja proovide võtmine**

1. VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse saamiseks või säilitamiseks piirkondade või heakskiitmata piirkondades asuvate kasvanduste järelevalves vajalikke kliinilisi kontrole, proovide valimist ja võtmist käsitlevad üldsätted

Kokkuvõttes kalade kliiniliste veterinaarkontrollide ja koeproovide ja/või ovariaalvedeliku proovide võtmise kohta piirkondadele või heakskiitmata piirkondades asuvatele kasvandustele VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse andmiseks või nende staatuse säilitamiseks kooskõlas direktiivi 91/67/EMÜ B ja C lisaga on esitatud tabelites 1 A, 1B ja 1C. Täiendavad üksikasjad on sätestatud osades II.2–II.4. Tabeleid 1 A ja 1B ei kohaldata uute kasvanduste ega kasvanduste suhtes, mis taasalustavad tegevust heakskiidetud võõndist või heakskiitmata võõndis asuvast heakskiidetud kasvandusest saadud kalade, marja või sugurakkude abil, tingimusel, et nad järgivad direktiivi 91/67/EMÜ C lisa I.A.6 osa punktis a või b või II.A.3. osa punktis a või b sätestatud nõudeid.

Kliinilisi kontrole tuleb teha ajavahemikus oktoobrist juunini või kui vee temperatuur on alla 14 °C. Kui kasvandusi kontrollitakse kaks korda aastas, peab kontrollide vahe olema vähemalt neli kuud. Kõikides tootmisüksustes (tiigid, basseinid, võrksumbad jms) kontrollitakse surnud, nõrkade või ebaloosulult käituvate kalade olemasolu. Eelkoige tuleb tähelepanu pöörata vee väljavoolukohtadele, kuhu nõrgad kalad kipuvad kogunema veevoolu tõttu.

Proovide võtmiseks valitakse kalu järgmiselt.

- Kui kalade hulgas leidub vikerforelli, valitakse proovide võtmiseks ainult seda liiki kalu. Kui vikerforelli ei leidu, tuleb valim koostada kõikidest teistest liikidest, mis on VHSi või IHNi viirusele vastuvõtlikud (vastavalt loetelule direktiivi 91/67/EMÜ A lisas). Liigid peavad olema valimis proportsionaalselt esindatud.
- Kui kalakasvatuseks kasutatakse mitut veeallikat, peab valim hõlmama kalu kõikidest veeallikatest.
- Kui leitakse nõrku, ebatavaliselt käituvaid või äsja surnud (mitte veel lagunened) kalu, võetakse valimisse eelkõige selliseid kalu. Kui selliseid kalu ei ole, peavad valitud kalad olema normaalse välimusega terved kalad, kes on kogutud nii, et valimis oleksid proportsionaalselt esindatud kõik kasvanduse osad ja kõik aastakäigud.

2. *VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse saamiseks või säilitamiseks vajalikku piirkondade või heakskiitmata piirkondades asuvate kasvanduste järelevalvet, sealhulgas proovide võtmist käsitlevad erisätted*

1. Piirkond või heakskiitmata piirkonnas asuv kasvandus, mis on ametliku teenistuse järelevalve all, võib saada VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse järgmistel tingimustel:

a) mudel A – kaheaastane järelevalveprogramm

Kui vähemalt kaks aastat ei ole esinenud VHSi ja/või IHNi kliinilisi või muid tunnuseid, kontrollitakse veterinaarselt kõiki heakskiitu taotleva piirkonna kasvandusi või iga heakskiitmata piirkonnas asuvat heakskiitu taotlevat kasvandust vähemalt kaks korda aastas kahe aasta jooksul. Nimetatud kaheaastase kontrollaja jooksul, mis eelneb heakskiidetud staatuse saamisele, ei tohi esineda VHSi ja/või IHNi kliinilisi või muid tundemärke ning proove tuleb uurimiseks koguda vastavalt tabelile 1A. Proovid tuleb valida, ette valmistada ja analüüsida vastavalt osadele I.I–I.IV ja laboriuuringute tulemused peavad olema VHSi ja/või IHNi suhtes negatiivsed; või

b) mudel B – vähendatud valimiga kaheaastane järelevalveprogramm

Pärast ametlikku veterinaarkontrolli programmi, millega on dokumenteeritud VHSi ja/või IHNi puudumine vähemalt nelja aasta jooksul, kontrollitakse veterinaarselt kõiki heakskiitu taotleva piirkonna kasvandusi või iga heakskiitmata piirkonnas asuvat heakskiitu taotlevat kasvandust vähemalt kaks korda aastas kahe aasta jooksul. Nimetatud kaheaastase kontrollaja jooksul, mis eelneb heakskiidetud staatuse saamisele, ei tohi esineda VHSi ja/või IHNi kliinilisi või muid tundemärke ning proove tuleb uurimiseks koguda vastavalt tabelile 1B. Proovid tuleb valida, ette valmistada ja analüüsida vastavalt osadele I.I–I.IV ja laboriuuringute tulemused peavad olema VHSi ja/või IHNi suhtes negatiivsed. Selleks et ametlikud teenistused saaksid tunnustada VHSi ja/või IHNi puudumist tõendavaid veterinaarkontrolli programmi andmeid, peab programm vastama III osas sätestatud kriteeriumitele ja suunistele.

2. Uusi kasvandusi ja heakskiidetud võõndist või heakskiitmata võõndis asuvast heakskiidetud kasvandusest pärit kalade, marja või sugurakkude abil tegevust taasalustavaid kasvandusi käsitlevad erisätted

Uued kasvandused ja kasvandused, mis taasalustavad tegevust heakskiidetud võõndist või heakskiitmata võõndis asuvast heakskiidetud kasvandusest pärit kalade, marja või sugurakkude abil, võivad heakskiidetud staatuse saada direktiivi 91/67/EMÜ C lisa osa I.A.6 punktides a või b või osa II.A.3 punktides a või b sätestatud nõuete kohaselt. Seega ei kohaldata kõnealuste kasvandustes suhtes eespool sätestatud proovivõtu mudeleid A ja B (osa I.I.2.1 punktid a ja b).

3. Järelevalveprogramm VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse säilitamiseks

VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud võõndi või heakskiitmata võõndis asuva heakskiidetud kasvanduse staatuse säilitamiseks tuleb teostada kontrollid ja koguda uurimiseks proove vastavalt tabelile 1C. Proovid tuleb valida, ette valmistada ja analüüsida vastavalt osadele I.I–I.IV ja laboriuuringute tulemused peavad olema VHSi ja/või IHNi tekitajate suhtes negatiivsed.

3. *Kalaproovide valmistamine ja saatmine*

Enne laborisse saatmist või üleandmist eemaldatakse dissekteerimisriistade abil kaladelt uuritavad elundid ja asetatakse need sterilisesse plastist katsutitesse, mis sisaldavad transportsöödet, st rakukultuurisöödet 10 % vasikaseerumi ja antibiootikumidega. Soovitatakse segu 200 RÜ penitsilliinist, 200 µg streptomütsiinist ja 200 µg kanamütsiinist milliliitri kohta, kuid kasutada võib ka teisi tõestatud efektiivsusega antibiootikume. Uuritav koematerjal on põrn ja eesmine neer ning lisaks kas süda või peaju. Mõnedel juhtudel tuleb uurida ovariaalvedelikku (tabelid 1A–1C).

Ühte steriilsesse katsutisse, mis sisaldab vähemalt 4 ml transportsöödet, võib koguda maksimaalselt 10 kala ovariaalvedeliku või elunditükid (tabelid 1A–1C), mis moodustavad ühe liitproovi. Igas proovis oleva koe mass peaks olema vähemalt 0,5 g.

Katsutid tuleks asetada isoleeritud mahutitesse (nt paksu seinaga polüstüreenkastidesse) piisava koguse jää või jahutusplakkidega, et tagada proovide jahutus laborisse transportimise ajal. Vältida tuleb külmumist. Proovi temperatuur transpordi ajal ei tohi tõusta üle 10 °C ning saadetise vastuvõtmise ajal peab transpordikastis veel jääd olema või peab vähemalt üks jahutusplakk olema vähemalt osaliselt külmunud.

Viroloogilise uuringuga⁽¹⁾ tuleks alustada niipea kui võimalik, kuid mitte hiljem kui 48 tundi pärast proovide võtmist. Erandjuhul võib viroloogilist uuringut alustada hiljemalt 72 tundi pärast materjali kogumist, tingimusel et uuritav materjal on kaitstud transportsöötme ja transpordi ajal on täidetud temperatuurinõuded (osa I.I.3, kolmas lõik).

Laborisse võib saata terveid kalu, kui transpordi ajal on täidetud temperatuurinõuded. Terved kalad tuleb keerata imavasse paberisse ning neid tuleb vedada plastikkotis, mis on jahutatud kirjeldatud viisil. Saata võib ka eluskalu.

Saadetised tuleb pakkida ja märgistada vastavate kehtivate riiklike ja rahvusvaheliste transpordialaste õigusnormide kohaselt.

4. Täiendava diagnostilise materjali kogumine

Vastavalt kokkuleppele asjaomase diagnostikalaboriga võib täiendavateks uuringuteks koguda ja ette valmistada muid kalakudesid.

II. Proovide valmistamine viroloogiliseks uuringuks

1. Külmutamine erandjuhtudel

Kui tekivad praktilised raskused (nt halvad ilmastikutingimused, puhkepäevad, laboriprobleemid vms), mistõttu ei ole võimalik rakke nakatada 48 tunni jooksul pärast koeproovide kogumist, võib koeproovid külmutada rakukultuuri-söötmes temperatuurini –20 °C või alla selle ning teha viroloogilised uuringud 14 päeva jooksul. Kudet võib enne uuringut külmutada ja üles sulatada ainult ühe korra. Koeproovide külmutamise põhjused (nt torm, rakuliinide hukkumine jne) tuleb registreerida.

2. Elundite homogeneenimine

Laboris tuleb katsutites olev kude täielikult homogeneenida (stomahheri, segisti või uhmri ja nuiaga) ning seejärel suspendeerida algses transportsöötmes.

Kui proov koosneb tervetest kaladest, mis on alla 4 cm pikad, tükeldatakse need steriilsete kääride või skalpelliga pärast seda, kui pärakust tahapoole jääv keha osa on eemaldatud. Kui proov koosneb tervetest kaladest, mis on 4–6 cm pikad, tuleb koguda sisikond koos neerudega. Kui proov koosneb tervetest kaladest, mis on üle 6 cm pikad, tuleb koeproovid võtta nagu kirjeldatud osas I.I.3. Koeproovid tuleb tükeldada steriilsete kääride või skalpelliga, homogeneenida eespool kirjeldatud viisil ja suspendeerida transportsöötmes.

Koematerjali ja transportsöötme vahekord tuleb laboris reguleerida 1:10-le.

3. Homogenaadi tsentrifuugimine

Homogenaati tsentrifuugitakse jahutatud tsentrifuugis temperatuuril 2–5 °C 2 000–4 000 × g juures 15 minutit, supernatant kogutakse ja seda töödeldakse neli tundi 15 °C või üks öö 4 °C juures antibiootikumidega, selleks võib kasutada nt gentamütsiini 1 mg/ml.

Kui proovi transporditi transportsöötmes (st antibiootikumide juuresolekul), võib supernatandi antibiootikumidega töötlemise ära jätta.

Antibiootikumidega töötlemise eemärk on vältida proovide saastumist bakteritega ning selle tulemusena ei ole proove vaja filtreerida läbi membraanfiltrite.

Kui kogutud supernatant ladustatakse 48 tunni jooksul pärast proovivõtmist temperatuuril –80 °C, võib seda viroloogiliseks uuringuks uuesti kasutada ainult ühe korra.

⁽¹⁾ Erandjuhtumitel, nt kui kalu kogutakse kõrvalistes piirkondades, kus puudub võimalus iga päev posti saata.

Kui tekivad praktilised raskused (nt inkubaatoririke, probleemid rakukultuuridega vms), mistõttu ei ole võimalik rakke nakatada 48 tunni jooksul pärast koeproovide kogumist, võib supernatandi külmutada temperatuurini -80°C ning teha virooloogilised uuringud 14 päeva jooksul.

Enne rakkude nakatamist segatakse supernatant võrdse osa piirkonnale omaste IPN-viiruse serotüüpide antiseerumite sobivalt lahjendatud seguga ning inkubeeritakse vähemalt tund aega 15°C juures või maksimaalselt 18 tundi 4°C juures. Antiseerumi tiiter 50 % plaagi neutralisatsiooni katses peab olema vähemalt 1/2 000.

Kõikide inokulaatide IPN-viiruse antiseerumiga töötlemise eesmärk on vältida IPN-viirusest tuleneva tsütopaatilise efekti arengut nakatatud rakukultuuris (IPN-viirust esineb mõnes Euroopa osas 50 % kalaproovides). See vähendab virooloogiliste uuringute kestust ja nende juhtude arvu, mille puhul tsütopaatilise efekti ilmnemist saab pidada VHSi või IHNi viiruse võimalikuks tundemärgiks.

Kui proovid on pärit tootmisüksustest, mis on IPNist vabad, võib inokulaatide töötlemise IPN-viiruse antiseerumiga ära jätta.

III. Virooloogiline uuring

1. Rakukultuurid ja söötmed

BF-2 või RTG-2 ning EPC või FHM rakke kasvatatakse $20\text{--}30^{\circ}\text{C}$ juures sobivas söötmes, nt Eagle's MEMis (või selle variantides), millele on lisatud 10 % veiselooteseerumit ja standardkontsentratsiooniga antibiootikume.

Kui rakke kasvatatakse suletud pudelites, on soovitatav puhverdada sööde vesinikkarbonaadiga. Lahtistes üksustes rakkude kasvatamiseks kasutatavat söödet võib puhverdada Tris-HCl-ga (23 mM) ja naatriumvesinikkarbonaadiga (6 mM). pH peab olema $7,6 \pm 0,2$.

Koematerjaliga nakatamiseks kasutatavad rakukultuurid peaksid nakatamise ajal olema noored (4–48 tunni vanused) ja aktiivselt kasvama (mitte olema laatinud).

2. Rakukultuuride nakatamine

Antibiootikumitöötluste läbinud elundisuspensiooniga nakatatakse rakukultuure kahes lahjendusastmes, st esmane lahjendus ja selle täiendav lahjendus 1 : 10, millega saadakse koematerjali lahjendused rakukultuurisöötmes vastavalt 1 : 100 ja 1 : 1 000 (homoloogilise interferentsi vältimiseks). Nakatada tuleb vähemalt kahte rakuliini (vt osa I.III.1). Inokulaadi suuruse ja rakukultuurisöötme ruumala suhe peaks olema umbes 1:10.

Iga lahjenduse ja iga rakuliini kohta tuleb kasutada vähemalt 2 cm^2 suurust rakuala, mis vastab 24 auguga rakukultuuriplaadi ühele augule. Soovitatakse kasutada rakukultuuriplaate, kuid lubatud on kasutada ka muid sama suure või suurema kasvupinnaga aluseid.

3. Rakukultuuride inkubeerimine

Nakatatud rakukultuure inkubeeritakse 7–10 päeva 15°C juures. Kui rakukultuurisöötme värv muutub punasest kollaseks, mis näitab keskkonna hapestumist, tuleb pH-d reguleerida steriilse vesinikkarbonaadi lahusega või samaväärsete ainetega, et tagada rakkude vastuvõtlikkus viirusnakkusele.

Vähemalt iga kuue kuu järel või kui oletatakse rakkude vastuvõtlikkuse alanemist, tiitritakse VHS- ja IHN-viiruse külmutatud varusid, et kontrollida rakukultuuri vastuvõtlikkust nakkusele. Soovitav meetod on esitatud IV osas.

4. Mikroskoopia

Nakatatud rakukultuure tuleb korrapäraselt kontrollida (vähemalt kolm korda nädalas) tsütopaatilise efekti esinemise suhtes 40-150kordsel suurendusel. Kui ilmneb tsütopaatiline efekt, tuleb viivitamata alustada viiruse samastamist vastavalt osale I.IV.

5. Subkultuuride valmistamine

Kui 7–10päevase esmase inkubeerimise järel ei ole ilmnunud tsütopaatilist efekti, valmistatakse värsketest rakukultuuridest subkultuurid, kasutades sama suurt rakuala nagu tüvikultuuri puhul.

Kõikidest kultuuridest/aukudest, mis sisaldavad tüvikultuuri, valatakse söötme (supernatandi) alikvoodid rakuliini järgi kokku 7–10 päeva pärast nakatamist. Saadud liitproovidega nakatatakse homoloogilisi rakukultuure lahjendamata ning 1 : 10 lahjendatult (supernatandi lõpplahjendused vastavalt 1 : 10 ja 1 : 100), nagu kirjeldatud osas I.III.2. Teine võimalus on viia tüvikultuuri söötme 10 % alikvoodid otse värsket rakukultuuri sisaldavasse auku (subkultuuride valmistamine august auku). Enne nakatamist võib lahuseid eelnevalt inkubeerida sobivalt lahjendatud IPN-viiruse antiseerumiga, nagu kirjeldatud osas I.II.3.

Seejärel inkubeeritakse nakatatud kultuure 7–10 päeva 15 °C juures ning jälgitakse, nagu kirjeldatud osas I.III.4.

Kui toksiline tsütopaatiline efekt ilmneb inkubeerimise esimese kolme päeva jooksul, võib valmistada subkultuurid, kuid rakke tuleb sel juhul inkubeerida seitse päeva ning valmistada uued subkultuurid ja inkubeerida veel seitse päeva. Kui toksiline tsütopaatiline efekt ilmneb pärast kolme päeva möödumist, võib rakke ühe korra vahetada ja inkubeerida kokku 14 päeva alates esmasest nakatamisest. Inkubeerimise viimase seitsme päeva jooksul ei tohiks toksilisust ilmneda.

Kui proovid saastuvad bakteritega antibiootikumidega töötlemisele vaatamata, peab subkultuuride valmistamisele eelnema tsentrifuugimine $2\,000\text{--}4\,000 \times g$ juures 15–30 minutit temperatuuril 2–5 °C ja/või supernatandi filtreerimine läbi 0,45 µm filtri (proteiine vähesiduv membraan). Lisaks tuleb kasutada sama subkultuuride valmistamise meetodit kui toksilise tsütopaatilise efekti puhul.

IV. Viiruse identifitseerimine

1. Viiruse identifitseerimise testid

Kui rakukultuuris ilmneb tsütopaatiline efekt, kogutakse sööde (supernatant) kokku ja uuritakse seda ühe järgmise meetodi abil: neutralisatsioon, IF, ELISA. Kui ühe nädala jooksul ei ole katsetega suudetud viirust kindlalt identifitseerida, tuleb viirus üle viia riiklikku kalahaiguste tugilaborisse või ühenduse kalahaiguste tugilaborisse koheks identifitseerimiseks.

2. Neutralisatsioon

Rakud eraldatakse kogutud supernatandist tsentrifuugides ($2\,000\text{--}4\,000 \times g$) või filtreerides läbi proteiine vähesiduva membraani (0,45 µm) ning supernatant lahjendatakse rakukultuurisöötmes suhtes 1 : 100 ja 1 : 10 000.

Supernatandi kahe lahjenduse alikvoodid segatakse ja inkubeeritakse 60 minutit 15 °C juures eraldi võrdse osa järgmistest reagentidest:

- seerum, mis sisaldab rühmatspetsiifilisi VHS-viiruse antikehi lahjenduses 1 : 50 (vol : vol) ⁽¹⁾;
- seerum, mis sisaldab rühmatspetsiifilisi IHN-viiruse antikehi lahjenduses 1 : 50 (vol : vol) ⁽¹⁾;
- piirkonnale omaste IPN-viiruse serotüüpide antiseerumite segu lahjenduses 1 : 50 (vol : vol) ⁽¹⁾;
- ainult sööde (positiivne kontroll).

Iga viiruse supernatandi ja seerumi seguga nakatatakse vähemalt kaks rakukultuuri, kumbki 50 µl-ga, mida inkubeeritakse seejärel 15 °C juures. Kontrollitakse tsütopaatilise efekti ilmnemist, nagu kirjeldatud osas I.III.4.

Mõned VHS-viiruse tüved ei reageeri neutralisatsioonikatsetes. Selliseid isolaate määratakse IF või ELISA meetodil.

Alternatiivina võib kasutada teisi tõestatud tõhususega neutralisatsioonikatseid.

3. Immunofluorestsents (IF)

Iga identifitseeritava viirusisolaadi kohta külvatakse vähemalt kaheksale katteklasile või samaväärsele pinnale rakke sellise tihedusega, et pärast 24tunnist kasvatamist oleks laatumine 60–90 %. Selleks otstarbeks soovitatakse EPC rakkusid, sest need kinnituvad tugevalt klaaspindade külge, kuid kasutada võib ka teisi rakuliine, näiteks BF-2, RTG-2 või FHM.

Kui rakud on klaaspinnale ladestunud (umbes tund aega pärast külvamist) või kui kultuure on inkubeeritud kuni 24 tundi, nakatatakse kultuurid identifitseeritava viirusega. Nelja kultuuri nakatamisel on ruumalade suhe 1 : 10 ja nelja kultuuri nakatamisel 1 : 1 000. Seejärel inkubeeritakse neid 15 °C juures 20–30 tundi.

Pärast inkubeermist pestakse kultuure kaks korda Eagle's MEMiga ilma seerumita, kinnitatakse 80 % jääkülma atsetooniga ning seejärel värvitakse kahekihilise IFATi abil. Esimene reagendikiht koosneb võrdluskvaliteediga polü- või monoklonaalsetest antikehadest. Teine reagendikiht on esimeses kihis kasutatud immunoglobuliini fluorokroom-konjugeeritud antiseerum. Iga testitava antiseerumi jaoks tuleb värvida vähemalt üks kõrge ja üks madala doosiga nakatatud kultuur. Katses tuleb kasutada sobivat positiivset ja negatiivset kontrolli. Soovitavad fluorokroomid on FITC või TRITC.

Värvitud kultuurid prepareeritakse glütserooli-keedusoolalahuse abil. Proove uuritakse langevas ultravioletses (UV) valguses. Kasutatakse 10- või 12kordse suurendusega okulaare ja 25- või 40kordse suurendusega objektiiviläätsi apertuuri numbritest vastavalt $> 0,7$ ja $> 1,3$.

Eespool kirjeldatud IF-meetod on esitatud näitena. Alternatiivina (rakukultuuride, kinnitamise ja võrdluskvaliteediga antikehade osas) võib kasutada teisi tõestatud tõhususega IF-meetodeid.

⁽¹⁾ Või tugilabori täpsustuste kohaselt seoses antiseerumi võimaliku tsütotoksilisusega.

4. Ensüümne immunosorbentmeetod (ELISA)

Mikroitiiterplaatide augud kaetakse üheks ööks võrdlus kvaliteediga antikehade puhastatud immunoglobuliini fraktsioonidega, mis on soovitude kohaselt lahjendatud.

Pärast aukude pesemist PBS-Tween-20 puhvriga lisatakse aukudesse identifitseeritav viirus kahe- või neljakordses lahjenduses ning lastakse reageerida aukudesse kinnitunud antikehadega 60 minutit 37 °C juures. Pärast PBS-Tween-20 puhvriga pesemist lisatakse biotiiniga märgistatud antikehad, mille spetsiifilisus vastab aukudesse kinnitunud antikehade omale, ning lastakse reageerida 60 minutit 20 °C juures. Proovid pestakse uuesti nagu eespool kirjeldatud, lisatakse HRP-konjugeeritud streptavidiin ning lastakse reageerida tund aega 20 °C juures. Pärast veelkordset pesemist visualiseeritakse seotud ensüüm sobivate ELISA substraatide (OPD vms) abil.

Eespool kirjeldatud biotiinil-aridiinil põhinev ELISA versioon on esitatud näitena. Selle asemel võib kasutada teisi tõestatud tõhususega ELISA versioone.

TABEL 1A

Piirkondade ja heakskiitmata piirkondades asuvate kasvanduste kontrolli- ja proovivõtuplaan VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse saamisele eelneval kaheaastasel kontrollajal

(kooskõlas direktiivi 91/67/EMÜ A ja B lisadega ja käesoleva lisa I osa sätetega)

	Kliiniliste kontrollide arv aastas (kahel aastal)	Laboriuuringute arv aastas (kahel aastal)	Laboriuuringud viiruse olemasolule ⁽¹⁾	
			Kalade arv (elundiuringuteks)	Sugukalade arv (ovariaalvedeliku võtmiseks)
Sisemaa piirkonnad ja kasvandused				
a) täiesüsteemilised kala-kasvandused	2	2	[120 (1. kontroll) ⁽²⁾] [150 (2. kontroll)]	[30 (1. kontroll) ⁽³⁾] [0 (2. kontroll)]
b) kalahaudemajandid	2	1	0	150 (1. või 3. kontroll) ⁽³⁾
c) nuumakasvandused	2	2	150 (1. ja 2. kontroll)	0
Ranniku piirkonnad ja kasvandused				
a) täiesüsteemilised kala-kasvandused	2	2	[120 (1. kontroll)] [150 (2. kontroll)]	[30 (1. kontroll) ⁽³⁾] [0 (2. kontroll)]
b) lõhilaste nuumakasvandused	2	2	30 (1. ja 2. kontroll) ⁽⁴⁾	0
c) muude kalade nuumakasvandused	2	2	150 (1. ja 2. kontroll)	0

Kalade maksimaalne arv liitproovis: 10

⁽¹⁾ Alternatiivina võib kasutada tabelis IB osutatud vähendatud valimit, kui täidetakse osade II.1, II.2.1.b ja III tekstis kirjeldatud nõudmisi.

⁽²⁾ Kliiniline kontroll.

⁽³⁾ Erandlikel asjaoludel, kui ovariaalvedelikku ei ole võimalik saada, võib selle asemel võtta elundiproovid.

⁽⁴⁾ Proovid tuleb võtta mitte varem kui kolm nädalat pärast kalade üleviimist mageveest merevette.

TABEL 1B

Kontrolli- ja proovivõtuplaan VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse saamisele eelneval kaheaastasel kontrollajal piirkondades ja heakskiitmata piirkondades asuvates kasvandustes, kus ametlikult tunnustatud andmetel ei ole neid haigusi esinenud

(kooskõlas direktiivi 91/67/EMÜ B ja C lisadega ja käesoleva lisa I ja III osa sätetega)

	Kliiniliste kontrollide arv aastas (kahel aastal)	Laboriuuringute arv aastas (kahel aastal)	Laboriuuringud viiruse olemasolule	
			Kalade arv (elundiuringuteks)	Sugukalade arv (ovariaalvedeliku võtmiseks)
Sisemaa piirkonnad ja kasvandused				
a) täiesüsteemilised kala-kasvandused	2	2	0 (1. kontroll) ⁽¹⁾ 30 (2. kontroll)	30 (1. kontroll) ⁽²⁾ 0 (2. kontroll)
b) kalahaudemajandid	2	1	0	30 (1. või 2. kontroll) ⁽²⁾
c) nuumakasvandused	2	2	30 (1. ja 2. kontroll)	0
Ranniku piirkonnad ja kasvandused				
a) täiesüsteemilised kala-kasvandused	2	2	0 (1. kontroll) 30 (2. kontroll)	30 (1. kontroll) ⁽²⁾ 0 (2. kontroll)
b) lõhilaste nuumakasvandused	2	2	30 (1. ja 2. kontroll) ⁽³⁾	0
c) muude kalade nuumakasvandused	2	2	30 (1. ja 2. kontroll)	0

Kalade maksimaalne arv liitproovis: 10

⁽¹⁾ Kliiniline kontroll.

⁽²⁾ Erandlikel asjaoludel, kui ovariaalvedelikku ei ole võimalik saada, võib selle asemel võtta elundiproovid.

⁽³⁾ Proovid tuleb võtta mitte varem kui kolm nädalat pärast kalade üleviimist mageveest merevette.

TABEL 1C

Vööndite ja heakskiitmata piirkondades asuvate kasvanduste kontrolli- ja proovivõtuplaan VHSi ja/või IHNi suhtes heakskiidetud staatuse säilitamiseks

(kooskõlas direktiivi 91/67/EMÜ B ja C lisadega ja käesoleva lisa I osa sätetega)

	Kliiniliste kontrollide arv aastas	Kalade arv laboriuuringu jaoks võetavas valimis ⁽¹⁾	
		Kalade arv (elundiuringuteks)	Sugukalade arv (ovariaalvedeliku võtmiseks)
Sisemaa piirkonnad ja kasvandused			
a) täiesüsteemilised kalakasvandused	2	20 (1. või 2. kontroll)	10 (1. või 2. kontroll) ⁽²⁾

	Kliiniliste kontrollide arv aastas	Kalade arv laboriuuringu jaoks võetavas valimis ⁽¹⁾	
		Kalade arv (elundiuringuteks)	Sugukalade arv (ovariaalvedeliku võtmiseks)
b) kalahaudemajandid	2	0	30 (1. või 2. kontroll) ⁽²⁾
c) nuumakasvandused	2	30	0
Ranniku piirkonnad ja kasvandused			
a) täiesüsteemilised kalakasvandused	2	20 (1. või 2. kontroll)	10 (1. või 2. kontroll) ⁽²⁾
b) nuumakasvandused	1	30 ⁽³⁾	0

Kalade maksimaalne arv liitproovis: 10

⁽¹⁾ Heakskiidetud vööndis võetakse igal aastal proovid rotatsiooni korras üksnes 50 %lt kalakasvandustest. Heakskiitmata vööndis asuvates heakskiidetud kasvandustes võetakse proove igal aastal.

⁽²⁾ Erandlikel asjaoludel, kui ovariaalvedelikku ei ole võimalik saada, võib selle asemel võtta elundiproovid.

⁽³⁾ Proovid tuleb võtta mitte varem kui kolm nädalat pärast kalade üleviimist mageveest merevette.

II OSA

Diagnostikameetodid VHSi ja IHNi tõestamiseks haiguspuhangu kahtluse korral

VHSi ja IHNi diagnoosimiseks kasutatakse ühte või mitut järgmistest meetoditest:

- A. tavapärane viiruse isoleerimine ja sellele järgnev viiruse seroloogiline identifitseerimine,
- B. viiruse isoleerimine ja samaaegne viiruse seroloogiline identifitseerimine,
- C. muud diagnostikameetodid (IFAT, ELISA).

Esimese VHSi ja/või IHNi juhtumi kinnitus heakskiidetud vööndi kasvanduses ei tohi põhineda üksnes meetodil C. Lisaks tuleb kasutada kas meetodit A või B.

Viroloogilisteks uuringuteks mõeldud koematerjaliga peab mõnedel juhtudel olema kaasas täiendav materjal bakterioloogiliste, parasitoloogiliste, histoloogiliste vm uuringute jaoks eristusdiagnoosi eesmärgil.

A. Tavapärane viiruse isoleerimine ning sellele järgnev viiruse seroloogiline identifitseerimine

I.1. Proovide valimine

Uuringuteks tuleb valida vähemalt 10 IHN- või VHS-viiruse tüüpiliste tunnustega kala.

I.2. Kalaproovide valmistamine ja saatmine

Vastavalt osale I.I.3.

I.3. Täiendava diagnostilise materjali kogumine

Vastavalt osale I.I.4.

II. Proovide valmistamine viroloogiliseks uuringuks

Vastavalt osale I.II.

III. Viroloogiline uuring

Vastavalt osale I.III.

IV. Viiruse identifitseerimine

Vastavalt osale I.IV.

B. Viiruse isoleerimine ja samaaegne viiruse seroloogiline identifitseerimine

I.1. Proovide valimine

Vastavalt osale II.A.I.1.

I.2. Kalaproovide valmistamine ja saatmine

Vastavalt osale I.I.3.

I.3. Täiendava diagnostilise materjali kogumine

Vastavalt osale I.I.4.

II.1. Elundite homogeneenimine

Vastavalt osale I.II.2.

II.2. Homogenaadi tsentrifuugimine

Homogenaati tsentrifuugitakse jahutatud tsentrifuugis temperatuuril 2–5 °C 2 000–4 000 × g juures 15 minutit, supernatant kogutakse ja töödeldakse seda neli tundi 15 °C juures antibiootikumidega, nt gentamüsiin 1 mg/ml, või membraanfiltrereeritakse läbi proteiine vähesiduva membraani (0,45 µm).

II.3. Supernatandi töötlemine diagnostilise antiseerumiga

Antibiootikumidega töödeldud või membraanfiltrereeritud elundisuspensioon lahjendatakse rakukultuurisöötmes 1 : 10 ja 1 : 1 000, alikvoodid segatakse võrdse osas I.IV.2 loetletud reagentidega ja inkubeeritakse 60 minutit 15 °C juures.

III.1. Rakukultuurid ja söötmed

Vastavalt osale I.III.1.

III.2. Rakukultuuride nakatamine

Iga punkti II.B.II.3 kohaselt valmistatud viiruse-seerumi seguga nakatatakse iga rakuliini kohta vähemalt kaks rakukultuuri, kumbki 50 µl-ga.

III.3. Rakukultuuride inkubeerimine

Vastavalt osale I.III.1.

III.4. Mikroskoopia

Nakatatud rakukultuure uuritakse tsütopaatilise efekti avastamiseks iga päev 40–150kordse suurendusega. Kui üks antiseerum hoiab ära tsütopaatilise efekti tekke, võib viiruse vastavalt identifitseerida.

Kui kõikide antiseerumite kasutamise puhul tekib tsütopaatiline efekt, tuleb viirus identifitseerida vastavalt osale I.IV.

III.5. Subkultuuride valmistamine

Kui 7–10 päeva möödudes ei ole tsütopaatilist efekti tekkinud, tuleb supernatandi ja söötme seguga (II.B.II.3) nakatatud kultuuridest valmistada subkultuurid vastavalt osale I.III.5.

C. Muud diagnostikameetodid

Osa I.II.2 kohaselt valmistatud supernatandile tehakse IFAT või ELISA vastavalt osale I.IV.3 või I.IV.4. Lisaks kõnealustele kiirmeetoditele tuleb 48 tunni jooksul pärast proovide võtmist teha viroloogiline uuring punkti A või B kohaselt, juhul kui:

- saadakse negatiivne tulemus või
- saadakse positiivne tulemus materjalist, mille puhul on tegu IHNi või VHSi esimese juhuga heakskiidetud võõndis.

Koematerjali puhul võib kasutada teisi diagnostikameetodeid, nagu näiteks RT-PCR, külmutatud osade IF või formaliiniga kinnitatud koematerjali immunohistokeemiline analüüs. Kõnealuste meetodite puhul tuleb rakukultuurid alati nakatada kinnitamata koematerjaliga.

III OSA

VHSi ja/või IHNi puudumise dokumenteerimine piirkondades või heakskiitmata piirkondade heakskiidetud kasvandustes

Ametliku veterinaarkontrolli programmi suunised ja kriteeriumid

- Veterinaarkontrolli programmi saab algatada ainult kas:
 - pärast ametlikult tunnustatud VHS- ja/või IHN-viiruse tõrje programmi, mis hõlmab kõikide kalade kõrvaldamist kasvandusest ja selle puhastamist, desinfitseerimist ja kasutamata hoidmist enne taasasustamist heakskiidetud kasvandusest pärit kaladega, või
 - kalakasvandustes, kus VHSi ega IHNi nakkust ei ole esinenud.
- Veterinaarkontrolli programm peab põhinema kliinilistel kontrollidel ja laboriuuringutel.
- Programm peab sisaldama kahte iga-aastast kliinilist veterinaarkontrolli I osas esitatud suuniste kohaselt.

4. Vähemalt ühe iga-aastase kontrolli käigus tuleb igas kasvanduses võtta 30 kalakoe ja/või ovariaalvedeliku proovi. Proovid tuleb valida, ette valmistada ja laboratoorselt analüüsida vastavalt I, II ja IV osale.
5. Veterinaarkontrolli programm kestab kõikides heakskiitu taotleva piirkonna kasvandustes või (heakskiitmata piirkonna) heakskiitu taotlevas kasvanduses vähemalt 4 aastat.
6. Programmi ametlikuks tunnustamiseks ei tohi esineda ühtegi VHSi või IHNi juhtumit (st ei avastata nakkuse kliinilisi tunnuseid ega isoleerita viirust).

IV OSA

Tiitrimismeetod rakukultuuride nakkusele vastuvõtlikkuse kontrollimiseks

Osas I.III.3 osutatud soovitatav tiitrimismeetod on järgmine.

Kasutada tuleks vähemalt kahte VHS-viiruse isolaati ja ühte IHN-viiruse isolaati. Isolaadid peaksid esindama peamisi EÜs levinud viiruste rühmi, st VHS-viiruse puhul vikerforelli magevees levivat patogeeni ja hariliku kammelja meres levivat patogeeni ning IHN-viiruse puhul vikerforelli Euroopas levivat patogeeni tüve. Kasutama peaks liikmesriikides täpselt määratud isolaate. Võrdlusisolaate saab EÜ kalahaiguste tugilaborist.

Väikese edasikülviarvuga viirusepartiisid paljundatakse rakukultuuripudelites, VHS-viirust BF-2 või RTG-2 rakkudel ja IHN-viirust EPC või FHM rakkudel. Kasutada tuleks vähemalt 10 % seerumisisaldusega rakukultuurisöödet. Nakatamisel kasutada madalat infektsioonkordajat (MOI < 1).

Pärast täieliku tsütopaatilise efekti ilmnemist tsentrifuugitakse viiruse kogumiseks rakukultuuri supernatanti 2 000 × g juures 15 minutit, steriliseeritakse filtreerides läbi 0,45 µm membraanfiltrit ja jaotatakse etiketitud krüokatsutitesse. Viirust säilitatakse –80 °C juures.

Üks nädal pärast külmutamist sulatatakse külma vee all kolm iga viiruse korduspudelit ja tiitritakse vastavatel rakuliinidel. Vähemalt iga kuue kuu järel või kui oletatakse, et rakuliini vastuvõtlikkus on vähenenud, sulatatakse ja tiitritakse iga viirusisolaat.

Tiitrimismeetod tuleb üksikasjalikult kirjeldada ja kasutada iga kord sama meetodit.

Lõpplahjenduseni tiitrimisel peab iga lahjendusastme tegema vähemalt kuues korduses. Tiitreid võrreldakse varem saadud tiitritega. Kui kolmest viirusisolaadist ükskõik missuguse tiiter langeb algtiitriga võrreldes 2 log korda või rohkem, ei tohi seda rakuliini enam kontrollimiseks kasutada.

Kui laboris säilitatakse erinevaid rakuliine, tuleb iga liini uurida eraldi.

Andmeid tuleb säilitada vähemalt 10 aastat.

V OSA

Akronüümid ja lühendid

BF-2	<i>Bluegill fry</i> –2 (rakuliin)
CPE	tsütopaatiline efekt
CRL	ühenduse kalahaiguste tugilabor
ELISA	ensüümne immunosorbenttest
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (rakuliin)
FHM	<i>Fathead minnow</i> (rakuliin)
FITC	fluorestseiniisotiotsüanaat
Hepes	N-(2-hüdroksüetüül)piperasiin-N'-2-etaansulfoonhape
HRP	määrõika peroksüdaas
IF	immunofluorestsents
IFAT	immunofluorestsentskatse viiruse antikehade määramiseks
IHN(V)	nakkuslik vereloomenekroos (viirus)
IPN	nakkuslik pankreasenekroos (viirus)
MEM	miinimumpõhisööde

MOI	infektsioonkordaja (suhtarv, mis näitab koekultuurirakkude nakatamisel iga raku kohta võetavate viirusosakeste arvu)
OPD	o-fenüleendiamiin
PBS	fosfaatpuhvri lisandiga keedusoolalahus
RTG-2	<i>Rainbow trout gonad</i> (rakuliin)
RT-PCR	pöördtranskriptaas-polümeraasahelreaktsioon
Tris-HCl	tris(hüdroksümetüül)aminoetaan-HCl
TRITC	tetrametüülrodamiinisotitsüanaat
VHS(V)	viiruslik hemorraagiline septitseemia (viirus)
