

32001D0183

9.3.2001.

SLUŽBENI LIST EUROPSKIH ZAJEDNICA

L 67/65

ODLUKA KOMISIJE**od 22. veljače 2001.****o utvrđivanju planova uzorkovanja i dijagnostičkih metoda za otkrivanje i potvrđivanje određenih bolesti riba i stavljanju izvan snage Odluke 92/532/EEZ***(priopćena pod brojem dokumenta C(2001) 426)***(Tekst značajan za EGP)****(2001/183/EZ)**

KOMISIJA EUROPSKIH ZAJEDNICA,

uzimajući u obzir Ugovor o osnivanju Europske zajednice,

uzimajući u obzir Direktivu Vijeća 91/67/EEZ od 28. siječnja 1991. o uvjetima zdravlja životinja kojima se uređuje stavljanje na tržište životinja akvakulture i njihovih proizvoda ⁽¹⁾, kako je zadnje izmijenjena Direktivom 98/45/EZ ⁽²⁾, a posebno njezin članak 15.,

budući da:

- (1) Odlukom Komisije 92/532/EEZ ⁽³⁾, kako je izmijenjena Odlukom Komisije 96/240/EZ ⁽⁴⁾, utvrđeni su planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje određenih bolesti riba.
- (2) Od vremena donošenja Odluke 92/532/EEZ došlo je do novih praktičnih i znanstvenih spoznaja te do izmjene Direktive 91/67/EEZ. Zbog toga je potrebno ažurirati planove uzorkovanja i dijagnostičke metode.
- (3) To se ažuriranje odnosi na ispitivanje i identifikaciju virusa koji uzrokuju virusnu hemoragijsku septikemiju (VHS) i zaraznu hematopoetsku nekrozu (ZHN) te na promjene u skladu sa zadnjim izmjenama Direktive 91/67/EEZ.
- (4) Obavljeno je savjetovanje s referentnim laboratorijem Zajednice za bolesti riba, koji je osnovan Direktivom Vijeća 93/53/EEZ ⁽⁵⁾.

(5) Radi jasnoće treba staviti izvan snage planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje određenih bolesti riba, koji su uvedeni Odlukom 92/532/EEZ.

(6) Mjere predviđene ovom Odlukom u skladu su s mišljenjem Stalnog veterinarskog odbora,

DONIJELA JE OVU ODLUKU:

Članak 1.

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za otkrivanje i potvrđivanje prisutnosti virusne hemoragijske septikemije (VHS) i zarazne hematopoetske nekroze (ZHN) utvrđeni su u Prilogu.

Članak 2.

Ovom se Odlukom stavlja izvan snage Odluka 92/532/EEZ.

Članak 3.

Ova je Odluka upućena državama članicama.

Sastavljeno u Bruxellesu 22. veljače 2001.

Za Komisiju

David BYRNE

Član Komisije

⁽¹⁾ SL L 46, 19.2.1991., str. 1.

⁽²⁾ SL L 189, 3.7.1998., str. 12.

⁽³⁾ SL L 337, 21.11.1992., str. 18.

⁽⁴⁾ SL L 79, 29.3.1996., str. 19.

⁽⁵⁾ SL L 175, 19.7.1993., str. 23.

PRILOG

PLANOWI UZORKOVANJA I DIJAGNOSTIČKE METODE ZA OTKRIVANJE I POTVRĐIVANJE VIRUSNE HEMORAGIJSKE SEPTIKEMIJE (VHS) I ZARAZNE HEMATOPOETSKE NEKROZE (ZHN)

UVOD

Ovaj Prilog:

- (a) propisuje smjernice i minimalne zahtjeve u vezi s planovima uzorkovanja i dijagnostičkim metodama za otkrivanje i potvrđivanje prisutnosti virusne hemoragijske septicemije (VHS) i zarazne hematopoetske nekroze (ZHN);
- (b) uključuje odredbe Priloga B i C Direktivi 91/67/EEZ za odobravanje i održavanje statusa zona i uzgajališta u neodobrenim zonama;
- (c) određuje odredbe čiji je cilj pravilna dijagnoza VHS-a i ZHN-a te službeno priznavanje statusa zona i uzgajališta u neodobrenim zonama u skladu s člancima 5. i 6. Direktive 91/67/EEZ;
- (d) namijenjen je tijelima koja su nadležna za nadzor VHS-a i ZHN-a te laboratorijskom osoblju koje provodi testiranja vezana uz te bolesti. U skladu s tim, naglasak je stavljen na postupke uzorkovanja, načela te primjenu laboratorijskih testova i procjena njihovih rezultata kao i na detaljne laboratorijske tehnike. Prema potrebi, laboratoriji mogu unijeti izmjene u testove opisane u ovom Prilogu ili koristiti drukčije testove, pod uvjetom da se može dokazati jednaka osjetljivost i specifičnost.

Dio I. uključuje planove uzorkovanja i dijagnostičke metode za nadziranje VHS-a i ZHN-a kako bi se postigao i zadržao status odobrene zone ili status odobrenog uzgajališta u neodobrenoj zoni.

U dijelu II. opisuju se dijagnostički postupci za potvrđivanje VHS-a i ZHN-a u slučaju sumnje.

U dijelu III. utvrđuju se kriteriji i smjernice za provedbu programa službenih zdravstvenih pregleda kojim se potvrđuje odsutnost VHS-a i/ili ZHN-a u prošlosti.

U dijelu IV. daju se preporuke za postupak titracije virusa VHS-a i ZHN-a kako bi se provjerila osjetljivost staničnih kultura na infekciju.

Akronimi i kratice navedeni su u dijelu V.

DIO I.

Planovi uzorkovanja i dijagnostičke metode za nadzor VHS-a i ZHN-a radi postizanja i zadržavanja statusa odobrene zone ili uzgajališta u neodobrenoj zoni**I. Pregledi i uzorkovanje**

1. *Opće odredbe o kliničkim zdravstvenim pregledima, sakupljanju i odabiru uzoraka za nadziranje zona ili uzgajališta u neodobrenim zonama radi postizanja ili zadržavanja statusa odobrene zone ili uzgajališta s obzirom na VHS i/ili ZHN*

U tablicama 1A, 1B i 1C daje se sažeti prikaz kliničkih zdravstvenih pregleda i uzorkovanja tkiva riba i/ili ovarijalne tekućine koji moraju biti provedeni u zonama ili uzgajalištima u neodobrenim zonama kako bi se postigao ili zadržao status odobrene zone ili uzgajališta s obzirom na VHS i ZHN u skladu s Prilozima B i C Direktivi 91/67/EEZ. Daljnji podaci navedeni su u dijelovima I.I.2. do I.I.4. Tablice 1A i 1B ne primjenjuju se na nova uzgajališta i uzgajališta koja ponovo započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni, pod uvjetom da udovoljavaju zahtjevima koji su utvrđeni Direktivom 91/67/EEZ, Prilogom C, dijelom I.A.6(a) ili I.A.6(b) ili II.A.3(a) ili II.A.3(b).

Klinički pregledi moraju biti provedeni u razdoblju od listopada do lipnja ili kad je temperatura vode niža od 14 °C. U onim uzgajalištima u kojima se klinički pregledi trebaju provesti dva puta godišnje, vremenski razmak između pregleda mora iznositi najmanje četiri mjeseca. Sve se proizvodne jedinice (ribnjaci, bazeni, kavezi itd.) moraju pregledati kako bi se utvrdila prisutnost uginulih ili oslabljenih riba ili riba s neuobičajenim ponašanjem. Posebnu pozornost treba obratiti na područje ispusta vode gdje se zbog vodene struje obično sakupljaju slabe ribe.

Ribe za uzorkovanje biraju se na sljedeći način:

- ako su prisutne kalifornijske pastrve, samo ribe te vrste biraju se za uzorkovanje. Ako kalifornijska pastrva nije prisutna, uzorak se mora sastojati od riba svih drugih prisutnih vrsta prijemljivih na VHS i/ili ZHN (kao što je navedeno u Prilogu A Direktivi 91/67/EEZ). Navedene vrste moraju biti razmjerno zastupljene u uzorku,
- ako se za proizvodnju riba koristi više izvora vode, uzorak se mora sastojati od riba iz svih izvora vode,
- ako su prisutne oslabljene ribe, ribe s neuobičajenim ponašanjem ili svježe uginule ribe (koje još nisu u stanju raspadanja), primarno je potrebno odabrati takve ribe. Ako takve ribe nisu dostupne, odabrane ribe moraju uključivati zdrave ribe normalnog izgleda koje treba sakupiti tako da u uzorku budu razmjerno zastupljeni svi dijelovi uzgajališta kao i sve dobne kategorije.

2. Posebne odredbe, uključujući sakupljanje uzoraka, za nadziranje zona ili uzgajališta u neodobrenim zonama u svrhu postizanja ili zadržavanja odobrenog statusa s obzirom na VHS i/ili ZHN

1. Zona ili uzgajalište u neodobrenoj zoni koje je pod nadzorom nadležnih službi, može dobiti status odobrene zone odnosno uzgajališta s obzirom na VHS i/ili ZHN prema jednom od sljedećih modela:

(a) Model A – dvogodišnji program nadziranja

Nakon najmanje dvogodišnje odsutnosti bilo kojeg kliničkog ili drugog znaka VHS-a i/ili ZHN-a, sva uzgajališta u zoni ili bilo koje uzgajalište u neodobrenoj zoni, koji će biti odobreni, moraju tijekom dvije godine biti podvrgnuti kliničkom pregledu dva puta godišnje. U tom dvogodišnjem kontrolnom razdoblju koje prethodi postizanju odobrenog statusa odsutnost kliničkih ili drugih znakova VHS-a i/ili ZHN-a mora biti stalna i moraju se prikupljati uzorci za ispitivanje u skladu s tablicom 1.A. Nadalje, uzorci se moraju odabrati, pripremati i ispitivati kako je opisano u dijelu I.I. do I.IV., a laboratorijska ispitivanja moraju dati negativne rezultate s obzirom na VHS i/ili ZHN; ili

(b) Model B – dvogodišnji program nadziranja sa smanjenom veličinom uzorka

Nakon provedenog programa službenih zdravstvenih pregleda kojim je dokumentirano odsustvo VHS-a i/ili ZHN-a tijekom najmanje četiri prethodne godine, sva uzgajališta u zoni ili bilo koje uzgajalište u neodobrenoj zoni, koji će biti odobreni, moraju tijekom dvije godine biti zdravstveno pregledani dva puta godišnje. Tijekom dvogodišnjeg kontrolnog razdoblja koje prethodi postizanju odobrenog statusa, odsutnost kliničkih ili drugih znakova VHS-a i/ili ZHN-a mora biti stalna i moraju se prikupljati uzorci za ispitivanje u skladu s tablicom 1.B. Nadalje, uzorci se moraju odabrati, pripremati i ispitivati kako je opisano u dijelu I.I. do I.IV., a laboratorijska ispitivanja moraju dati negativne rezultate s obzirom na VHS i/ili ZHN. Da bi nadležne službe mogle prihvatiti program zdravstvenih kontrola kojim se dokumentira odsutnost VHS-a i/ili ZHN-a, program mora ispunjavati kriterije i smjernice iz dijela III.

2. Posebne odredbe za odobrenje novih uzgajališta i uzgajališta koja ponovo započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili iz odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni

Nova uzgajališta i uzgajališta koja ponovo započinju svoju djelatnost s ribama, ikrom ili gametama iz odobrene zone ili iz odobrenog uzgajališta smještenog u neodobrenoj zoni mogu steći status u skladu s uvjetima utvrđenim Direktivom 91/67/EEZ, Prilogom C dijelom I.A.6.a/b ili dijelom II.A.3.a/b. U skladu s navedenim, na ta se uzgajališta ne primjenjuju odredbe o uzorkovanju koje su propisane u gore navedenom modelu A i B (dijelovi I.I.2.1.a i I.I.2.1.b).

3. Program nadziranja za održavanje odobrenog statusa s obzirom na VHS i/ili ZHN

Da bi zona ili uzgajalište u neodobrenoj zoni zadržali odobreni status s obzirom na VHS i/ili ZHN, pregledi i uzimanje uzoraka za ispitivanje moraju se provoditi u skladu s tablicom 1C. Uzorci se moraju odabrati, pripremati i ispitivati kako je opisano u dijelovima I.I. do I.IV., a laboratorijska ispitivanja moraju dati negativne rezultate s obzirom na uzročnike VHS-a i/ili ZHN-a.

3. Pripremanje i slanje uzoraka ribe

Prije slanja ili prijevoza u laboratorij, dijelovi organa koji će se ispitivati moraju biti uklonjeni iz ribe pomoću sterilnog sekcionog pribora te preneseni u sterilne plastične epruvete koje sadrže transportni medij tj. medij za staničnu kulturu s 10 % telećeg seruma i antibioticima. Preporuča se kombinacija od 200 IJ penicilina, 200 µg streptomycina i 200 µg kanamicina po mililitru (ml), ali se mogu koristiti i drugi antibiotici dokazane djelotvornosti. Tkiva za pretragu su slezena, prednji bubreg i, dodatno, ili srce ili encefalon. U nekim slučajevima mora biti ispitana ovarijalna tekućina (tablice 1A do C).

Ovarijalna tekućina ili dijelovi organa od najviše 10 riba (tablice 1A do C) mogu se prikupiti u jednu sterilnu epruvetu koja sadrži najmanje 4 ml transportnog medija i koja predstavlja jedan skupni uzorak. Tkivo u svakom uzorku treba težiti najmanje 0,5 grama (g).

Epruvete treba smjestiti u izolirane posude (npr. polistirenske kutije debelih stijenki) zajedno s dovoljnom količinom leda ili ulošcima za frižider koji će osigurati hlađenje uzoraka tijekom prijevoza do laboratorija. Treba izbjeći zamrzavanje. Temperatura uzorka tijekom prijevoza ne smije biti iznad 10 °C, a pri njegovom prijemu led mora još uvijek biti prisutan u transportnoj kutiji odnosno jedan ili više uložaka za frižider moraju još uvijek biti djelomično ili u cijelosti zamrznuti.

Virološka pretraga mora započeti što je moguće prije, a najkasnije 48 sati nakon prikupljanja uzoraka. U iznimnim ⁽¹⁾ slučajevima virološke pretrage mogu započeti najkasnije unutar 72 sata od prikupljanja materijala, pod uvjetom da je materijal za pretragu zaštićen transportnim medijem i da se mogu ispuniti zahtjevi u odnosu na temperaturu tijekom prijevoza (dio I.I.3. stavak 3.).

U laboratorij se mogu poslati cijele ribe pod uvjetom da se mogu ispuniti zahtjevi u odnosu na temperaturu tijekom prijevoza. Cijele ribe mogu biti umotane u upijajući papir i potom poslane u plastičnim vrećicama ohlađenim kako je gore navedeno. Mogu biti poslane i žive ribe.

Pakiranje i označivanje mora biti provedeno u skladu s odgovarajućim važećim nacionalnim i međunarodnim propisima o prijevozu.

4. Prikupljanje dodatnog dijagnostičkog materijala

U dogovoru s uključenim dijagnostičkim laboratorijem mogu se prikupiti i pripremiti za dodatna ispitivanja i druga tkiva riba.

II. Pripremanje uzoraka za virološke pretrage

1. Zamrzavanje u iznimnim slučajevima

Kada je zbog praktičnih poteškoća (npr. loši vremenski uvjeti, neradni dani, problemi u laboratoriju itd.) nemoguće nasaditi stanice u roku od 48 sati nakon prikupljanja uzoraka tkiva, uzorci tkiva se mogu zamrznuti u mediju za staničnu kulturu pri temperaturi od – 20 °C ili nižoj, a virološke pretrage obaviti u roku od 14 dana. Tkivo se može zamrznuti i odmrznuti samo jednom prije ispitivanja. Mora se voditi evidencija sa svim podacima o razlozima za svako zamrzavanje uzoraka tkiva (kao što je oluja, odumiranje staničnih linija itd.).

2. Homogenizacija organa

U laboratoriju se tkivo iz epruveta mora potpuno homogenizirati (u homogenizatoru Stomacher, miješalici ili tarioniku i tučku sa sterilnim pijeskom) i potom suspendirati u izvornom transportnom mediju.

Ako se uzorak sastoji od cijelih riba kraćih od 4 cm, one se moraju usitniti sterilnim škarama ili skalpelom nakon što se ukloni stražnji dio tijela iza crijevnog otvora. Ako uzorak čine cijele ribe dužine tijela od 4 do 6 cm, uzima se utroba uključujući bubrege. Ako uzorak čine cijele ribe dulje od 6 cm, uzimaju se uzorci tkiva kako je opisano u dijelu I.I.3. Uzroke tkiva treba usitniti sterilnim škarama ili skalpelom, homogenizirati kako je gore opisano i suspendirati u transportnom mediju.

Konačni omjer tkiva i transportnog medija mora se u laboratoriju postaviti u omjer 1:10.

3. Centrifugiranje homogenata

Homogenat se centrifugira na brzini 2 000 do 4 000 × g u trajanju 15 minuta u centrifugi ohlađenoj pri 2 do 5 °C te se supernatant prikuplja i obrađuje antibioticima četiri sata na 15 °C ili preko noći na 4 °C; u ovoj fazi može biti koristan gentamicin 1 mg/ml.

Ako je uzorak poslan u transportnom mediju (tj. izložen antibioticima), može se izostaviti obrada supernatanta antibioticima.

Svrha obrade antibioticima je suzbijanje bakterijske kontaminacije uzorka, tako da nije potrebna filtracija kroz membranske filtre.

Ako se prikupljeni supernatant pohrani na – 80 °C unutar 48 sati nakon prikupljanja, može se još samo jednom ponovo upotrijebiti za virološke pretrage.

⁽¹⁾ U iznimnim slučajevima, npr. ako se ribe uzorkuju u veoma udaljenim područjima i ne mogu se svakodnevno slati.

Ako je zbog praktičnih poteškoća (npr. kvar inkubatora, problemi sa staničnim kulturama itd.) nemoguće inokulirati stanice unutar 48 sati od prikupljanja uzoraka tkiva, supernatant se može zamrznuti na temperaturi od -80°C , a virološke pretrage obaviti unutar 14 dana.

Prije inokulacije stanica, supernatant se pomiješa s jednakim dijelovima odgovarajuće razrijeđenih skupina antiseruma za lokalne serotipove virusa ZNG te se s njima inkubira najmanje jedan sat na 15°C ili najviše 18 sati na 4°C . Titar antiseruma mora biti najmanje 1/2 000 s neutralizacijom plaka od 50 % u testu neutralizacije.

Svrha tretiranja svih inokuluma antiserumom za virus ZNG (virus koji se u nekim dijelovima Europe javlja u 50 % uzoraka ribe) je spriječiti da se u inokuliranim staničnim kulturama razvije citopatogeni učinak (CPU) zbog virusa ZNG. To će skratiti trajanje viroloških pretraga i smanjiti broj slučajeva u kojima bi se pojava CPU-a morala smatrati potencijalnim znakom prisustva virusa VHS-a ili ZHN-a.

Ako uzorci potječu iz proizvodnih jedinica koje se smatraju slobodnim od ZNG-a, može se izostaviti tretiranje inokuluma antiserumom za virus ZNG.

III. Virološke pretrage

1. Stanične kulture i mediji

Stanice BF-2 ili RTG-2 te EPC ili FHM umnožavaju se na temperaturi od 20 do 30°C u odgovarajućem mediju, npr. Eaglovom MEM-u (ili njegovim modifikacijama), obogaćenom s 10 % fetalnoga goveđeg seruma i antibioticima u standardnim koncentracijama.

Ako se stanice umnožavaju u zatvorenim posudama, preporučuje se puferiranje medija bikarbonatom. Medij koji se koristi za kulturu stanica u otvorenim jedinicama može se puferirati Tris-HCL-om (23 mM) i Na-bikarbonatom (6 mM). Ph mora biti $7,6 \pm 0,2$.

Stanične kulture koje će se koristiti za inokuliranje s tkivnim materijalom trebaju biti mlade (stare 4 do 48 sati) i pri inokuliranju moraju aktivno rasti (bez zgrušavanja).

2. Inokulacija staničnih kultura

Suspenzija organa tretirana antibioticima inokulira se u stanične kulture u dva razrjeđenja, tj. osnovnom razrjeđenju i, pored toga, njegovom razrjeđenju 1:10, što dovodi do konačnih razrjeđenja tkivnog materijala u staničnoj kulturi 1:100 odnosno 1:1 000 (kako bi se spriječila homologna interferencija). Moraju se inokulirati najmanje dvije stanične linije (vidjeti dio I. III.1.). Omjer veličine inokuluma i količine stanične kulture treba biti 1:10.

Za svako razrjeđenje i svaku staničnu liniju mora se upotrijebiti najmanje oko 2 cm^2 površine stanica, što odgovara jednoj jažici na 24-jažičnoj plitici za staničnu kulturu. Preporučuje se korištenje plitica za staničnu kulturu, ali su prihvatljive i druge jedinice sa sličnim ili većim površinama za rast.

3. Inkubacija staničnih kultura

Inokulirane stanične kulture inkubiraju se 7 do 10 dana pri 15°C . Ako se boja medija za staničnu kulturu promijeni s crvene u žutu, što ukazuje na zakiseljenje medija, mora se prilagoditi pH pomoću sterilne otopine bikarbonata ili istovrijednim tvarima kako bi se osigurala osjetljivost stanica na virusnu infekciju.

Najmanje svakih šest mjeseci ili ako se sumnja na smanjenu osjetljivost stanica, obavlja se titracija zamrznutih pohranjenih virusa VHS-a i ZHN-a kako bi se verificirala osjetljivost staničnih kultura na infekciju. Preporučeni postupak opisan je u dijelu IV.

4. Mikroskopiranje

Inokulirane stanične kulture moraju se redovito pregledavati (najmanje tri puta tjedno), pri povećanju od 40 do 150 puta, kako bi se provjerilo je li došlo do pojave citopatogenog učinka (CPU). Ako se opazi očiti citopatogeni učinak (CPU), odmah treba početi s postupkom identifikacije virusa u skladu s dijelom I.IV.

5. Supkultiviranje

Ako se nakon primarne inkubacije od 7 do 10 dana ne razvije citopatogeni učinak (CPU), provodi se supkultiviranje sa svježim staničnim kulturama korištenjem površine slične površini primarne kulture.

Alikvoti hranjive podloge (supernatant) svih kultura/jažica, koje čine primarnu kulturu, puliraju se prema staničnoj liniji 7 do 10 dana nakon inokulacije. Tako dobiveni skupni uzorci inokuliraju se u homologne stanične kulture, nerazrijeđene i razrijeđene 1:10 (pri čemu se dobiju konačna razrijeđena supernatanta u omjeru 1:10 odnosno 1:100), kako je opisano u dijelu I.III.2. Druga je mogućnost da se alikvoti 10 % hranjive podloge koja čini primarnu kulturu inokuliraju izravno u jažicu sa svježom staničnom kulturom (supkultiviranje iz jažice u jažicu). Inokulaciji može prethoditi predinkubacija razrjeđenja s antiserumom za virus IPN u odgovarajućem razrjeđenju kako je opisano u dijelu I.II.3.

Inokulirane kulture se potom inkubiraju 7 do 10 dana pri 15 °C i promatraju kako je opisano u dijelu I.III.4.

Ako se tijekom prva tri dana inkubacije javi toksični CPU, u toj se fazi može se obaviti supkultiviranje, ali se stanice potom moraju inkubirati sedam dana i ponovo supkultivirati uz dodatnih sedam dana inkubacije. Ako se toksični CPU razvije nakon tri dana, stanice se mogu jednom staviti u pasažu i inkubirati dok ne prođe ukupno 14 dana od prve inokulacije. U zadnjih sedam dana inkubacije ne smiju se javiti znaci toksičnosti.

Ako unatoč obradi antibioticima dođe do bakterijske kontaminacije, prije supkultivacije treba provesti centrifugiranje na 2 000 do 4 000 × g kroz 15 do 30 minuta pri 2 do 5 °C i/ili filtriranje supernatanta kroz filter od 0,45 µm (membrana s niskom sposobnošću vezivanja proteina). Pored toga, postupak supkultivacije isti je kao i za toksični CPU.

IV. Identifikacija virusa

1. Testovi za identifikaciju virusa

Ako se u staničnoj kulturi uoči postojanje CPU-a, medij (supernatant) se sakupi i pretraži korištenjem jedne ili više sljedećih metoda: neutralizacija, IF, ELISA. Ako se ovim testovima ne može sa sigurnošću identificirati virus u roku od jednog tjedna, supernatant se mora proslijediti u nacionalni referentni laboratorij ili u referentni laboratorij Europske unije za bolesti riba kako bi se virus odmah identificirao.

2. Neutralizacija

Iz sakupljenog supernatanta uklonite stanice centrifugiranjem (2 000 do 4 000 × g) ili membranskim filtriranjem kroz filter s membranom (0,45 µm) s niskom apsorpcijom proteina te razrijedite supernatant 1:100 i 1:10 000 u mediju za staničnu kulturu.

Alikvoti dvaju razrjeđenja supernatanta se pomiješaju i odvojeno inkubiraju 60 minuta na 15 °C s jednakim dijelovima sljedećih reagensa:

- serum koji sadrži skupinu specifičnih protutijela za virus VHS u razrjeđenju 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾,
- serum koji sadrži skupinu specifičnih protutijela za virus ZHN u razrjeđenju 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾,
- skupni uzorak antiseruma za lokalne serotipove virusa ZGN u razrjeđenju 1:50 (vol:vol) ⁽¹⁾,
- sam medij (pozitivna kontrola).

Za svaku mješavinu supernatanta i seruma inokuliraju se najmanje dvije stanične kulture svaka s 50 µl te se inkubiraju pri 15 °C. Razvoj citopatogenog učinka (CPU) provjerava se kako je opisano u dijelu I.III.4.

Neki sojevi virusa VHS ne reagiraju u neutralizacijskom testu. Takvi se izolati moraju identificirati metodom IF ili ELISA.

Mogu se primijeniti i drugi neutralizacijski testovi dokazane djelotvornosti.

3. IF

Za svaki izolat virusa koji treba identificirati, najmanje osam pokrovnih stakalaca ili njihovih ekvivalenata treba nasaditi stanicama u gustoći tako da se postigne približno 60 do 90 %-tna konfluencija 24 sata nakon nasađivanja. U tu se svrhu preporučuju stanice EPC jer one snažno prijanjaju za staklenu površinu, ali se mogu koristiti i druge stanične linije kao što su BF-2, RTG-2 ili FHM.

Nakon što se stanice natalože na staklenu površinu (otprilike jedan sat nakon nasađivanja) ili nakon inkubiranja kultura u razdoblju do 24 sata, inokulira se virus koji treba identificirati. Četiri kulture se inokuliraju u volumnom omjeru 1:10, a četiri kulture u omjeru 1:1 000. One se potom inkubiraju 20 do 30 sati pri 15 °C.

Nakon inkubacije, kulture se dva puta ispiru u Eagleovom MEM-u bez seruma, fiksiraju u 80 %-tnom ledenom hladnom acetonu i potom boje dvoslojnim IFAT-om. Prvi sloj reagensa sastoji se od poliklonalnih ili monoklonalnih protutijela referentne kvalitete. Drugi sloj reagensa je fluorokromom konjugirani antiserum za imunoglobulin korišten u prvom sloju. Za svaki pretraživani antiserum mora se obojiti najmanje jedna kultura inokulirana visokom dozom i jedna kultura inokulirana niskom dozom. U test se moraju uključiti i odgovarajuće negativne i pozitivne kontrole. Preporučuju se fluorokromi kao što su FITC i TRITC.

Na obojene kulture nanosite fiziološku otopinu s dodatkom glicerola. Pregledajte ih pod ulaznim ultralubičastim svjetlom. Koristite okulare s povećanjem od 10 ili 12 puta te objektivne s povećanjem od 25 ili 40 puta, s numeričkim otvorima > 0,7 odnosno > 1,3.

Gore opisani postupak imunofluorescencije (IF) naveden je kao primjer. Umjesto njega mogu se koristiti i drugi postupci imunofluorescencije (s obzirom na stanične kulture, fiksiranje i protutijela referentne kvalitete) dokazane učinkovitosti.

⁽¹⁾ Ili kako odredi referentni laboratorij s obzirom na moguću citotoksičnost antiseruma.

4. ELISA

Jažice na mikrotitratskoj pločici oblože se preko noći preporučenim razrjeđenjima pročišćenih frakcija imunoglobulina protutijela referentne kvalitete.

Nakon ispiranja jažica puferom PBS-Tween-20, u njih se dodaje virus koji treba identificirati, i to u serijama dvostrukog ili četverostrukog razrjeđenja, te se ostavi da reagira s adsorbiranim protutijelom 60 minuta pri 37 °C. Nakon ispiranja puferom PBS-Tween-20, dodaju se biotinom obilježena protutijela čija specifičnost odgovara specifičnosti adsorbiranih protutijela te se ostave da reagiraju 60 minuta pri 20 °C. Nakon još jednog ispiranja kao što je gore opisano, dodaje se streptavidin konjugiran s peroksidazom hrena (HRP) te se ostavi da reagira jedan sat pri 20 °C. Nakon zadnjeg ispiranja, vezani enzim se vizualizira uporabom odgovarajućih supstrata ELISA (OPD ili drugi).

Gore opisana verzija metode ELISA, koja se temelji na primjeni biotina i avidina, navedena je samo kao primjer. Umjesto nje mogu se koristiti i druge verzije metode ELISA dokazane učinkovitosti.

TABLICA 1.A

Shema pregleda i uzorkovanja za zone i za uzgajališta u neodobrenim zonama za dvogodišnje kontrolno razdoblje prije dobivanja odobrenog statusa s obzirom na VHS i/ili ZHN

(u skladu s prilogima B i C Direktivi 91/67/EEZ i odredbama dijela I. ovog Priloga)

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj laboratorijskih pretraga na godinu (dvije godine)	Laboratorijsko pretraživanje na prisutnost virusa ⁽¹⁾	
			Broj riba iz uzgoja (materijal organa)	Broj matičnih riba (ovarijalna tekućina)
Kontinentalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	120 (prvi pregled) ⁽²⁾ 150 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ⁽³⁾ 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta samo s matičnim ribama	2	1	0	150 (prvi ili drugi pregled) ⁽³⁾
(c) Uzgajališta bez matičnih riba	2	2	150 (prvi i drugi pregled)	0
Obalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	120 (prvi pregled) 150 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ⁽³⁾ 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta salmonida bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled) ⁽⁴⁾	0
(c) Uzgajališta drugih vrsta osim salmonida i bez matičnih riba	2	2	150 (prvi i drugi pregled)	0

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 10

⁽¹⁾ Može se koristiti i manja veličina uzorka kao što je navedeno u tablici 1B ako su ispunjeni uvjeti navedeni u dijelu II.1., I.I.2.1.b. i III.

⁽²⁾ Klinički pregledi.

⁽³⁾ U iznimnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tekućinu, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

⁽⁴⁾ Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri tjedna od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

TABLICA 1.B

Shema pregleda i uzorkovanja za dvogodišnje kontrolno razdoblje prije dobivanja odobrenog statusa s obzirom na VHS i/ili ZHN za zone i uzgajališta u neodobrenim zonama za koje je službeno dokumentirano odsustvo ovih bolesti u prošlosti

(u skladu s prilogima B i C Direktivi 91/67/EEZ i odredbama dijela I. i III. ovog Priloga)

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj laboratorijskih pretraga na godinu (dvije godine)	Laboratorijsko pretraživanje na prisutnost virusa	
			Broj riba iz uzgoja (materijal organa)	Broj matičnih riba (ovarijalna tekućina)
Kontinentalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	0 (prvi pregled) ⁽¹⁾ 30 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ⁽²⁾ 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta samo s matičnim ribama	2	1	0	30 (prvi ili drugi pregled) ⁽²⁾
(c) Uzgajališta bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled)	0
Obalne zone i uzgajališta				
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	2	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) ⁽²⁾ 0 (drugi pregled)
(b) Uzgajališta salmonida bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled) ⁽³⁾	0
(c) Uzgajališta drugih vrsta osim salmonida i bez matičnih riba	2	2	30 (prvi i drugi pregled)	0

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 10

⁽¹⁾ Klinički pregledi.

⁽²⁾ U iznimnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tekućinu, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

⁽³⁾ Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri tjedna od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

TABLICA 1.C

Shema pregleda i uzorkovanja za zone i uzgajališta u neodobrenim zonama sa svrhom održavanja odobrenog statusa s obzirom na VHS i/ili ZHN

(u skladu s prilogima B i C Direktivi 91/67/EEZ i odredbama dijela I. ovog Priloga)

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj riba u uzorku za laboratorijsko pretraživanje ⁽¹⁾	
		Broj riba iz uzgoja (materijal organa)	Broj matičnih riba (ovarijalna tekućina)
Kontinentalne zone i uzgajališta			
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	20 (prvi ili drugi pregled)	10 (prvi ili drugi pregled) ⁽²⁾

	Broj kliničkih pregleda na godinu (dvije godine)	Broj riba u uzorku za laboratorijsko pretraživanje ⁽¹⁾	
		Broj riba iz uzgoja (materijal organa)	Broj matičnih riba (ovarijalna tekućina)
(b) Uzgajališta samo s matičnim ribama	2	0	30 (prvi ili drugi pregled) ⁽²⁾
(c) Uzgajališta bez matičnih riba	2	30	0
Obalne zone i uzgajališta			
(a) Uzgajališta s matičnim ribama	2	20 (prvi ili drugi pregled)	10 (prvi ili drugi pregled) ⁽²⁾
(b) Uzgajališta bez matičnih riba	1	30 ⁽³⁾	0

Najveći broj riba u skupnom uzorku: 10

⁽¹⁾ U odobrenim zonama uzorke treba uzimati naizmjence samo u 50 % uzgajališta godišnje. U odobrenim uzgajalištima smještenim u neodobrenim zonama uzorci se uzimaju svake godine.

⁽²⁾ U iznimnim okolnostima, ako nije moguće dobiti ovarijalnu tekućinu, umjesto nje se mogu uzorkovati organi.

⁽³⁾ Uzorak se ne smije uzeti prije nego proteknu tri tjedna od prijenosa ribe iz slatke u slanu vodu.

DIO II.

Dijagnostički postupci za potvrđivanje VHS-a i ZHN-a u slučaju sumnje na pojavu bolesti

Za dijagnosticiranje VHS-a i ZHN-a primjenjuje se jedna ili više sljedećih metoda:

- A. Uobičajeno izdvajanje virusa nakon kojeg slijedi serološka identifikacija virusa
- B. Izdvajanje virusa uz istodobnu serološku identifikaciju virusa
- C. Ostale dijagnostičke metode (IFAT, ELISA)

Potvrđivanje prvog slučaja VHS-a i/ili ZHN-a u uzgajalištima smještenim u odobrenim zonama ne smije se temeljiti isključivo na metodi C. Treba primijeniti i metodu A ili B.

U nekim se slučajevima, uz tkivni materijal za virološko pretraživanje mora priložiti i dodatni materijal za bakteriološko, parazitološko, histološko i drugo pretraživanje u svrhu diferencijalnog dijagnosticiranja.

A. Uobičajeno izdvajanje virusa nakon kojeg slijedi serološka identifikacija virusa

I.1. Odabir uzoraka

Za pretraživanje treba uzeti najmanje 10 riba koje pokazuju tipične znakove ZHN-a ili VHS-a.

I.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba

Kako je utvrđeno u dijelu I.I.3.

I.3. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kako je utvrđeno u dijelu I.I.4.

II. Pripremanje uzoraka za virološke pretrage

Kako je utvrđeno u dijelu I.II.

III. Virološke pretrage

Kako je utvrđeno u dijelu I.III.

IV. Identifikacija virusa

Kako je utvrđeno u dijelu I.IV.

B. Izdvajanje virusa uz istodobnu serološku identifikaciju virusa

I.1. Odabir uzoraka

Kako je utvrđeno u dijelu II.A.I.1.

I.2. Pripremanje i slanje uzoraka riba

Kako je utvrđeno u dijelu I.I.3.

I.3. Uzimanje dodatnog dijagnostičkog materijala

Kako je utvrđeno u dijelu I.I.4.

II.1. Homogenizacija organa

Kako je utvrđeno u dijelu I.II.2.

II.2. Centrifugiranje homogenata

Homogenat se centrifugira na $2\,000$ do $4\,000 \times g$ 15 minuta u centrifugi ohlađenoj pri 2 do $5\,^{\circ}\text{C}$ te se supernatant odlije i tretira antibioticima, npr. gentamicinom 1 mg/ml , četiri sata na $15\,^{\circ}\text{C}$ ili se filtrira kroz membranu ($0,45\text{ }\mu\text{m}$) s niskom sposobnošću vezanja proteina.

II.3. Obrada supernatanta dijagnostičkim antiserumom

Suspenzija organa obrađena antibioticima ili filtrirana kroz membranski filter razrjeđuje se u omjeru $1:10$ i $1:1\,000$ u mediju za staničnu kulturu te se alikvoti pomiješaju i inkubiraju 60 minuta na $15\,^{\circ}\text{C}$ s jednakim dijelovima reagensa navedenih u dijelu I.IV.2.

III.1. Stanične kulture i mediji

Kako je utvrđeno u dijelu I.III.1.

III.2. Inokulacija staničnih kultura

Iz svake mješavine virusa i seruma (pripremljene kako je propisano u dijelu II.B.II.3.) inokuliraju se najmanje dvije stanične kulture po staničnoj liniji, svaka s $50\text{ }\mu\text{l}$.

III.3. Inkubacija staničnih kultura

Kako je utvrđeno u dijelu I.III.1.

III.4. Mikroskopiranje

Inokulirane stanične kulture svakodnevno se pregledavaju, uz povećanje od 40 do 150 puta, kako bi se provjerilo je li došlo do pojave citopatogenog učinka (CPU). Ako jedan od korištenih antiseruma spriječi nastanak citopatogenog učinka (CPU), može se smatrati da je virus identificiran.

Ako jedan od korištenih antiseruma spriječi nastanak citopatogenog učinka (CPU), mora se izvršiti identifikacija virusa sukladno dijelu I.IV.

III.5. Supkultiviranje

Ako se nakon 7 do 10 dana ne pojavi citopatogenog učinka (CPE), mora se provesti supkultiviranje s kulturama inokuliranim sa supernatantom i medijem (dio II.B.II.3.) u skladu s dijelom I.III.5.

C. Druge dijagnostičke metode

Supernatant pripremljen kako je opisano u dijelu I.II.2. može se pregledati metodom IFAT ili ELISA u skladu s dijelom I.IV.3. odnosno dijelom I.IV.4. Ove se brze metode trebaju dopuniti virološkim pretraživanjem u skladu s točkama A ili B u roku od 48 sati od uzorkovanja ako:

- (a) se dobije negativan rezultat; ili
- (b) se dobije pozitivan rezultat iz materijala koji predstavlja prvi slučaj ZHN-a ili VHS-a u odobrenoj zoni.

Materijal tkiva se može podvrgnuti drugim dijagnostičkim metodama, kao što su RT-PCR, IF na zamrznutim rezovima, imunohistokemija na formalinom fiksiranom materijalu tkiva. Navedeni se postupci moraju uvijek dopuniti inokulacijom nefiksiranog materijala tkiva na staničnim kulturama.

DIO III.

Dokumentirana odsutnost VHS-a i/ili ZHN-a u zonama ili u uzgajalištima smještenim u neodobrenim zonama

Smjernice i kriteriji za program službenih zdravstvenih pregleda

1. Program zdravstvenih pregleda može se započeti provoditi jedino:
 - nakon što se provede službeno priznati programa iskorjenjivanja virusa VHS-a i/ili ZHN-a, u okviru kojega se uklonila sva riba iz uzgajališta, provelo čišćenje, dezinfekcija i odmor objekta prije ponovnog naseljavanja ribom podrijetlom iz odobrenih uzgajališta, ili
 - u uzgajalištima u kojima u prošlosti nisu utvrđene infekcije virusima VHS-a ili ZHN-a.
2. Program zdravstvenih pregleda mora se temeljiti i na kliničkim pregledima i na laboratorijskim pretragama.
3. Program mora uključivati dva godišnja zdravstvena pregleda u skladu sa smjernicama koje su navedene u dijelu I.

4. Pri najmanje jednom od pregleda koji se obavljaju svake godine, na svakom se uzgajalištu mora uzeti 30 uzoraka tkiva riba i/ili ovarijalne tekućine. Uzroci se biraju, pripremaju i laboratorijski pretražuju u skladu s dijelom I., II. i IV.
5. Program zdravstvenih pregleda provodi se najmanje četiri godine na svim uzgajalištima u zoni odnosno na uzgajalištu (smještenom u neodobrenoj zoni) koje treba biti odobreno.
6. U svrhu službenog priznavanja programa, ne smije se pojaviti ni utvrditi niti jedan slučaj VHS-a ili ZHN-a (bilo klinička infekcija bilo izolacija virusa).

DIO IV.

Postupak titracije za provjeru osjetljivosti staničnih kultura na infekciju

U daljnjem se tekstu navode preporučeni postupci titracije navedeni u dijelu I.III.3.

Treba koristiti najmanje dva izolata virusa VHS-a i jedan izolat virusa ZHN-a. Izolati trebaju predstavljati glavnu skupinu virusa unutar EU, npr. za VHS treba odabrati jedan patogeni izolat koji potječe od kalifornijske pastrve iz slatke vode i jedan izolat koji je patogen za romba iz morske vode, a za ZHN-a treba odabrati jedan europski soj koji je patogen za kalifornijsku pastrvu. Treba koristiti dobro definirane izolate podrijetlom iz država članica. Referentni izolati mogu se dobiti od referentnog laboratorija EU za bolesti riba.

Serije virusa staničnim kulturama niske pasaže umnažaju se u bocama sa staničnom kulturom na stanicama BF-2 ili RTG-2 za virus VHS-a i na stanicama EPC ili FHM za virus ZHN-a. Treba koristiti medij za staničnu kulturu s najmanje 10 % seruma. Za inokulaciju treba koristiti niski MOI (< 1).

Kod punog citopatogenog učinka (CPU), virus se sakuplja centrifugiranjem supernatanta stanične kulture na $2\,000 \times g$ 15 minuta, sterilizira se filtriranjem kroz membranski filter od $0,45\ \mu m$ te raspodijeli u označene krioeprovete. Virus se drži na $-80\ ^\circ C$.

Tjedan dana nakon zamrzavanja, pod mlazom hladne vode otope se po tri epruvete svakog virusa te se titriraju na odgovarajućim staničnim linijama. Svaki izolat virusa se odmrzava i titrira najmanje svakih šest mjeseci ili ako se sumnja da je osjetljivost stanične linije smanjena.

Postupci titracije moraju se detaljno opisati i svaki se put mora primijeniti isti postupak.

Titracija sa razrjeđenjem do završne točke treba uključivati najmanje šest ponavljanja u svakoj fazi razrjeđenja. Titri se uspoređuju s prethodno dobivenim titrima. Ako titar bilo kojeg od tri izolata virusa padne za faktor od 2 log ili više u odnosu na početni titar, stanična se linija ne bi trebala više koristiti u svrhe nadzora.

Ako se u laboratoriju drže različite stanične linije, svaku bi liniju trebalo ispitivati odvojeno.

Evidencija se čuva najmanje 10 godina.

DIO V.

Akronimi i kratice

BF-2	Mlađ ribe <i>Lepomis macrochirus</i> (stanična linija)
CPU	Citopatogeni učinak
RLZ	Referentni laboratorij Zajednice za bolesti riba
ELISA	Imunoenzimski test (Enzyme-linked immunosorbent assay)
EPC	<i>Epithelioma papulosum cyprini</i> (stanična linija)
FHM	<i>Pimephales promelas</i> (stanična linija)
FITC	Fluorescein izotiocijanat
Hepes	N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etan sulfonska kiselina
HRP	Peroksidaza hrena
IF	Imunofluorescencija
IFAT	Metoda indirektna fluorescencije za dokazivanje protutijela
ZHN (V)	Zarazna hematopoetska nekroza (virus)
ZNG (V)	Zarazna nekroza gušterače (virus)
MEM	Minimalni esencijalni medij

MOI	Višestrukost infekcije (omjer između broja dodanih čestica infektivnog virusa i poznatog broja stanica u kulturi)
OPD	Orto-fenilendiamin
PBS	Fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom
RTG-2	Gonade kalifornijske pastrve (stanična linija)
RT-PCR	Lančana reakcija polimerazom uz reverznu transkripciju
Tris-HCl	Tris-(hidroksimetil)-aminometan – HCl
TRITC	Tetrametil-rodamin-izotiocijanat
VHS (V)	Virusna hemoragijska septikemija
