

32001D0183

9.3.2001

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 67/65

ROZHODNUTIE KOMISIE

z 22. februára 2001,

ktoré ustanovuje plány odberu vzoriek a diagnostické metódy na zisťovanie a potvrdzovanie určitých nákaz rýb a ktorým sa ruší rozhodnutie 92/532/EHS

(oznámené pod dokumentačným číslom C (2001) 426)

(Text s platnosťou pre EHP)

(2001/183/ES)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 91/67/EHS z 28. januára 1991 týkajúcu sa zdravotných podmienok zvierat dodávaných na trh ako zvieratá vodného hospodárstva a produkty z nich ⁽¹⁾ v znení smernice 98/45/ES ⁽²⁾ a najmä na jej článok 15,

keďže:

- (1) Plány odberu vzoriek a diagnostické metódy na zisťovanie a potvrdzovanie určitých nákaz rýb boli ustanovené v rozhodnutí Komisie 92/532/EHS ⁽³⁾ v znení rozhodnutia Komisie 96/240/ES ⁽⁴⁾.
- (2) Od prijatia rozhodnutia 92/532/EHS došlo k novému praktickému a vedeckému vývoju a smernica 91/67/EHS bola zmenená. To vyžaduje aktualizáciu plánov odberu vzoriek a diagnostických metód.
- (3) Táto aktualizácia sa týka vyšetovania a identifikácie vírusov spôsobujúcich vírusovú hemoragickú septikémiu (VHS) a infekčnú hematopoietickú nekrózu (IHN), ako aj zmien vyplývajúcich zo zmien smernice 91/67/EHS.
- (4) Prebehla konzultácia s referenčným laboratóriom spoločenstva pre nákazy rýb, ktoré bolo zriadené smernicou Rady 93/53/EHS ⁽⁵⁾.
- (5) Plány odberu vzoriek a diagnostické metódy na zisťovanie a potvrdzovanie určitých nákaz rýb, ktoré boli ustanovené v rozhodnutí 92/532/EHS, musia byť zrušené pre zabezpečenie jasnosti.

- (6) Opatrenia ustanovené v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho veterinárneho výboru,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

Plány odberu vzoriek a diagnostické metódy na zisťovanie a potvrdzovanie vírusovej hemoragickej septikémie (VHS) a infekčnej hematopoietickej nekrózy (IHN), sú ustanovené v prílohe.

Článok 2

Týmto rozhodnutím sa ruší rozhodnutie 92/532/EHS.

Článok 3

Toto rozhodnutie je adresované členským štátom.

V Bruseli 22. februára 2001

Za Komisiu
David BYRNE
člen Komisie

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 46, 19.2.1991, s. 1.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 189, 3.7.1998, s. 12.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 337, 21.11.1992, s. 18.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 79, 29.3.1996, s. 19.

⁽⁵⁾ Ú. v. ES L 175, 19.7.1993, s. 23.

PRÍLOHA

PLÁNY ODBERU VZORIEK A DIAGNOSTICKÉ METÓDY NA ZISŤOVANIE A POTVRDZOVANIE VÍRUSOVEJ HEMORAGICKEJ SEPTIKÉMIE (VHS) A INFEKČNEJ HEMATOPOIETICKEJ NEKRÓZY (IHN)

ÚVOD

Táto príloha:

- a) ustanovuje smernice a minimálne požiadavky pre plány odberu vzoriek a diagnostické metódy na zisťovanie a potvrdzovanie prítomnosti vírusovej hemoragickej septikémie (VHS) a infekčnej hematopoietickej nekrózy (IHN);
- b) zahŕňa ustanovenia príloh B a C smernice 91/67/EHS pre schvaľovanie a zachovanie štatútu zón a fariem v neschválených oblastiach;
- c) obsahuje ustanovenia zamerané na riadne diagnostikovanie VHS a IHN a na úradné uznanie štatútu zón a fariem v neschválených oblastiach v súlade s článkami 5 a 6 smernice 91/67/EHS;
- d) je adresovaná orgánom zodpovedným za kontrolu VHS a IHN a laboratórnym pracovníkom, ktorí vykonávajú testy v súvislosti s týmito nákazami. V uvedenom zmysle sa dôraz kladie na postupy odberu vzoriek, zásady a aplikácie laboratórnych testov a hodnotenie ich výsledkov, ako aj na podrobné laboratórne metódy. Tam, kde je to primerané, však laboratória môžu uplatniť zmeny testov popísané v tejto prílohe alebo použiť iné testy, ak možno preukázať ich rovnakú citlivosť a špecifickosť.

Časť I obsahuje plány odberu vzoriek a diagnostické metódy pre sledovanie VHS a IHN s cieľom získať a zachovať si schválený štatút zóny alebo farmy v neschválenej oblasti.

V časti II sú popísané diagnostické postupy pre potvrdzovanie VHS a IHN v prípade podozrenia.

V časti III sú uvedené kritériá a smernice pre program úradnej zdravotnej kontroly, ktorý dokumentuje historický prehľad o neprítomnosti VHS a/alebo IHN.

Časť IV obsahuje doporučený postup titrácie vírusu VHS a IHN na overenie citlivosti bunkových kultúr na infekciu.

Akronymy a skratky sú uvedené v časti V.

ČASŤ I

Plány odberu vzoriek a diagnostické metódy pre sledovanie VHS a IHN s cieľom získať a zachovať si schválený štatút zóny alebo farmy v neschválenej oblasti**I. Kontroly a odber vzoriek**

1. *Všeobecné ustanovenia o klinických zdravotných kontrolách, zbere a výbere vzoriek pre sledovanie zón alebo fariem v neschválených oblastiach s cieľom získať a zachovať si schválený štatút pre VHS a/alebo IHN*

Klinické zdravotné kontroly a odber vzoriek rybieho tkaniva a/alebo vaječnickej tekutiny, vykonávaný v zónach alebo na farmách v neschválených oblastiach s cieľom získať a zachovať si schválený štatút pre VHS a/alebo IHN v súlade s prílohami B a C smernice 91/67/EHS, sú zhrnuté v tabuľkách 1A, 1B a 1C. Ďalšie podrobnosti sú uvedené v častiach I.I.2 až I.I.4. Tabuľky 1A a 1B sa nevzťahujú na nové farmy a farmy, ktoré obnovujú svoju činnosť súvisiacu s rybami, vajčkami alebo gamétami zo schválenej zóny alebo schválenej farmy v neschválenej oblasti, ak spĺňajú požiadavky ustanovené v smernici 91/67/EHS, príloha C, časť I.A.6a) alebo I.A.6b) alebo II.A.3a) alebo II.A.3b).

Klinické kontroly musia byť vykonané v období od októbra do júna alebo vždy, keď je teplota vody nižšia ako 14 °C. Ak sú farmy klinicky kontrolované dvakrát ročne, intervaly medzi kontrolami musia byť aspoň štyri mesiace. Všetky výrobné jednotky (rybníky, nádrže, sieťové kletky atď.) musia byť kontrolované na prítomnosť uhynutých, slabých alebo abnormálne sa správajúcich rýb. Osobitná pozornosť musí byť venovaná oblasti odtoku vody, kde sa zhromažďujú slabé ryby kvôli prúdeniu vody.

Ryby ako vzorky musia byť vybrané nasledovným spôsobom.

- Ak sú prítomné pstruhy dúhové, na odber vzoriek môžu byť vybrané len tieto druhy rýb. Ak pstruhy dúhové nie sú prítomné, vzorku možno odobrať z iných prítomných druhov rýb vždy, keď sú tieto druhy citlivé na VHSV a/alebo IHNV (ako je uvedené v prílohe A smernice 91/67/EHS). Tieto druhy musia byť pomerne zastúpené vo vzorke.
- Ak sa na chov rýb využíva viac ako jeden vodný zdroj, do odberu vzoriek musia byť zahrnuté ryby zo všetkých vodných zdrojov.
- Ak sú prítomné slabé, abnormálne sa správajúce alebo čerstvo uhynuté (nerozložené) ryby, treba predovšetkým vybrať tieto ryby. Ak takéto ryby nie sú prítomné, vybrané ryby musia zahŕňať zdravé ryby s bežným vzhľadom odobraté tak, aby boli vo vzorke pomerne zastúpené všetky časti farmy ako aj všetky ročníky.

2. *Osobitné ustanovenia, vrátane odberu vzoriek, pre sledovanie zón alebo fariem v neschválených oblastiach s cieľom získať a zachovať si schválený štatút pre VHS a/alebo IHN*

1. Zóna alebo farma v neschválenej oblasti, ktorá je pod úradným dohľadom, môže získať schválený štatút pre VHS a/alebo IHN, pričom sa na ňu vzťahuje:

a) Vzor A – dvojročný program dozoru

Aspoň po dvoch rokoch neprítomnosti akéhokoľvek klinického alebo iného príznaku VHS a/alebo IHN musí byť na všetkých farmách v zóne alebo na akejkoľvek farme v neschválenej oblasti, ktorá má byť schválená, dva roky vykonávaná zdravotná kontrola, a to dvakrát ročne. Počas tohto dvojročného kontrolného obdobia, ktoré predchádza získaniu schváleného štatútu, musí pokračovať neprítomnosť klinických alebo iných príznakov VHS a/alebo IHN, pričom vzorky sa musia odberať na vyšetrenie v súlade s tabuľkou 1A. Okrem toho musia byť vzorky vybrané, pripravené a vyšetrované tak, ako je popísané v častiach I.I. až I.IV a laboratórne vyšetrenia musia priniesť negatívne výsledky na VHS a/alebo IHN; alebo

b) Vzor B – dvojročný program dozoru s redukovanou veľkosťou vzorky

Po programe úradnej zdravotnej kontroly, ktorý dokumentuje historický prehľad o neprítomnosti VHS a/alebo IHN aspoň štyri roky, musí byť na všetkých farmách v zóne alebo na akejkoľvek farme v neschválenej oblasti, ktorá má byť schválená, dva roky vykonávaná zdravotná kontrola, a to dvakrát ročne. Počas tohto dvojročného kontrolného obdobia, ktoré predchádza získaniu schváleného štatútu, musí pokračovať neprítomnosť klinických alebo iných príznakov VHS a/alebo IHN, pričom vzorky sa musia odberať na vyšetrenie v súlade s tabuľkou 1B. Okrem toho musia byť vzorky vybrané, pripravené a vyšetrované tak, ako je popísané v častiach I.I. až I.IV a laboratórne vyšetrenia musia priniesť negatívne výsledky na VHS a/alebo IHN. Pre uznanie programu zdravotnej kontroly pod úradným dohľadom pre zdokumentovanie neprítomnosti VHS a/alebo IHN musia byť splnené kritériá a smernice uvedené v časti III.

2. *Osobitné ustanovenia pre schvaľovanie nových fariem a fariem, ktoré obnovujú svoju činnosť súvisiacu s rybami, vajičkami alebo gamétami zo schválenej zóny alebo schválenej farmy v neschválenej zóne.*

Nové farmy a farmy, ktoré obnovujú svoju činnosť súvisiacu s rybami, vajičkami alebo gamétami zo schválenej zóny alebo schválenej farmy v neschválenej zóne, môžu získať štatút v súlade s požiadavkami ustanovenými v smernici 91/67/EHS, príloha C, I.A.6a/b alebo II.A.3.a/b. V uvedenom zmysle sa na tieto farmy nevzťahujú ustanovenia o odbere vzoriek, uvedené vo vzoroch A a B (časti I.I.2.1.a a I.I.2.1.b).

3. Program dozoru na zachovanie schváleného štatútu v súvislosti s VHS a/alebo IHN

Pre zachovanie schváleného štatútu zóny alebo farmy v neschválenej oblasti pre VHS a/alebo IHN musia byť kontroly a odber vzoriek na vyšetrenie vykonané v súlade s tabuľkou 1C. Vzorky musia byť vybrané, pripravené a vyšetrované tak, ako je popísané v častiach I.I. až I.IV a laboratórne vyšetrenia musia byť negatívne na pôvodcov VHS a/alebo IHN

3. *Príprava a zasielanie vzoriek rýb*

Pred zaslaním alebo prepravou do laboratória musia byť z rýb sterilnými pitevnými nástrojmi odstránené časti orgánov, ktoré majú byť vyšetrené a vložené do sterilných plastických skúmaviek, ktoré obsahujú transportné médium, t. j. médium bunkovej kultúry s 10 %-ným telacím sérom a antibiotikami. Možno odporúčať kombináciu 200 iu penicilínu, 200 µg streptomycínu a 200 µg kanamycínu na mililiter (ml); môžu byť použité aj iné antibiotiká s dokázanou účinnosťou. Tkanivový materiál, ktorý má byť preskúmaný, je slezina, predná oblička a okrem toho srdce alebo mozog. V niektorých prípadoch musí byť preskúmaná vajecníková tekutina (tabuľky 1A až C).

Vaječníková tekutina alebo časti orgánov najviac z 10 rýb (tabuľka 1A až C) musia byť vložené do sterilnej skúmavky, ktorá obsahuje aspoň 4 ml transportného média a predstavuje jednu spojenú vzorku. Tkanivo v každej vzorke musí vážiť aspoň 0,5 gramu (g).

Skúmavky musia byť umiestnené v izolovaných kontajneroch (napríklad v polystyrénových prepravkách s hrubými stenami) spolu s dostatočným množstvom ľadu alebo chladiacich prvkov na zabezpečenie chladenia vzoriek počas prepravy do laboratória. Treba predísť zmrazeniu. Teplota vzorky počas prepravy nesmie nikdy prekročiť 10 °C, pričom v transportnej prepravke musí byť prítomný ľad ešte pri prevzatí alebo jeden alebo viaceré mraziace bloky musia byť stále čiastočne alebo úplne zamrznuté.

Virologické skúmanie musí začať čo najskôr, a to najneskôr do 48 hodín po odobratí vzoriek. Vo výnimočných (!) prípadoch môže virologické vyšetrenie začať najneskôr do 72 hodín po odobratí materiálu, a to za predpokladu, že materiál, ktorý má byť vyšetovaný, je chránený transportným médiom a počas prepravy môžu byť splnené požiadavky na teplotu (časť I.I.3, odsek 3).

Celé ryby môžu byť odoslané do laboratória, ak je možné splniť požiadavky na teplotu počas prepravy. Celé ryby môžu byť zabalené do papiera s absorbnými vlastnosťami a musia byť nakoniec expedované v plastickom sáčku, chladené tak, ako bolo uvedené.

Všetko balenie a označovanie musí byť vykonané v súlade so súčasnými národnými a medzinárodnými prepravnými predpismi.

4. Odber doplnkového diagnostického materiálu

Podľa dohody s príslušným diagnostickým laboratóriom môžu byť odobraté aj iné tkanivá rýb a pripravené na dopĺňajúce skúmania.

II. Príprava vzoriek na virologické vyšetrenie

1. Zmrazovanie vo výnimočných prípadoch

Ak vzniknú praktické problémy (napr. zlé poveternostné podmienky, dni pracovného pokoja, problémy v laboratóriu atď.), ktoré znemožňujú naočkovanie buniek do 48 hodín od odberu vzoriek tkaniva, je prípustné zmraziť vzorky tkanív v médiu bunkovej kultúry pri teplote -20°C alebo nižšej a vykonať virologické vyšetrenie do 14 dní. Tkanivo však musí byť zmrazené a rozmrazené pred vyšetrením len raz. Musia byť vedené záznamy s informáciami o dôvode zmrazenia vzoriek tkaniva (búrka, odumretie bunkových línií atď.)

2. Homogenizácia orgánov

Tkanivo, ktoré je v skúmavkách, musí byť v laboratóriu úplne homogenizované (stomacherom, v miešacom zariadení alebo trecej miske a roztieradlom so sterilným pieskom) a následne suspendované v pôvodnom transportnom médiu.

Ak vzorka pozostávala z celých rýb kratších ako 4 cm, tieto ryby treba posekať sterilnými nožnicami alebo skalpelom po odstránení tela za črevným otvorom. Ak vzorka pozostávala z celých rýb dlhších ako 6 cm, vzorky tkaniva treba odobrať tak, ako je popísané v časti I.I.3. Vzorky tkaniva treba posekať sterilnými nožnicami alebo skalpelom a homogenizovať podľa popísaného postupu a suspendovať v transportnom médiu.

Konečný pomer medzi tkanivovým materiálom a transportným médiom musí byť v laboratóriu upravený na 1:10.

3. Odstreďovanie homogenátu

Homogenát sa odstreďuje v odstredivke ochladenej na teplotu 2 °C až 5 °C a pri 2 000 až 4 000 x g za 15 minút a pomerné médium sa odoberá a spracováva buď štyri hodiny pri teplote 15 °C, alebo cez noc pri teplote 4 °C antibiotikami, napr. v tejto etape môže byť užitočný gentamicín 1 mg/ml.

Ak je vzorka prepravovaná v transportnom médiu (napr. vystavená antibiotikám), spracovanie pomerného média antibiotikami možno vynechať.

Cieľom spracovania antibiotikami je kontrola bakteriálnej kontaminácie vo vzorkách, pričom nie je potrebná filtrácia cez membránové filtre.

Ak je odobratý supernatant skladovaný pri teplote -80°C do 48 hodín po odbere vzorky, na virologické vyšetrenie môže byť znovu použitý len raz.

(!) Vo výnimočných prípadoch, napr. ak sú ryby odobierané z veľmi vzdialených oblastí, kde neexistuje možnosť denného odosielania.

Ak vzniknú praktické problémy (napr. porucha inkubátora, problémy s bunkovými kultúrami atď.), ktoré znemožňujú naočkovanie buniek do 48 hodín od odberu vzoriek tkaniva, je prípustné zmraziť supernatant pri teplote -80°C a vykonať virologické skúmanie do 14 dní.

Pred očkovaním buniek sa supernatant zmieša v rovnakom pomere primerane zriedeného kúpeľa antiséra proti domácim sérotypom vírusu IPN, a inkubuje sa s ním aspoň jednu hodinu pri teplote 15°C alebo maximálne na 18 hodín pri teplote 4°C . Titer antiséra musí byť aspoň 1:2000 pri 50 % teste neutralizácie plakov.

Cieľom spracovania všetkej očkovacej látky s antisérom vírusu IPN (vírus, ktorý sa v niektorých častiach Európy vyskytuje pri 50 % vzoriek rýb) je zabrániť výskytu cytopatogenického efektu CPE v očkovaných bunkových kultúrach v dôsledku existencie vírusu IPN. Tým sa skrátí trvanie virologických skúmaní ako aj počet prípadov, pri ktorých by výskyt CPE musel byť považovaný za potenciálny príznak VHSV alebo IHNV.

Ak vzorky pochádzajú z výrobných jednotiek, ktoré sú považované za výrobné jednotky bez výskytu IPN, spracovanie očkovacej látky s antisérom na vírus IPN možno vynechať.

III. Virologické vyšetrenie

1. Bunkové kultúry a médiá

Bunky BF-2 alebo RTG-2 a EPC alebo FHM sú pestované pri teplote 20 až 30°C v primeranom médiu, napr. Eaglov MEM (alebo jeho modifikácie) s prídavkom 10 % séra získaného z plodov hovädzieho dobytky a antibiotík v štandardných koncentráciách.

Ak sú bunky kultivované v uzatvorených nádobkách, odporúča sa médium pufrovať hydrogénuhličitanom. Médium použité na kultiváciu buniek v otvorených jednotkách môže byť pufrované pomocou Tris- HCl (23 mM) a Na-hydrogénuhličitanom (6 mM). pH musí byť $7,6 \pm 0,2$.

Bunkové kultúry, ktoré budú použité na očkovanie tkanivového materiálu, majú byť mladé (4 až 48 hodín staré) a aktívne rásť (nezlievať sa) pri očkovaní.

2. Naočkovanie bunkových kultúr

Suspenzia orgánov spracovaná pomocou antibiotík sa naočkuje do bunkových kultúr v dvoch roztokoch, t. j. primárny roztok a okrem toho jeho roztok zriedený 1:10, výsledkom čoho sú konečné roztoky tkanivového materiálu v médiu bunkovej kultúry v pomere 1:100 resp. 1:1000 (s cieľom zabrániť homologickej interferencii). Musia byť očkované aspoň dve bunkové línie (pozri časť I. III.1. Pomer medzi veľkosťou očkovacej látky a objemom média bunkovej kultúry musí byť približne 1:10.

Pre každý roztok a každú bunkovú líniu musí byť použitá bunková plocha aspoň približne 2 cm^2 , čo zodpovedá jednej miske s bunkovými kultúrami z 24 misiek. Odporúča sa použitie misiek s bunkovými kultúrami, ale môžu byť použité tiež iné, podobné alebo väčšie jednotky.

3. Inkubácia bunkových kultúr

Inkubácia očkovaných bunkových kultúr sa uskutočňuje pri teplote 15°C na 7 až 10 dní. Farba média s bunkovými kultúrami sa mení z červenej na žltú, čo naznačuje oksylovanie média, pričom sa musí vykonať úprava pH sterilným roztokom hydrogénuhličitanu alebo ekvivalentnými látkami na zabezpečenie citlivosti na vírusovú infekciu.

Aspoň každých šesť mesiacov alebo pri podozrení na zníženie citlivosti buniek sa vykoná titrácia zmrazených zásob VHSV a IHNV na overenie citlivosti bunkových kultúr na infekciu. Odporúčaný postup je uvedený v časti IV.

4. Mikroskopia

Naočkované bunkové kultúry musia byť pravidelne kontrolované (aspoň trikrát týždenne) na výskyt CPE pri 40 až 150-násobnom zväčšení. Ak je zreteľne zistený CPE, musia byť okamžite zahájené postupy na identifikáciu vírusu podľa časti I.IV.

5. Subkultivácia

Ak sa po primárnej inkubácii 7 až 10 dní nevyvinul CPE, na čerstvých bunkových kultúrach sa vykonáva subkultivácia, pričom sa použije bunková oblasť podobná primárnej kultúre.

Pomerné časti média (supernatant) zo všetkých kultúr/misiek, ktoré predstavujú primárnu kultúru, sa spoja podľa bunkových línií 7 až 10 dní po očkovaní. Tieto spojené séra sa potom naočkujú do homogénnych bunkových kultúr, ktoré sú nezriedené alebo zriedené 1:10 (ktorých výsledkom sú konečné roztoky supernatantu v pomere 1:10 resp. 1:100), ako je popísané v časti I.III.2. Alternatívne sa pomerné časti 10 % média, ktoré predstavujú primárnu kultúru, naočkujú priamo do misky s rybacou bunkovou kultúrou (subkultivácia od misky k miske). Očkovaniu môže predchádzať predbežná inkubácia roztokov s antisérom proti vírusu IPN v príslušnom roztoku, ako je popísané v časti I.III.3.

Potom sa vykoná inkubácia očkovaných kultúr na 7 a 10 dní pri teplote 15°C s pozorovaním, ako je uvedené v časti I.III.4.

Ak sa toxický CPE vyskytne do troch dní od inkubácie, v tejto etape možno vykonať subkultiváciu, ale bunky sa potom musia inkubovať na sedem dní a opäť subkultivovať s ďalšou inkubáciou na sedem dní. Ak sa toxický CPE vyvinie do troch dní, bunky možno prenášať len jedenkrát a inkubovať tak, aby bolo dosiahnutých celkom 14 dní od primárneho očkovania. Počas posledných siedmich dní inkubácie nemá byť zistený žiadny dôkaz toxicity.

Ak dôjde k bakteriálnej kontaminácii napriek spracovaniu antibiotikami, subkultivácii musí predchádzať odstredenie 2000 až 4000 x g na 15 až 30 minút pri teplote 5 °C a/alebo filtrácia supernatantu cez filter 0,45 µm (membrána s nízkym viazaním bielkovín). Okrem toho sú postupy subkultivácie rovnaké ako pri toxickom CPE.

IV. Identifikácia vírusu

1. Testy na identifikáciu vírusu

Ak bol zistený dôkaz o prítomnosti CPE v bunkovej kultúre, médiu (pomerné médium) sa odoberie jednou alebo viacerými z nasledovných metód: neutralizácia, IF, ELISA. Ak tieto testy neumožnia definitívnu identifikáciu vírusu do jedného týždňa, supernatant musí byť odoslaný do národného referenčného laboratória alebo referenčného laboratória EU pre nálezky rýb na okamžitú identifikáciu.

2. Neutralizácia

Odstredenie buniek z odobratého supernatantu odstredením (2 000 až 4000 x) alebo membránovou filtráciou (0,45 µm) s membránou s nízkym viazaním bielkovín a supernatant sa zriedi v pomere 1:100 a 1:10 000 v médiu bunkovej kultúry.

Pomerné časti dvoch roztokov supernatantu sa zmiešajú a inkubujú na 60 minút pri teplote 15 °C s rovnakými časťami nasledovných činidiel osobitne:

- sérum obsahujúce skupinovo špecifickú protilátku proti VHSV v roztoku 1:50 (obj:obj) (!)
- sérum, obsahujúce skupinovo špecifickú protilátku proti IHNV v roztoku 1:50 (obj:obj) (!)
- spojené antiséra proti domácim sérotypom IPNV v roztoku 1:50 (obj:obj) (!)
- samotné médium (pozitívna kontrola).

Z každej zmesi vírusu odobratého z povrchu séra sa naočkujú aspoň dve bunkové kultúry, každá po 50 µm a potom sa vykoná inkubácia pri teplote 15 °C. Skontroluje sa vývoj CPE, ako je popísané v časti I.III.4.

Niektoré kmene VHSV nereagujú na neutralizačné testy. Takéto izoláty musí identifikovať IF alebo ELISA.

Alternatívne môžu byť použité iné neutralizačné testy s preukázanou účinnosťou.

3. IF

Na identifikáciu každého vírusového izolátu sa aspoň osem krycích sklíčok alebo ich ekvivalent osadí bunkami pri hustote, ktorá povedenie k splynutiu približne na 60 % až 90 % po 24 hodinách od kultivácie. Na tento účel sa odporúčajú bunky EPC z dôvodu ich silnej príľnavosti k skleneným povrchom, pričom však môžu byť použité aj iné bunkové línie ako je BF-2, RTG-2 alebo FHM.

Keď sa bunky usadia na povrchu skla (asi jednu hodinu po osadení) alebo, ak boli kultúry inkubované na dobu do 24 hodín, naočkuje sa vírus, ktorý má byť identifikovaný. Sú naočkované štyri kultúry v objemovom pomere 1:10 a štyri kultúry v pomere 1:1 000. Tieto sa potom inkubujú pri teplote 15 °C na 20 až 30 hodín.

Po inkubácii sa kultúry dvakrát opláchnu v Eaglovom MEM bez séra, zafixujú sa v 80 % ľadovom acetóne a potom sa zafarbí dvomi vrstvami IFAT. Prvá reagenčná vrstva pozostáva z poly- alebo monoklonálnych protilátok referenčnej kvality. Druhá reagenčná vrstva je fluorochrómom konjugované antisérum imunoglobulínu, ktoré je použité v prvej vrstve. Pre každé antisérum musí byť zafarbená aspoň jedna očkovaná kultúra s vysokou dávkou a jedna s nízkou dávkou. Test musí zahŕňať riadne negatívne a pozitívne kontroly. Odporúčajú sa fluorochrómy, ako sú FITC alebo TRITC.

Farbené kultúry sa osadia za použitia roztoku glycerínu a soli a vyšetrujú pod dopadajúcim ultrafialovým (UV) svetlom. Používajú sa okuliare 10 x alebo 12 x a x 25 alebo x 40 šošovky objektívu s numerickou apertúrou > 0,7 resp. > 1,3.

Uvedená metóda IF je uvedená ako príklad. Alternatívne môžu byť použité iné metódy IF (súvisiace s bunkovými kultúrami, fixáciou a protilátkami referenčnej kvality) s preukázanou účinnosťou.

(!) Alebo ako určí referenčné laboratórium vzhľadom na možnú cytotoxicitu antisér.

4. ELISA

Jednotlivé misky mikrotitrovacích dosiek sa na noc natrú odporúčanými roztokmi čistených imunoglobulinových frakcií z protilátok referenčnej kvality.

Po opláchnutí misiek tmiacim roztokom PBS-Tween-20 sa vírus, ktorý má byť identifikovaný, pridá do misiek v dvojnásobných alebo štvornásobných riediacich krokoch a umožní sa jeho reakcia s náterovou protilátkou na 60 minút pri teplote 15 °C. Po opláchnutí pufovacím roztokom PBS-Tween-20 sa pridajú bitionované protilátky so špecifikom zodpovedajúcim vrstve protilátok a nechajú sa reagovať 60 minút pri teplote 20 °C. Po ďalšom opláchnutí sa pridá streptavidín konjugovaný HRP a umožní sa jeho reakcia na jednu hodinu pri teplote 20 °C. Po poslednom opláchnutí sa vizualizuje viazaný enzým pomocou primeraných substrátov ELISA (OPD alebo iné).

Uvedené verzia ELISA na báze biotín-avidínu je uvedená ako príklad. Namiesto nej môžu byť použité iné verzie ELISA s preukázanou účinnosťou.

TABUĽKA 1A

Program kontroly a odberu vzoriek pre zóny a pre farmy v neschválených oblastiach na kontrolné obdobie dva roky, ktoré predchádza získaniu schváleného štatútu v súvislosti s VHS a/alebo IHN

(v súlade so smernicou 91/67/EHS, prílohy B a C a ustanovenia uvedené v časti I tejto prílohy)

	Počet klinických kontrol za rok (dva roky)	Počet laboratórnych vyšetrení za rok (dva roky)	Laboratórne vyšetrowanie na prítomnosť vírusu (1)	
			Počet mladých rýb(Orgánový materiál)	Počet chovov rýb(Vaječniková tekutina)
Kontinentálne zóny a farmy				
a) Farmy s chovom	2	2	120 (prvá kontrola) (2) 150 (druhá kontrola)	30 (prvá kontrola) (3) 0 (druhá kontrola)
b) Farmy len s chovom	2	1	0	150 (prvá alebo druhá kontrola) (3)
c) Farmy bez chovu	2	2	150 (prvá a druhá kontrola)	0
Pobrežné zóny a farmy				
a) Farmy s chovom	2	2	120 (prvá kontrola) 150 (druhá kontrola)	30 (prvá kontrola) (3) 0 (druhá kontrola)
b) Lososové farmy bez chovu	2	2	30 (prvá a druhá kontrola) (4)	0
c) Nelososové farmy bez chovu	2	2	150 (prvá a druhá kontrola)	0

Maximálny počet rýb v jednej nádrži: 10

(1) Alternatívne môže byť použitá redukovaná vzorka, ako je uvedené v Tabuľke 1B, ak sú splnené požiadavky uvedené v teste časti II.1, I.1.2.1.b a III.

(2) Klinické kontroly.

(3) Za výnimočných okolností, ak nie je možné získať vaječnikovú tekutinu, môžu byť namiesto nej odobraté vzorky orgánov.

(4) Vzorky musia byť odobraté najskôr tri týždne po preložení rýb zo sladkej do slanej vody.

TABUĽKA 1B

Program kontroly a odberu vzoriek na kontrolné obdobie dva roky, ktoré predchádza získaniu schváleného štatútu v súvislosti s VHS a/alebo IHN v zónach alebo na farmách v neschválených oblastiach s úradne uznanou a zdokumentovanou históriou neprítomnosti týchto nákaz

(v súlade so smernicou 91/67/EHS, prílohy B a C a ustanovenia uvedené v častiach I a III tejto prílohy)

	Počet klinických kontrol za rok (dva roky)	Počet laboratórnych vyšetrení za rok (dva roky)	Laboratórne vyšetovanie na prítomnosť vírusu	
			Počet mladých rýb(Orgánový materiál)	Počet chovov rýb(Vaječnicková tekutina)
Kontinentálne zóny a farmy				
a) Farmy s chovom	2	2	0 (prvá kontrola) ⁽¹⁾ 30 (druhá kontrola)	30 (prvá kontrola) ⁽²⁾ 0 (druhá kontrola)
b) Zariadenia pre mláďatá	2	1	0	30 (prvá alebo druhá kontrola) ⁽²⁾
c) Farmy bez chovu	2	2	30 (prvá a druhá kontrola)	0
Pobrežné zóny a farmy				
a) Farmy s chovom	2	2	0 (prvá kontrola) 30 (druhá kontrola)	30 (prvá kontrola) ⁽²⁾ 0 (druhá kontrola)
b) Lososové farmy bez chovu	2	2	30 (prvá a druhá kontrola) ⁽³⁾	0
c) Nelososové farmy bez chovu	2	2	30 (prvá a druhá kontrola)	0

Maximálny počet rýb v jednej nádrži: 10

⁽¹⁾ Klinické kontroly.

⁽²⁾ Za výnimočných okolností, ak nie je možné získať vaječnickovú tekutinu, môžu byť namiesto nej odobraté vzorky orgánov.

⁽³⁾ Vzorky musia byť odobraté najskôr tri týždne po preložení rýb zo sladkej do slanej vody.

TABUĽKA 1C

Program kontroly a odberu vzoriek pre zóny a pre farmy v neschválených zónach pre zachovanie schváleného štatútu v súvislosti s VHS a/alebo IHN

(v súlade so smernicou 91/67/EHS, prílohy B a C a ustanovenia uvedené v časti I tejto prílohy)

	Počet klinických kontrol za rok	Laboratórne vyšetovanie na prítomnosť vírusu ⁽¹⁾	
		Počet mladých rýb(Orgánový materiál)	Počet chovov rýb(Vaječnicková tekutina)
Kontinentálne zóny a farmy			
a) Farmy s chovom	2	20 (prvá alebo druhá kontrola)	10 (prvá alebo druhá kontrola) ⁽²⁾

	Počet klinických kontrol za rok	Laboratórne vyšetrenie na prítomnosť vírusu (1)	
		Počet mladých rýb(Orgánový materiál)	Počet chovov rýb(Vaječníková tekutina)
b) Farmy len s chovom	2	0	30 (prvá alebo druhá kontrola) (2)
c) Farmy bez chovu	2	30	0
Pobrežné zóny a farmy			
a) Farmy s chovom	2	20 (prvá alebo druhá kontrola)	10 (prvá alebo druhá kontrola) (2)
b) Farmy bez chovu	1	30 (3)	0

Maximálny počet rýb v jednej nádrži: 10

(1) V schválených oblastiach musia byť odoberané vzorky len rotáciou v 50 % rybných fariem každý rok. V schválených farmách v neschválených zónach musia byť vzorky odoberané každý rok.

(2) Za výnimočných okolností, ak nie je možné získať vaječníkovú tekutinu, môžu byť namiesto nej odobraté vzorky orgánov.

(3) Vzorky musia byť odobraté najskôr tri týždne po preložení rýb zo sladkej do slanej vody.

ČASŤ II

Diagnostické postupy na potvrdenie VHS a IHN pri podozrení na nákazy

Na diagnostikovanie VHS a IHN treba použiť jednu alebo viaceré z nasledujúcich metód:

- A. konvenčná izolácia vírusu s následnou sérologickou identifikáciou vírusu,
- B. izolácia vírusu so súčasťou sérologickou identifikáciou vírusu,
- C. iné diagnostické metódy (IFAT, ELISA).

Potvrdenie prvého prípadu VHS a/alebo VHN na farmách v schválených zónach nesmie vychádzať len zo samotnej metódy C.

K tkanivovému materiálu určenému na virologické skúmanie môže byť v niektorých prípadoch potrebné priložiť ďalší materiál na bakteriologické, parazitologické, histologické alebo iné vyšetrenie s cieľom umožniť diferencnú diagnózu.

A. Konvenčná izolácia vírusu s následnou sérologickou identifikáciou vírusu

I.1. Výber vzoriek

Na vyšetrenie treba vybrať aspoň 10 rýb, ktoré majú typické príznaky IHN alebo VHS.

I.2. Príprava a expedícia vzoriek z rýb

Ako je ustanovené v časti I.I.3

I.3. Odber doplnkového diagnostického materiálu

Ako je ustanovené v časti I.I.4

II. Príprava vzoriek na virologické vyšetrenie

Ako je ustanovené v časti I.II

III. Virologické vyšetrenie

Ako je ustanovené v časti I.III

IV. Identifikácia vírusu

Ako je ustanovené v časti I.IV

B. Izolácia vírusu so súčasťou sérologickou identifikáciou vírusu

I.1. Výber vzoriek

Ako je ustanovené v časti II.A.I.1

I.2. Príprava a expedícia vzoriek z rýb

Ako je ustanovené v časti I.I.3

I.3. Odber doplnujúceho diagnostického materiálu

Ako je ustanovené v časti I.I.4

II.1. Homogenizácia orgánov

Ako je ustanovené v časti I.II.2

II.2. II.2 Odstredovanie homogenátu

Homogenát sa odstreduje v chladenej odstredivke pri teplote 2 °C až 5 °C pri 2 000 až 4 000 x g na 15 minút a supernatant sa odoberie a spracuje na štyri hodiny pri teplote 15 °C antibiotikami, napr. gentamicín 1 mg/ml alebo filtruje cez membránu (0,45 µm), a to cez membránu s nízkym viazaním bielkovín.

II.3. Spracovanie supernatantu s diagnostickými antisérami

Suspenzia orgánov spracovaná antibiotikami alebo filtrovaná cez membránu sa zriedi v pomere 1:10 a 1:1 000 v médiu bunkovej kultúry a pomerných častiach zmiešaných a inkubovaných na 60 minút pri teplote 15 °C s rovnakými časťami reagenčných činidiel uvedených v časti I.IV.2.

III.1. Bunkové kultúry a médiá

Ako je ustanovené v časti I.III.1

III.2. Očkovanie bunkových kultúr

Z každej zmesi vírusu a séra (pripravenej podľa časti II.B.II.3) sa naočkujú aspoň dve bunkové kultúry z jednej bunkovej línie, každá po 50 µm.

III.3. Inkubácia bunkových kultúr

Ako je ustanovené v časti I.III.1

III.4. Mikroskopia

Naočkované bunkové kultúry musia byť denne kontrolované na výskyt CPE pri 40 až 150-násobnom zväčšení. Ak CPE zabráni jedno z použitých antisér, vírus možno považovať za identifikovaný v uvedenom zmysle.

Ak CPE nezabráni žiadne antisérum, musia byť vykonané postupy na identifikáciu vírusu nes podľa časti I.IV.

III.5. Subkultivácia

Ak sa 7 až 10 dní nevyvinul CPE, musí byť vykonaná subkultivácia z kultúr naočkovaných supernatantom plus médiom (časť II.B.II.3) podľa časti I.III.5.

C. Iné diagnostické metódy

Supernatant pripravený podľa popisu v časti I.II.2 sa môže podrobiť IFAT alebo ELISA podľa časti I.IV.3, resp. časti I.IV.4. Tieto rýchle metódy musia byť doplnené o virologické skúmanie podľa A alebo B do 48 hodín od odberu vzoriek, ak:

- a) je zistený negatívny výsledok; alebo
- b) je zistený pozitívny výsledok pri materiále, ktorý predstavuje prvý prípad IHN alebo VHS v schválenej oblasti.

Tkanivový materiál môže byť podrobený iným diagnostickým metódam, ako je RT-PCR, IF na rezoch zmrazeného materiálu alebo imunochemickej analýze materiálov fixovaných formalínom. K týmto metódam musí byť vždy pripojené naočkovanie nefixovaného tkanivového materiálu na bunkových kultúrach.

ČASŤ III

Zdokumentovaná história neprítomnosti VHS a/alebo IHN v zónach alebo na farmách v neschválených zónach

Smernice a kritériá pre program úradnej zdravotnej kontroly

1. Program zdravotnej kontroly môže byť začatý len:
 - po úradne uznanom programe ozdravenia VHSV a/alebo IHNV vrátane odstránenia všetkých rýb na farme, čistenia, dezinfekcie a vyprázdnenia farmy pred opätovným naplnením rybami zo schválených fariem, alebo
 - na farmách, ktoré sú historicky bez infekcie VHSV alebo IHNV.
2. Program zdravotnej kontroly musí byť založený na klinických kontrolách aj laboratórnych vyšetreniach.
3. Program musí zahŕňať aspoň dve klinické zdravotné kontroly ročne podľa smerníc uvedených v časti I.

4. Aspoň pri jednej z kontrol vykonaných každý rok musí byť z každej farmy odobratých 30 vzoriek rybieho tkaniva a/alebo vaječnikovej tekutiny. Vzorky musia byť vybraté, pripravené a laboratórne vyšetrené podľa častí I, II a IV.
5. Program zdravotnej kontroly sa musí vykonávať aspoň štyri roky na všetkých farmách v zóne alebo na farme (v neschválenej zóne), ktorá má byť schválená.
6. Na úradné uznanie programu sa nesmú vyskytnúť, ani objaviť žiadne prípady VHS alebo IHN (žiadne klinické infekcie alebo izolácie vírusov).

ČASŤ IV

Postup titrácie na overenie citlivosti bunkových kultúr na infekciu

Ďalej sú uvedené odporúčané postupy titrácie uvedené v časti LIII.3.

Treba použiť aspoň dva izoláty VHSV a jeden izolát IHNV. Izoláty majú predstavovať hlavnú skupinu vírusov v EÚ, napr. pre VHSV jeden patogénny izolát zo pstruha dúhového v sladkej vode a jeden patogénny izolát kambaly veľkej v slanej vode a pre IHNV jeden patogénny kmeň zo pstruha dúhového z Európy. Treba použiť dobre definované izoláty z členských štátov. Referenčné izoláty sú k dispozícii v referenčnom laboratóriu EÚ pre nákazy rýb.

Dávky vírusov sa získavajú v niekoľkých priechodoch bunkových kultúr v bankách s bunkovými kultúrami na BF-2 alebo RTG-2 bunkách v prípade VHSV a na EPC alebo FHM bunkách pre IHNV. Treba použiť médium bunkovej kultúry s aspoň 10 %-ným sérom. Na očkovanie použite nízku MOI (< 1).

V prípade celkového CPE (cytopatogénneho efektu) sa vírus získava 15-minútovým odstredovaním supernatantu bunecnej kultúry pri 2000 x g, sterilne membránovo filtruje (0, 45µm) a distribuuje sa v kryotrubičkách so štítkom. Vírus sa skladuje pri teplote -80°C.

Týždeň po zmrazení sa tri trubičky s každým vírusom nechajú roztopiť v studenej vode a titrujú sa na ich príslušnej bunkovej línii. Aspoň každých šesť mesiacov alebo pri podozrení, že sa znížila citlivosť bunkovej línie, sa každý izolát vírusu rozmrazí a titruje.

Postupy titrácie musia byť podrobne popísané a vždy musí byť použitý rovnaký postup.

Titrácia so zriedením až do konečného bodu by mala zahŕňať najmenej šesť opakovaní každého kroku zriedenia. Titre sa porovnávajú s predtým získanými titrami. Ak sa titer ktoréhokoľvek z troch izolátov vírusu zníži o 2 logs alebo viac v porovnaní so začiatočným titrom, bunková línia sa nemá ďalej používať na účely sledovania.

Ak sú v laboratóriu rôzne bunkové línie, každú líniu treba skúmať osobitne.

Záznamy musia byť uchovávané aspoň 10 rokov.

ČASŤ V

Akronymy a skratky

BF-2	Poter zo slnečnice modrožiabrovej – 2 (bunková línia)
CPE	Cytopatický efekt
CRL	Referenčné laboratórium spoločenstva pre nákazy rýb
ELISA	Imunostanovenie, kedy je na protilátku naviazaný enzým
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (bunková línia)
FHM	Fathead minnow (bunková línia)
FITC	Fluorescein-izothiokyanát
Hepes	Kyselina sulfónová 2-/4-(2-hydroxyethyl)piperazino/etanolová
HRP	Peroxidáza chrenu
IF	Imunofluorescencia
IFAT	Nepriamy fluorescenčný test protilátok
IHN(V)	Infekčná hematopoetická nekróza (vírus)
IPN	Infekčná pankreatická nekróza (vírus)
MEM	Minimálne nutné médium

MOI	Multiplicita infekcie (pomer počtu pridaných infekčných vírusových častíc ku známemu počtu buniek v jednej kultúre)
OPD	Ortho-fenylendiamín
PBS	Fosfátom pufovaný roztok soli
RTG-2	Gonády pstruha dúhového (bunková línia)
RT-PCR	Reťazová reakcia – reverzná transkriptáza polymeráza
Tris-HCl	Tris(hydroxymetyl)aminometán-HCl
TRITC	Tetrametyl-rhodamín-isothiokyanát
VHS(V)	Vírusová hemoragická septikémia (vírus)
