

32001D0183

9.3.2001

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

L 67/65

**ODLOČBA KOMISIJE****z dne 22. februarja 2001****o določitvi načrtov vzorčenja in diagnostičnih metod za odkrivanje in potrjevanje nekaterih boleznih rib ter o razveljavitvi Odločbe 92/532/EGS***(notificirano pod dokumentarno številko K(2001) 426)***(Besedilo velja za EGP)**

(2001/183/ES)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 91/67/EGS z dne 28. januarja 1991 o pogojih v zvezi z zdravjem živali, ki urejajo dajanje živali in proizvodov iz akvakultur na trg <sup>(1)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Direktivo 98/45/ES <sup>(2)</sup>, in zlasti člena 15 Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Načrti vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje in potrjevanje nekaterih boleznih rib so določeni v Odločbi Komisije 92/532/EGS <sup>(3)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Odločbo Komisije 96/240/ES <sup>(4)</sup>.
- (2) Od sprejema Odločbe 92/532/EGS je prišlo do novega praktičnega in znanstvenega razvoja, Direktiva 91/67/EGS pa se je spremenila. Zaradi tega je potrebna posodobitev načrtov vzorčenja in diagnostičnih metod.
- (3) Takšna posodobitev se nanaša na pregledovanje in prepoznavanje virusov, ki povzročajo virusno hemoragično septikemijo (VHS) in nalezljivo hematopoetsko nekrozo (IHN), ter na spremembe v skladu z zadnjimi spremembami Direktive 91/67/EGS.
- (4) Opravljeno je bilo posvetovanje z referenčnim laboratorijem Skupnosti za bolezni rib, ustanovljenim z Direktivo Sveta 93/53/EGS <sup>(5)</sup>.

(5) Zaradi jasnosti je treba razveljaviti načrte vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje in potrjevanje nekaterih boleznih rib, določene z Odločbo 92/532/EGS.

(6) Ukrepi, predvideni s to odločbo, so v skladu z mnenjem Stalnega veterinarskega odbora –

SPREJELA NASLEDNJO ODLOČBO:

*Člen 1*

Načrti vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje in potrjevanje virusne hemoragične septikemije (VHS) in nalezljive hematopoetske nekroze (IHN) so določeni v Prilogi.

*Člen 2*

Ta odločba razveljavlja Odločbo 92/532/EGS.

*Člen 3*

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 22. februarja 2001

Za Komisijo  
David BYRNE  
Član Komisije

<sup>(1)</sup> UL L 46, 19.2.1991, str. 1.

<sup>(2)</sup> UL L 189, 3.7.1998, str. 12.

<sup>(3)</sup> UL L 337, 21.11.1992, str. 18.

<sup>(4)</sup> UL L 79, 29.3.1996, str. 19.

<sup>(5)</sup> UL L 175, 19.7.1993, str. 23.

## PRILOGA

**NAČRTI VZORČENJA IN DIAGNOSTIČNE METODE ZA ODKRIVANJE IN POTRJEVANJE VIRUSNE HEMORAGIČNE SEPTIKEMIJE (VHS) IN NALEZLJIVE HEMATOPOETSKE NEKROZE (IHN)**

## UVOD

Ta priloga:

- (a) zagotavlja smernice in minimalne zahteve za načrte vzorčenja in diagnostične metode za odkrivanje in potrjevanje prisotnosti virusne hemoragične septikemije (VHS) in nalezljive hematopoetske nekroze (IHN);
- (b) vključuje določbe prilog B in C k Direktivi 91/67/EGS za odobritev in ohranjanje statusa območij in ribogojnic v neodobrenih območjih;
- (c) navaja določbe, katerih cilj je pravilna diagnoza VHS in IHN ter uradno priznanje statusa območij in ribogojnic iz neodobrenih območij v skladu s členoma 5 in 6 Direktive 91/67/EGS;
- (d) je namenjena organom, pristojnim za nadzor nad VHS in IHN, ter laboratorijskemu osebju, ki izvaja teste glede teh bolezni. Skladno s tem je poudarek na postopkih in načelih vzorčenja ter uporabi laboratorijskih preiskav in ovrednotenju njihovih rezultatov kakor tudi na podrobnih laboratorijskih tehnikah. Vendar laboratoriji lahko, kadar je to ustrezno, uporabljajo spremenjene teste, opisane v tej prilogi, ali uporabljajo drugačne teste, če lahko dokažejo njihovo enakovredno občutljivost in specifičnost.

Del I vključuje načrte vzorčenja in diagnostične metode za nadziranje VHS in IHN, da se pridobi in ohrani odobreni status območja ali ribogojnice v neodobrenem območju.

Del II opisuje diagnostične postopke za potrditev VHS in IHN v primeru suma.

Del III navaja merila in smernice za uradni program zdravstvenega nadzora, ki dokazujejo stanje brez VHS in/ali IHN v preteklosti.

Del IV navaja priporočila za postopek titracije virusa VHS in IHN, da se preveri dovzetnost celičnih kultur za okužbo.

Kratice in okrajšave so navedene v delu V.

## DEL I

**Načrti vzorčenja in diagnostične metode za nadziranje VHS in IHN zaradi pridobitve in ohranitve odobrenega statusa območja ali ribogojnice v neodobrenem območju****I. Pregledi in vzorčenje**

1. *Splošne določbe o kliničnih zdravstvenih pregledih, zbiranju in izbiri vzorcev za nadziranje območij ali ribogojnic v neodobrenih območjih, da se doseže ali ohrani odobreni status glede VHS in/ali IHN*

Klinični zdravstveni pregledi ter vzorčenje tkiva rib in/ali ovarialne tekočine, ki jih je treba opraviti v območjih ali ribogojnicah v neodobrenih območjih, da se doseže ali ohrani odobreni status glede VHS in/ali IHN v skladu s prilogama B in C k Direktivi 91/67/EGS, so povzeti v tabelah 1A, 1B in 1C. Dodatne podrobnosti so določene v delih I.I.2 do I.I.4. Tabeli 1A in 1B se ne uporabljata za nove ribogojnice in ribogojnice, ki ponovno začenejajo svoje dejavnosti v zvezi z ribami, jajčeci ali spolnimi celicami, iz odobrenih območij ali odobrenih ribogojnic iz neodobrenih območij, pod pogojem, da izpolnjujejo zahteve, določene v Direktivi 91/67/EGS, Priloga C, Del I.A.6(a) ali I.A.6(b) ali II.A.3(a) ali II.A.3(b).

Klinične preglede je treba opraviti v času od oktobra do junija ali ko je temperatura vode pod 14 °C. Pri ribogojnicah, ki se klinično pregledajo dvakrat letno, morajo biti presledki med pregledi najmanj štiri mesece. Vse proizvodne enote (ribnike, bazene, mrežaste kletke itd.) je treba pregledati v zvezi s prisotnostjo mrtvih ali slabotnih rib ali rib z nenormalnim vedenjem. Posebno pozornost je treba nameniti območju vodnih iztokov, kjer se zaradi vodnega toka rade zbirajo oslabele ribe.

Ribe za vzorčenje se izberejo na naslednji način:

- Če je med njimi amerikanka, se za vzorčenje izberejo samo ribe te vrste. Če med njimi ni amerikanke, je treba vzeti vzorec vseh drugih prisotnih vrst rib, kadar so te ribe dovzetne za VHSV in/ali IHN (kakor je navedeno v Prilogi A k Direktivi 91/67/EGS). Vrste rib morajo biti v vzorcu zastopane sorazmerno.
- Če se za proizvodnjo rib uporablja več kot en vodni vir, je treba v vzorčenje vključiti vse vodne vire.
- Če so prisotne slabotne ribe ali ribe, ki se vedejo nenormalno, ali pred kratkim umrle ribe (ki se še niso razkrojile), se najprej izberejo takšne ribe. Če takšnih rib ni, morajo izbrane ribe vključevati normalno izgledajoče zdrave ribe, zbrane tako, da so v vzorcu sorazmerno zastopani vsi deli ribogojnice kakor tudi vsi letniki.

2. Posebne določbe, vključno z zbiranjem vzorcev, za nadziranje območij ali ribogojnic v neodobrenih območjih, da se doseže ali ohrani odobreni status glede VHS in/ali IHN

1. Območje ali ribogojnica v neodobrenem območju, ki je pod nadzorom uradnih služb, lahko pridobi odobreni status glede VHS in/ali IHN na podlagi:

(a) Vzorca A — dvoletni program nadziranja

Po vsaj dvoletni odsotnosti vseh kliničnih ali drugih znakov VHS in/ali IHN je treba vse ribogojnice v območju ali vsako ribogojnico v neodobrenem območju, ki naj bi dobile dovoljenje, dve leti zdravstveno pregledati dvakrat letno. V tem dvoletnem nadzornem obdobju pred pridobitvijo odobrenega statusa, je morala biti odsotnost kliničnih ali drugih znakov VHS in/ali IHN stalna, vzorce za pregled pa je treba zbirati v skladu s tabelo 1A. Poleg tega je treba vzorce zbirati, pripraviti in pregledati, kakor je opisano v delih I.I do I.IV, rezultati laboratorijskih preiskav pa so morali biti glede VHS in/ali IHN negativni; ali

(b) Vzorca B — dvoletni program nadziranja z zmanjšano velikostjo vzorca

Po izvedenem uradnem programu zdravstvenega nadzora, ki je dokazal, da vsaj v preteklih štirih letih VHS in/ali IHN nista bili prisotni, je treba vse ribogojnice v območju ali vsako ribogojnico v neodobrenem območju, ki naj bi dobile dovoljenje, dve leti zdravstveno pregledati dvakrat letno. V tem dvoletnem nadzornem obdobju pred pridobitvijo odobrenega statusa, je morala biti odsotnost kliničnih ali drugih znakov VHS in/ali IHN stalna, vzorce za pregled pa je treba zbrati v skladu s tabelo 1B. Poleg tega je treba vzorce zbrati, pripraviti in pregledati, kot je opisano v delih I.I do I.IV, rezultati laboratorijskih preiskav pa so morali biti glede VHS in/ali IHN negativni. Da program zdravstvenega nadzora lahko priznajo uradne službe za dokazovanje odsotnosti VHS in/ali IHN, mora izpolnjevati merila in smernice iz dela III.

2. Posebne določbe za odobritev novih ribogojnic in ribogojnic, ki ponovno začinjajo svojo dejavnost v zvezi z ribami, jajčeci ali spolnimi celicami, iz odobrenega območja ali odobrene ribogojnice v neodobrenem območju

Nove ribogojnice in ribogojnice, ki ponovno začinjajo svojo dejavnost v zvezi z ribami, jajčeci ali spolnimi celicami, iz odobrenega območja ali odobrene ribogojnice v neodobrenem območju, lahko pridobijo status v skladu z zahtevami, določenimi v Direktivi 91/67/EGS, Priloga C, I.A.6a/b ali II.A.3.a/b. V skladu s tem se določbe o vzorčenju iz modelov A in B zgoraj (del I.I.2.1.a in I.I.2.1.b) za takšne ribogojnice ne uporabljajo.

3. Program nadziranja za ohranitev odobrenega statusa glede VHS in/ali IHN

Da območje ali ribogojnica v neodobrenem območju ohrani odobreni status glede VHS in/ali IHN, je treba izvajati preglede in vzorčenje za preglede v skladu s tabelo 1C. Vzorce je treba izbrati, pripraviti in pregledati, kakor je opisano v delih I.I do I.IV, rezultati laboratorijskih preiskav pa morajo biti glede povzročiteljev VHS in/ali IHN negativni.

3. Priprava in pošiljanje vzorcev rib

Dele organov, ki naj bi se pregledali, je treba, preden se odpošljejo ali prenesejo v laboratorij, odstraniti iz ribe s sterilnim secirnim orodjem in jih prenesti v sterilne plastične epruvete, ki vsebujejo transportno gojišče, t.j. gojišče celične kulture z 10 % telečjim serumom in antibiotiki. Lahko se priporoči kombinacija 200 iu penicilina, 200 µg streptomicina in 200 µg kanamicina na mililiter (ml), vendar se lahko uporabijo tudi drugi antibiotiki z dokazano učinkovitostjo. Tkivni material, ki naj bi se pregledal, je vranica, sprednji del ledvice in poleg tega še bodisi srce bodisi možgani. V nekaterih primerih je treba pregledati ovarialno tekočino (tabele 1A do C).

Ovarialna tekočina ali koščki organov največ 10 rib (tabele 1A do C) se lahko zberejo v eni sterilni epruveti, ki vsebuje najmanj 4 ml transportnega gojišča, in predstavljajo en združen vzorec. Tkivo v vsakem vzorcu mora tehtati najmanj 0,5 grama (g).

Epruvete bi se morale postaviti v izolirane posode (na primer polistirenske škatle z debelimi stenami), skupaj z dovolj veliko količino ledu ali zamrzovalnih elementov, ki zagotavljajo hlajenje vzorcev med prevozom v laboratorij. Zamrznitev je treba preprečiti. Temperatura vzorca med prevozom ne sme nikoli preseči 10 °C, ob njihovem sprejemu pa mora biti v transportnem zaboju še vedno led ali en ali več zamrzovalnih elementov še vedno delno ali v celoti zamrznjenih.

Z virološko preiskavo je treba začeti čim prej, najpozneje pa v 48 urah po zbiranju vzorcev. V izjemnih (!) primerih se z virološko preiskavo lahko začne najpozneje v 72 urah po zbiranju materiala, pod pogojem, da material, ki naj bi se pregledal, varuje transportno gojišče in je mogoče izpolniti temperaturne zahteve med prevozom (del I.I.3, odstavek 3).

V laboratorij se lahko pošljejo cele ribe, če je med prevozom mogoče izpolniti temperaturne zahteve. Cele ribe se lahko zavijejo v papir s sposobnostjo vpijanja in se nato odpošljejo v plastični vrečki, hlajene, kakor je bilo navedeno. Pošljejo se lahko tudi žive ribe.

Vso pakiranja in označevanje mora biti v skladu z veljavnimi nacionalnimi in mednarodnimi transportnimi predpisi, če je to primerno.

#### 4. Zbiranje dopolnilnega diagnostičnega materiala

Po dogovoru z vpletenim diagnostičnim laboratorijem se lahko zbere in pripravi za dopolnilne preiskave tudi druga tkiva rib.

## II. Priprava vzorcev za virološko preiskavo

### 1. Zamrznitev v izjemnih primerih

Kadar se pojavijo praktične težave (npr. slabi vremenski pogoji, dela prosti dnevi, laboratorijske težave itd.), ki preprečujejo nacepitev celic v 48 urah po odvzemu vzorcev tkiva, je sprejemljiva zamrznitev vzorcev tkiva v gojišču celične kulture pri -20 °C ali pod to temperaturo in izvedba virološke preiskave v 14 dneh. Vendar se tkivo lahko zamrzne in odmrzne samo enkrat pred pregledom. Treba je voditi evidenco s podrobnostmi o vzroku za vsako zamrznitev vzorcev tkiva (kot je neurje, odmrtnje celičnih linij, itd.)

### 2. Homogenizacija organov

V laboratoriju je treba tkivo v epruvetah popolnoma homogenizirati (bodisi s stomaherjem, mešalcem ali možnarjem in zdrobiti s sterilnim peskom), nato pa suspendirati v prvotnem transportnem gojišču.

Če vzorec sestavljajo cele ribe, krajše od 4 cm, se seseklja s sterilnimi škarjami ali skalpelom po odstranitvi telesa za zadnjično odprtino. Če vzorec sestavljajo cele ribe, z dolžino telesa med 4 in 6 cm, se zbere drobovje, vključno z ledvicami. Če vzorec sestavljajo cele ribe, daljše od 6 cm, se zberejo vzorci tkiva, kakor je opisano v delu I.I.3. Vzorce tkiva se seseklja s sterilnimi škarjami ali skalpelom in homogenizira, kakor je opisano zgoraj, ter suspendira v transportnem gojišču.

Končno razmerje med tkivom in transportnim gojiščem je treba v laboratoriju uravnati na 1: 10.

### 3. Centrifugacija homogenata

Homogenat se centrifugira v ohlajeni centrifugi pri temperaturi 2° do 5 °C pri 2 000 do 4 000 × g 15 minut, supernatant pa se zbere in obdeluje bodisi štiri ure pri 15 °C ali čez noč pri 4 °C skupaj z antibiotiki, v tej fazi je lahko koristen npr. gentamicin 1 mg/ml.

Če je bil vzorec poslan v transportnem gojišču (t.j. izpostavljen antibiotikom), se obdelava supernatanta z antibiotiki lahko izpusti.

Namen obdelave z antibiotiki je nadzorovanje bakterijske okužbe vzorcev, zaradi česar je filtracija skozi membranske filtre nepotrebna.

Če se zbrani supernatant shrani pri -80 °C v 48 urah po vzorčenju, se lahko ponovno uporabi samo še enkrat za virološko preiskavo.

(!) V izjemnih primerih, npr. kadar se ribe zbirajo na zelo oddaljenih območjih brez možnosti dnevnega odpošiljanja.

Kadar se pojavijo praktične težave (npr. okvara inkubatorja, težave s celičnimi kulturami, itd.), ki preprečujejo nacepitev celic v 48 urah po odvzemu vzorcev tkiva, je sprejemljiva zamrznitev supernatanta pri  $-80^{\circ}\text{C}$ , virološka preiskava pa se opravi v 14 dneh.

Pred nacepivitvijo celic se supernatant zmeša z enakimi deli ustrezno razredčenih skupnih vzorcev antiserumov s prvotnimi serotipi virusa IPN in s tem inkubira najmanj eno uro pri  $15^{\circ}\text{C}$  ali največ 18 ur pri  $4^{\circ}\text{C}$ . Titer antiseruma mora biti najmanj 1/2 000 pri 50 % testu za nevtralizacijo plaka.

Namen obdelave vseh nacepkov z antiserumom za virus IPN (virus, ki se v nekaterih delih Evrope pojavlja pri 50 % vzorcev rib) je preprečiti razvoj CPE v nacepljenih celičnih kulturah zaradi virusa IPN. Zaradi tega se bo skrajšalo trajanje viroloških preiskav in zmanjšalo število primerov, pri katerih bi bilo treba pojav CPE šteti za potencialni znak VHSV ali IHNV.

Če vzorci prihajajo iz proizvodnih enot, ki veljajo za proste IPN, se obdelava nacepkov z antiserumom za virus IPN lahko izpusti.

### III. Virološka preiskava

#### 1. Celične kulture in gojišča

Celice BF-2 ali RTG-2 in bodisi EPC bodisi FHM se gojijo pri  $20^{\circ}$  do  $30^{\circ}\text{C}$  na ustreznem gojišču, npr. Eaglov MEM (ali njegove modifikacije) z dodatkom 10 % plodovnega govejega seruma in antibiotikov v standardnih koncentracijah.

Če se celice gojijo v zaprtih stekleničkah, se priporoča puferiranje gojišča z bikarbonatom. Gojišče, ki se uporablja za gojenje celic v odprtih enotah, se lahko puferira s Tris-HCl (23 mM) in Na-bikarbonatom (6 mM). Vrednost pH mora biti  $7,6 \pm 0,2$ .

Celične kulture, namenjene za nacepljenje s tkivnim materialom, morajo biti mlade (stare 4 do 48 ur) in morajo pri nacepljanju rasti aktivno (ne smejo biti zraščene).

#### 2. Nacepljanje celičnih kultur

Z antibiotiki obdelana suspenzija organov se nacepi v celične kulture v dveh razredčinah, prvotna razredčina in poleg tega njena razredčina 1:10, kar ima za posledico končni razredčini tkivnega materiala v gojišču celične kulture 1:100 ali 1:1 000 (da se prepreči homologna interferenca). Nacepiti je treba vsaj dve celični liniji (glej Del I. III.1). Razmerje med velikostjo nacepka in obsegom gojišča celične kulture mora biti približno 1:10.

Za vsako razredčitev in vsako celično linijo je treba uporabiti vsaj približno  $2\text{ cm}^2$  celične površine, ki ustreza eni jamici na pladnju s 24 jamicami celične kulture. Priporoča se uporaba pladnjev s celičnimi kulturami, vendar so enako sprejemljive tudi druge podobne ali večje površine rasti.

#### 3. Inkubacija celičnih kultur

Nacepljene celične kulture se inkubirajo pri  $15^{\circ}\text{C}$  7 do 10 dni. Če se barva gojišča celične kulture spremeni iz rdeče v rumeno, kar kaže na zakisanje gojišča, je treba opraviti prilagoditev pH s sterilno bikarbonatno raztopino ali enakovrednimi snovmi, da se zagotovi dovzetnost celic za okužbo z virusom.

Vsaj vsakih šest mesecev, ali če se sumi zmanjšana dovzetnost celic, se opravi titracija zamrznjenih zalog VHSV in IHNV, da se preveri dovzetnost celičnih kultur za okužbo. Priporočeni postopek je predstavljen v delu IV.

#### 4. Mikroskopiranje

Nacepljene celične kulture je treba redno pregledovati (vsaj trikrat na teden) zaradi pojavljanja CPE pri 40- do 150-kratni povečavi. Če se opazi očiten CPE, je treba takoj začeti s postopki za prepoznavanje virusov v skladu z delom I.IV.

#### 5. Kultiviranje na novem gojišču

Če se po prvotni 7 do 10 dnevni inkubaciji CPE ne razvije, se opravi kultiviranje novih celičnih kultur na novem gojišču, pri čemer se uporabi celična površina, podobna površini iz prvotne kulture.

Alikvoti gojišča (supernatant) vseh kultur/jamic, ki sestavljajo prvotno kulturo, se zberejo po celični liniji 7 do 10 dni po nacepljanju. Skupni vzorci se nato nacepijo v homologne celične kulture, nerazredčene in razredčene v razmerju 1:10 (končna razredčitev supernatanta 1:10 oziroma 1:100), kakor je opisano v delu I.III.2. Druga možnost je, da se alikvoti 10 % gojišča, ki sestavlja prvotno kulturo, nacepijo neposredno v jamico s svežo celično kulturo (kultiviranje na novem gojišču jamica ob jamici). Pred nacepivitvijo se lahko izvede predinkubacija razredčitev z antiserumom za virus IPN pri ustreznih razredčitvi, kakor je opisano v delu I.II.3.

Nacepljene kulture se nato inkubirajo 7 do 10 dni pri 15 °C z opazovanjem, kakor je opisano v delu I.III.4.

Če se toksični CPE pojavi v prvih treh dneh inkubacije, se v tej fazi lahko izvede kultiviranje na novem gojišču, vendar je treba celice potem inkubirati sedem dni in jih znova nasaditi na novem gojišču z dodatnimi sedmimi dnevi inkubacije. Če se toksični CPE razvije po treh dneh, se celice lahko enkrat presadijo in inkubirajo, da se doseže skupaj 14 dni od prvotne nacepitve. V zadnjih sedmih dneh inkubacije se ne smejo pojaviti znaki toksičnosti.

Če se kljub obdelavi z antibiotiki pojavi bakterijska okužba, je treba pred kultiviranjem na novem gojišču opraviti centrifugiranje pri 2 000 do 4 000 × g 15 do 30 min pri 2!!! error character !!! B!!! error character !!! 1 do 5 °C in/ali filtracijo supernatanta skozi 0,45 µm filter (membrana, ki minimalno veže proteine). Poleg tega so postopki kultiviranja na novem gojišču enaki, kot pri toksičnem CPE.

#### IV. Prepoznavanje virusov

##### 1. Preskusi za prepoznavanje virusov

Če se je v celični kulturi odkril dokaz za CPE, se gojišče (supernatant) zbere in pregleda po enem ali več od naslednjih postopkov: nevtralizacija, IF, ELISA. Če ti preskusi v enem tednu niso omogočili dokončne določitve virusa, je treba supernatant poslati nacionalnemu referenčnemu laboratoriju ali referenčnemu laboratoriju EU za bolezni rib v takojšnji identifikacijo.

##### 2. Nevtralizacija

Iz zbranega supernatanta odstranite celice s centrifugiranjem (2 000 do 4 000 × g) ali membransko filtracijo (0,45 µm) z membrano, ki minimalno veže proteine, supernatant pa razredčite v razmerju 1:100 in 1:10 000 v gojišču celične kulture.

Alikvoti dveh razredčitev supernatanta se zmešajo in ločeno inkubirajo 60 minut pri 15 °C z enakimi deli naslednjih reagentov:

- serum, ki vsebuje protitelo, specifično za zadevno skupino, proti VHSV pri razredčitvi 1:50 (prostornina:prostornina) <sup>(1)</sup>
- serum, ki vsebuje protitelo, specifično za zadevno skupino, proti IHNV pri razredčitvi 1:50 (prostornina:prostornina) <sup>(1)</sup>
- skupne vzorce antiserumov proti prvotnim serotipom IPNV pri razredčitvi 1:50 (prostornina:prostornina) <sup>(1)</sup>,
- samo gojišče (pozitivna kontrola).

Iz vsake virusne zmesi supernatant-serum se nacepi najmanj dve celični kulturi, vsaka s 50 µl, ki se nato inkubirata pri 15 °C. Razvoj CPE se preverja, kakor je opisano v delu I.III.4.

Nekateri sevi VHSV pri testih za nevtralizacijo ne reagirajo. Takšne izolate je treba določiti z metodo IF ali ELISA.

Lahko se uporabijo drugi testi za nevtralizacijo, katerih učinkovitost je bila dokazana.

##### 3. IF

Za vsak izolat virusa, ki ga je treba določiti, se s celicami nasadi najmanj osem krovnih stekelc ali njihovih ekvivalentov pri gostoti, ki vodi do približno 60 % do 90 % konfluente po 24 urah od nasaditve. V ta namen se priporočajo celice EPS, ker se na stekleno površino močno prilepijo, vendar se lahko uporabijo tudi druge celične linije, kot so BF-2, RTG-2 ali FHM.

Ko se celice usedejo na stekleno površino (približno eno uro po nasaditvi) ali ko se kulture inkubirajo do 24 ur, se nacepi virus, ki ga je treba določiti. Štiri kulture se nacepijo v razmerju prostornina:prostornina 1:10, štiri kulture pa v razmerju 1:1 000. Te se nato inkubirajo 20 do 30 ur pri 15 °C.

Po inkubaciji se kulture dvakrat izperejo v Eaglovem MEM brez seruma, fiksirajo v 80 % ledeno hladnem acetonu in nato obarvajo z dvoslojnim IFAT-om. Prvi sloj reagenta sestavljajo poliklonalna ali monoklonalna protitelesa referenčne kakovosti. Drugi sloj reagenta je antiserum za imunoglobulin, konjugiran s fluorokromom in uporabljen v prvem sloju. Za vsak preskušani antiserum je treba obarvati vsaj po eno celično kulturo, nacepljeno z visokim odmerkom virusa, in vsaj po eno celično kulturo, nacepljeno z nizkim odmerkom virusa. V test je treba vključiti ustrezne negativne in pozitivne kontrole. Priporočajo se fluorokromi, kot sta FITC ali TRITC.

Zložite obarvane celične kulture drugo na drugo v solno raztopino glicerola. Preglejte jih pod vpadno ultravijolično (UV) svetlobo. Uporabite 10 × ali 12 × okularje in × 25 ali × 40 objektiv z numeričnimi odprtini > 0,7 ali > 1,3.

Zgoraj opisani postopek IF je naveden kot primer. Namesto njega se lahko uporabijo drugi postopki IF (glede na celične kulture, fiksacijo in protitelesa referenčne kakovosti), katerih učinkovitost je bila dokazana.

<sup>(1)</sup> Ali kot določil referenčni laboratorij glede na možno citotoksičnost antiserumov.

## 4. ELISA

Jamice v mikrotitrirnih ploščah se čez noč prekrijejo s priporočenimi razredčitvami frakcij očiščenega imunoglobulina protiteles referenčne kakovosti.

Po spiranju jamic s pufrom PBS-Tween-20, se virus, ki ga je treba določiti, doda v jamice v dveh ali štirih korakih razredčevanja in se mu omogoči, da reagira s prekrivnim protitelesom 60 minut pri 37 °C. Po spiranju s pufrom PBS-Tween-20 se dodajo biotinizirana protitelesa s specifičnostjo, ki ustreza specifičnosti prekrivnih protiteles, in se jim omogoči, da reagirajo 60 minut pri 20 °C. Po še enem takšnem spiranju se doda streptavidin, konjugiran s HRP, in se omogoči, da reagira eno uro pri 20 °C. Po zadnjem spiranju se vizualizira vezani encim z uporabo ustreznih substratov ELISA (OPD ali drugih).

Zgoraj opisana različica ELISA, ki temelji na biotinu in avidinu, je navedena kot primer. Namesto nje se lahko uporabijo druge različice z dokazano učinkovitostjo.

TABELA 1A

**Program pregledov in vzorčenja za območja in ribogojnice v neodobrenih območjih za dvoletno obdobje nadziranja pred pridobitvijo odobrenega statusa glede VHS in/ali IHN**

(v skladu z Direktivo 91/67/EGS, priloga B in C in določbami iz dela 1 te priloge)

	Število kliničnih pregledov na leto(dve leti)	Število laboratorijskih preiskav na leto(dve leti)	Laboratorijska preiskava glede prisotnosti virusa <sup>(1)</sup>	
			Število gojenih rib (Organski material)	Število plemenskih rib (Ovarialna tekočina)
Celinska območja in ribogojnice				
(a) Ribogojnice s plemenskimi ribami	2	2	120 (prvi pregled) <sup>(2)</sup> 150 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) <sup>(3)</sup> 0 (drugi pregled)
(b) Ribogojnice samo s plemenskimi ribami	2	1	0	150 (prvi ali drugi pregled) <sup>(3)</sup>
(c) Ribogojnice brez plemenskih rib	2	2	150 (prvi in drugi pregled)	0
Obalna območja in ribogojnice				
(a) Ribogojnice s plemenskimi ribami	2	2	120 (prvi pregled) 150 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) <sup>(3)</sup> 0 (drugi pregled)
(b) Ribogojnice salmonidov brez plemenskih rib	2	2	30 (prvi in drugi pregled) <sup>(4)</sup>	0
(c) Ribogojnice nesalmonidov brez plemenskih rib	2	2	150 (prvi in drugi pregled)	0

Največje število rib na bazen: 10

<sup>(1)</sup> Namesto tega se lahko uporabi zmanjšana velikost vzorca, kakor je navedena v tabeli 1B, če so izpolnjene zahteve iz delov II.1, I.1.2.1.b in III.

<sup>(2)</sup> Klinični pregledi.

<sup>(3)</sup> V izjemnih okoliščinah, če je nemogoče dobiti ovarialno tekočino, se lahko namesto nje vzorčijo organi.

<sup>(4)</sup> Vzorcji se ne smejo zbirati pred pretekom treh tednov po prenosu rib iz sladke v slano vodo.

TABELA 1B

**Program pregledov in vzorčenja za dvoletno obdobje nadzovanja pred pridobitvijo odobrenega statusa glede VHS in/ali IHN v območjih in ribogojnicah v neodobrenih območjih z uradno priznано dokazano preteklostjo brez prisotnosti teh bolezni**

(v skladu z Direktivo 91/67/EGS, priloga B in C in določbami iz dela I in III te priloge)

	Število kliničnih pregledov na leto(dve leti)	Število laboratorijskih preiskav na leto(dve leti)	Laboratorijska preiskava glede prisotnosti virusa	
			Število gojenih rib (Organski material)	Število plemenskih rib (Ovarialna tekočina)
Celinska območja in ribogojnice				
(a) Ribogojnice s plemenskimi ribami	2	2	0 (prvi pregled) <sup>(1)</sup> 30 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) <sup>(2)</sup> 0 (drugi pregled)
(b) Ribogojnice samo s plemenskimi ribami	2	1	0	30 (prvi ali drugi pregled) <sup>(2)</sup>
(c) Ribogojnice brez plemenskih rib	2	2	30 (prvi in drugi pregled)	0
Obalna območja in ribogojnice				
(a) Ribogojnice s plemenskimi ribami	2	2	0 (prvi pregled) 30 (drugi pregled)	30 (prvi pregled) <sup>(2)</sup> 0 (drugi pregled)
(b) Ribogojnice salmonidov brez plemenskih rib	2	2	30 (prvi in drugi pregled) <sup>(3)</sup>	0
(c) Ribogojnice nesalmonidov brez plemenskih rib	2	2	30 (prvi in drugi pregled)	0

Največje število rib na bazen: 10

<sup>(1)</sup> Klinični pregledi.

<sup>(2)</sup> V izjemnih okoliščinah, če je nemogoče dobiti ovarialno tekočino, se lahko namesto nje vzorčijo organi.

<sup>(3)</sup> Vzorci se ne smejo zbirati pred pretekom treh tednov po prenosu rib iz sladke v slano vodo.

TABELA 1C

**Program pregledov in vzorčenja za območja in ribogojnice v neodobrenih območjih za ohranitev odobrenega statusa glede VHS in/ali IHN**

(v skladu z Direktivo 91/67/EGS, priloga B in C in določbami iz dela I te priloge)

	Število kliničnih pregledov na leto	Število rib v vzorcu za laboratorijske preiskave <sup>(1)</sup>	
		Število gojenih rib (Organski material)	Število plemenskih rib (Ovarialna tekočina)
Celinska območja in ribogojnice			
(a) Ribogojnice s plemenskimi ribami	2	20 (prvi ali drugi pregled)	10 (prvi ali drugi pregled) <sup>(2)</sup>

	Število kliničnih pregledov na leto	Število rib v vzorcu za laboratorijske preiskave <sup>(1)</sup>	
		Število gojenih rib (Organski material)	Število plemenskih rib (Ovarialna tekočina)
(b) Ribogojnice samo s plemenskimi ribami	2	0	30 (prvi ali drugi pregled) <sup>(2)</sup>
(c) Ribogojnice brez plemenskih rib	2	30	0
Obalna območja in ribogojnice			
(a) Ribogojnice s plemenskimi ribami	2	20 (prvi ali drugi pregled)	10 (prvi ali drugi pregled) <sup>(2)</sup>
(b) Ribogojnice brez plemenskih rib	1	30 <sup>(3)</sup>	0

Največje število rib na bazen: 10

<sup>(1)</sup> V odobrenih območjih je treba vzorce zbirati samo s kolobarjenjem 50 % ribogojnic vsako leto. V odobrenih ribogojnicah v neodobrenih območjih je treba vzorce zbirati vsako leto.

<sup>(2)</sup> V izjemnih okoliščinah, če je nemogoče dobiti ovarialno tekočino, se lahko namesto nje vzorčijo organi.

<sup>(3)</sup> Vzorci se ne smejo zbirati pred pretekom treh tednov po prenosu rib iz sladke v slano vodo.

## DEL II

### Diagnostični postopki za potrditev VHS in IHN pri pričakovanih izbruhih

Za diagnosticiranje VHS in IHN se opravi eden ali več naslednjih postopkov:

- A. konvencionalna izolacija virusa z naknadno serološko določitvijo virusa,
- B. izolacija virusa s sočasno serološko določitvijo virusa,
- C. drugi diagnostični postopki (IFAT, ELISA).

Potrditev prvega primera VHS in/ali IHN v ribogojnicah v odobrenih območjih ne sme temeljiti samo na metodi C. Treba je uporabiti tudi metodo A ali B.

Tkivo, namenjeno za virološko preiskavo, lahko v nekaterih primerih spremlja dodatni material za bakteriološko, parazitološko, histološko ali kakšno drugo preiskavo, da se omogoči postavitev drugačne diagnoze.

#### A. Konvencionalna izolacija virusa z naknadno serološko določitvijo virusa

##### I.1 Izbira vzorcev

Za preiskavo je treba izbrati najmanj 10 rib, ki kažejo tipične znake IHN ali VHS.

##### I.2 Priprava in pošiljanje vzorcev rib

Kakor je določeno v delu I.I.3.

##### I.3 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala

Kakor je določeno v delu I.I.4.

##### II. Priprava vzorcev za virološko preiskavo

Kakor je določeno v delu I.II.

##### III. Virološka preiskava

Kakor je določeno v delu I.III.

##### IV. Določitev virusa

Kakor je določeno v delu I.IV.

#### B. Izolacija virusa s sočasno serološko določitvijo virusa

##### I.1 Izbira vzorcev

Kakor je določeno v delu II.A.I.1.

##### I.2 Priprava in pošiljanje vzorcev rib

Kakor je določeno v delu I.I.3.

### I.3 Zbiranje dodatnega diagnostičnega materiala

Kakor je določeno v delu I.I.4.

### II.1 Homogenizacija organov

Kakor je določeno v delu I.II.2.

### II.2 Centrifugacija homogenata

Homogenat se centrifugira v ohlajeni centrifugi pri temperaturi 2!!! error character !!! B!!! error character !!! T do 5 °C pri 2 000 do 4 000 × g 15 minut, supernatant pa se zbere in obdeluje štiri ure pri 15 °C z antibiotiki, kot je gentamicin 1 mg/ml, ali filtrira skozi membrano (0,45 µm), ki minimalno veže proteine.

### II.3 Obdelava supernatanta z diagnostičnimi antiserumi

Z antibiotiki obdelana ali skozi membrano prefiltrirana organska suspenzija se razredči v razmerju 1:10 in 1:1 000 v gojišču celične kulture, alikvoti pa se mešajo in inkubirajo 60 minut pri 15 °C z enakimi deli reagentov, naštetih v delu I.IV.2.

### III.1 Celične kulture in gojišča

Kakor je določeno v delu I.III.1.

### III.2 Nacepljanje celičnih kultur

Iz vsake zmesi virus-serum (pripravljene, kot je določeno v Delu II.B.II.3) se nacepita najmanj dve celični kulturi na vsako celično linijo, vsaka s 50 µl.

### III.3 Inkubacija celičnih kultur

Kakor je določeno v delu I.III.I.

### III.4 Mikroskopiranje

Nacepljene celične kulture se dnevno pregledujejo zaradi pojava CPE pri 40- do 150-kratni povečavi. Če eden od uporabljenih antiserumov prepreči CPE, za virus velja, da je bil ustrezno določen.

Če nobeden od antiserumov ne prepreči CPE, je treba opraviti postopke za prepoznavanje virusov v skladu z delom I.IV.

### III.5 Kultiviranje na novem gojišču

Če se po 7 do 10 dneh CPE ne pojavi, je treba opraviti kultiviranje na novem gojišču iz kultur, nacepljenih s supernatantom in gojiščem (del II.B.II.3) v skladu z delom I.III.5.

## C. Drugi diagnostični postopki

Supernatant, pripravljen kot je opisano v delu I.II.2, se lahko pregleda po metodi IFAT ali ELISA v skladu z delom I.IV.3 ali I.IV.4. Te hitre postopke je treba dopolniti z virološko preiskavo v skladu z A ali B v 48 urah po vzorčenju, če:

- (a) je bil dobljen rezultat negativen; ali
- (b) je bil pozitiven rezultat pridobljen z materialom, ki predstavlja prvi primer IHN ali VHS v odobrenem območju.

Tkivo se lahko pregleda z drugimi diagnostičnimi metodami, kot so RT-PCR, IF, z imunohistokemijo na zamrznjenih partijah tkiva, fiksiranega v formalinu. Te postopke mora vedno spremljati nacepitev nefiksiranega tkiva na celični kulturi.

## DEL III

### Dokazi, da v preteklosti v območjih ali ribogojnicah v neodobrenih območjih ni bilo primerov VHS in/ali IHN

#### Smernice in merila za uradni program zdravstvenega nadzora

1. Program zdravstvenega nadzora se uvede lahko samo:
  - po uradno potrjenem programu za izkoreninjenje VHSV in/ali IHNV, vključno z odstranitvijo vseh rib iz ribogojnice, očiščenjem, razkuženjem in opustitvijo ribogojstva pred ponovno obnovo staleža z ribami iz odobrenih ribogojnic, ali
  - v ribogojnicah, ki v preteklosti niso bile okužene z VHSV ali IHNV.
2. Program zdravstvenega nadzora mora temeljiti na kliničnih pregledih in laboratorijskih preiskavah.
3. Program mora zajemati dva letna klinična zdravstvena pregleda v skladu s smernicami iz dela I.

4. Iz vsake ribogojnice se najmanj pri enem od pregledov, opravljenih vsako leto, zbere 30 vzorcev ribjih tkiv in/ali ovarialne tekočine. Vzorci se izberejo, pripravijo in dajo v laboratorijsko preiskavo v skladu z deli I, II in IV.
5. Program zdravstvenega nadzora se izvaja vsaj štiri leta v vseh ribogojnicah v območju ali ribogojnici (v neodobrenem območju), ki naj bi dobila dovoljenje.
6. Za uradno potrditev programa se ne sme pojaviti ali odkriti nobenega primera VHS ali IHN (nobene klinične okužbe ali izolacije virusa).

## DEL IV

**Postopek titracije za preveritev dovzetnosti celičnih kultur za okužbo**

Priporočeni postopki za titracijo iz dela I.III.3 so navedeni spodaj.

Treba je uporabiti vsaj dva izolata VHSV in en izolat IHNV. Izolati morajo predstavljati pomembno skupino virusov v EU, npr. za VHSV en patogeni izolat amerikanke v sladki vodi in en patogeni morski izolat za romba, za IHNV pa en patogeni sev amerikanke iz Evrope. Uporabijo se dobro določeni izolati iz držav članic. Referenčni izolati so na voljo v referenčnem laboratoriju EU za boleznih rib.

Serije atenuiranega virusa se razmnožujejo v stekleničkah s celično kulturo na celicah BF-2 ali RTG-2 za VHSV in na celicah EPC ali FHM za IHNV. Uporabi se gojišče celične kulture z najmanj 10 % serumom. Za nacepitev uporabite nizki MOI (< 1).

Celokupni virus CPE se pridobiva s 15 minutnim centrifugiranjem supernatanta celične kulture pri  $2\,000 \times g$ , filtersko sterilizira skozi 0,45  $\mu\text{m}$  membranski filter in porazdeli v označene fiole za zamrzovanje. Virus se hrani pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

En teden po zamrznitvi se tri fiole z reproducirano vsebino vsakega virusa odmrznejo pod mrzlo vodo in titrirajo na svojih ustreznih celičnih linijah. Vsak izolat virusa se odmrzne in titrira najmanj vsakih šest mesecev ali če obstaja sum, da se je dovzetnost celične linije zmanjšala.

Titracijske postopke je treba podrobno opisati, vsakič pa je treba uporabiti enak postopek.

Titracija s končnim redčenjem zajema najmanj šest ponovitev v vsakem koraku razredčenja. Titri se primerjajo s prvotno pridobljenimi titri. Če titer katerega koli od treh izolatov virusa v primerjavi z začetnim titrom pade za faktor 2 log ali več, se celična linija ne sme več uporabljati za namene nadzora.

Če se v laboratoriju hranijo različne celične linije, je treba vsako linijo preučevati ločeno.

Evidenca se hrani najmanj 10 let.

## DEL V

**Akronimi in okrajšave**

BF-2	Zarod modrikastega sončnega ostria –2 (celična linija)
CPE	Citopatski učinek
CRL	Referenčni laboratorij Skupnosti za boleznih rib
ELISA	Encimsko-immunski test
EPC	Epithelioma papulosum cyprini (celična linija)
FHM	Tolstoglavi pisanec (celična linija)
FITC	Fluoresceinski izotiocianat
Hepes	N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etan sulfonska kislina
HRP	HRP peroksidaza
IF	Imunofluorescenca
IFAT	Indirektni imunofluorescenčni test za ugotavljanje protiteles
IHN(V)	Nalezljiva hematopoetska nekroza (virus)
IPN	Nalezljiva nekroza trebušne slinavke (virus)
MEM	Optimalno gojišče

---

MOI	Raznolikost pojava infekcije (razmerje števila infekcioznih delcev virusa, ki se doda znanemu številu celic v kulturi)
OPD	Ortofenilendiamin
PBS	Solna raztopina v fosfatnem pufri
RTG-2	Spolni organi amerikanke (celična linija)
RT-PCR	Reverzna transkriptaza verine reakcije s polimerazo
Tris-HCl	Tris (hidroksimetil) aminometan – HCl
TRITC	Tetrametil-rodamin-izotiocianat
VHS(V)	Virusna hemoragična septikemija (virus)

---